

Pré-diluição e congelamento de sêmen suíno em água de coco *in natura*, após três diferentes pré-tratamentos de incubação*

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Edna Kotzias-Bandeira
Departamento de Medicina
Veterinária
Universidade Federal Rural de
Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros,
s/nº, Dois Irmãos
52171-900 - Recife - PE
e-mail: ebande@elogica.com.br

Boar semen pre-diluted or freezing with coconut water *in natura* after three different pre-treatments

1-Tierärztliche Hochschule
Hannover (Escola Superior de
Medicina Veterinária de
Hannover), Alemanha
2-Universidade Federal Rural e
Pernambuco - PE

Edna KOTZIAS-BANDEIRA¹; Dagmar WABERSKI¹; Karl Fritz WEITZE¹; Márcia Brayner Paes BARRETO²

RESUMO

Foram utilizados vinte e quatro ejaculados de cinco diferentes cachos na congelamento de sêmen suíno, sendo doze deles pré-diluídos em água de coco *in natura* e em Merck I, utilizando a lactose como diluidor de refrigeração e de congelamento (experimento A) e doze pré-diluídos apenas com Merck I. Após três diferentes pré-tratamentos, a água de coco *in natura* foi utilizada como diluidor de refrigeração e de congelamento, sendo a lactose utilizada como controle (experimento B). Seguiu-se a metodologia convencional de congelamento de sêmen desta espécie -Tierärztliche Hochschule Hannover (grupo 1A-1B) e um novo processo com longo período de equilíbrio (grupos 2A-2B e 3A-3B). A qualidade do sêmen descongelado foi avaliada pela motilidade subjetiva (SMOT), motilidade computadorizada (CMOT) e morfologia das células com borda apical normal (NAR), após fixação em formol citrato. As porcentagens de espermatozoides com NAR foram 65% (grupo 1A), 71% (grupo 2A) e 75% (grupo 3A) para o sêmen pré-diluído em água de coco e 60% (grupo 1A), 68% (grupo 2A) e 68% (grupo 3A) para aquele pré-diluído com Merck I (experimento A); e 56% (grupo 1B), 68% (grupo 2B) e 73% (grupo 3B) para o sêmen congelado em água de coco e 60% (grupo 1B), 68% (grupo 2B e 3B) para o sêmen congelado em lactose (experimento B). Não havendo, portanto, diferença estatística entre os dois pré-diluentes e os dois diluentes de refrigeração e de congelamento ($p < 0,05$). Concluiu-se, portanto, que 1) os pré-tratamentos com longo período de equilíbrio têm melhor efeito na proteção do acrossoma do espermatozoide suíno e para manter a motilidade espermática e 2) a água de coco como pré-diluyente e diluyente para refrigeração e de congelamento é semelhante ao Merck I (experimento A) e a lactose (experimento B), sendo portanto indicado para pré-diluir e congelar sêmen suíno.

UNITERMOS: Sêmen; Varrões; Congelamento; Diluentes.

INTRODUÇÃO

A utilização da água de coco como diluidor do sêmen caprino já é estudada há algum tempo por pesquisadores brasileiros e já vem sendo aplicada com bastante frequência em criações da região nordeste do Brasil com resultados de expressiva significância. Este diluidor eliminou o principal problema para o sêmen do reprodutor caprino, resfriado e congelado, que é a ação de enzimas do tipo fosfolipase A, produzidas pelas glândulas bulbouretrais, sobre os fosfolípidos dos diluidores, fornecendo como produto da reação ácidos graxos e lisolecitinas, que são tóxicos para

os espermatozoides^{3,7,8,14,15,16}. A água de coco *in natura*, em gel e sob a forma estabilizada vem sendo testada também em sêmen e embriões de diferentes espécies por diversos pesquisadores brasileiros^{4,5,13,17,18,19,21}. Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos para avaliar a viabilidade dos espermatozoides à temperatura ambiente, quando adicionados a diluidores contendo água de coco. Sabe-se que os espermatozoides são metabolicamente mais ativos em diluentes adicionados de água de coco e de citrato de sódio do que adicionados de carbonato de cálcio²⁴. O efeito benéfico da água de coco sobre os espermatozoides é devido inteiramente a uma fração neutra que contém vários ânions e cátions, açúcar

livre, sorbitol e inositol, verificando-se que não contém nenhuma substância desconhecida com propriedades especiais¹¹. Na espécie suína, os resultados de fertilidade de fêmeas inseminadas com sêmen congelado têm ficado abaixo das expectativas, fornecendo sempre leitegadas de tamanho menor²². Uma fração rica da água de coco (JYP), adicionada ou não ao diluente BTS, foi testada *in vivo* na diluição de sêmen suíno e os resultados mostraram que a prolificidade (nascimentos vivos por fêmea) foi similar nos diferentes grupos, tendo a fertilidade não diminuído quando o JYP foi adicionado ao diluente BTS²³. Os efeitos negativos da congelamento sobre os espermatozoides de suínos têm sido também descritos por diferentes autores^{1,6,10}, principalmente sobre o acrossoma das células e a baixa motilidade pós-congelamento^{9,20,25}. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito da água de coco na pré-diluição do sêmen de suínos antes da congelamento e como diluente de refrigeração e de congelamento do sêmen de suínos, utilizando-se três diferentes pré-tratamentos:

1- Processo convencional de congelamento (Westendorf-Verfahren modificado pela Escola Superior de Veterinária de Hannover - grupo 1A e 1B), utilizando-se a fração rica do sêmen;

2- Processo com longo período de equilíbrio, utilizando-se a fração rica do sêmen (grupo 2A e 2B);

3- Processo com longo período de equilíbrio, utilizando-se o ejaculado completo (grupo 3A e 3B).

MATERIAL E MÉTODO

Local do estudo e animais

Este estudo foi desenvolvido no "Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztliche Hochschule Hannover" - Alemanha, entre os meses de agosto e setembro de 1995 (experimento A) e entre janeiro e fevereiro de 1996 (experimento B). Foram utilizados vinte e quatro ejaculados de cinco cachorros das raças Landrace alemão e Schwäbisch-hällischen, com idades

variando entre dois e cinco anos.

Colheita, exame e diluição do sêmen

A colheita do sêmen foi realizada pelo método da mão enluvada com ajuda de Phantome. A fase rica e a fase pobre do sêmen foram colhidas em vidros separados, pré-aquecidos a 35°C, separando-se a secreção das glândulas bulbouretrais por gaze estéril. A fase rica do ejaculado foi fracionada em 3 copos para centrifugação, e a fase pobre foi acrescentada em um dos copos, no mesmo volume da fase rica. O sêmen foi, então, avaliado quanto à aparência, volume, concentração, motilidade e morfologia¹².

Após a descongelamento, foi realizado o segundo exame morfológico para diferenciar os espermatozoides com borda apical normal (NAR) e com danos no acrossoma, devido ao processo de congelamento. Para este exame, foram utilizados 50 µl de sêmen descongelado, fixado em formol citrato, sendo analisado em microscópio de contraste de fase (Carl Zeiss) com aumento de 1.200X.

A motilidade do sêmen descongelado foi avaliada subjetivamente em microscópio de contraste de fase (Olympus BH) e por análise computadorizada (SM-CMA - Firma Strömberg-Mika - CMOT, versão 4.1). Para a segunda avaliação da motilidade, foram contadas, no mínimo, duzentas células por amostra de sêmen. O exame computadorizado foi realizado em câmara de Makler (Counti chamber MAKLER - Sefi Medical Instruments), com 10 µm de profundidade.

As células com velocidade abaixo de 10 µm/s foram consideradas como imóveis, até 25 µm/s como de movimento local e acima de 25 µm/s como de movimento retilíneo progressivo.

Após avaliação, o sêmen foi pré-diluído na proporção 1 + 1 com diluidor Merck I ou água de coco *in natura* filtrada (experimento A) e apenas com Merck I (experimento B).

Componentes dos diluentes Merck I e água de coco *in natura*:

Componentes dos diluentes de refrigeração e de congelamento:

Experimento A:	Diluente de refrigeração	Diluente de congelamento
Solução de lactose	80%	74,0%
11 Gema de ovo	20%	18,5%
Equex STM		1,5%
Glicerina		6,0%

Experimento B:	Diluente de refrigeração	Diluente de congelamento
Solução de Lactose (11%) ou água de coco <i>in natura</i>	80%	74,0%
Gema de ovo	20%	18,5%
Equex STM		1,5%
Glicerina		6,0%

Merck I (g/1000 ml Aqua bidestilada):
D (+) glucose (Monohidrat): 60,0 g
Tri-Citrato de Sódio-2-hidrato: 3,7 g
EDTA: 3,7 g
Hidrocarbonato de Sódio 1,2 g
Diidrossulfato de estreptomina: 0,8 g
Penicilina-G-Sódio: 0,3 g
Água de coco (g/250 ml Aqua bidest.):
Água de coco *in natura* filtrada: 500 ml
Tri-Citrato de Sódio-2-hidrato 5%: 250 ml

Pré-tratamento para congelamento

Após a pré-diluição, prosseguiu-se o primeiro pré-tratamento de congelamento do sêmen suíno, modificado pela Tierärztliche Hochschule Hannover (grupo 1A e 1B), permanecendo o sêmen em resfriamento a 20°C durante 1,5 h. Após este período, o sêmen permaneceu a 15°C durante 2,5h. Em seguida, o sêmen foi centrifugado a 800 g (3.000 rpm), a 15°C durante 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o pellet ressuspenso com 30 ml do diluente de resfriamento, sendo estimada a concentração.

No método da congelamento com longo período de equilíbrio, a fase rica do sêmen (grupo 2A e 2B) e o ejaculado total (grupo 3A e 3B) foram resfriados a 18°C por 4 horas logo após a pré-diluição e em seguida submetido ao período de equilíbrio, à mesma temperatura, por 16 horas seguidas. O sêmen foi centrifugado a 800 g a 17°C durante 12,5 minutos, ressuspenso e estimada a concentração.

Uma segunda ressuspensão foi realizada com o diluente de refrigeração até 2/3 do volume final ($1,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml). Em seguida procedeu-se à última fase de refrigeração a 5°C durante 1,5 h, sendo acrescido o diluente de congelamento até 1/3 do volume final (1×10^9 espermatozoides/ml).

Congelamento

O sêmen foi envasado em macrotubos de 5 ml (recipientes plásticos de PVC redondos com medida interna de 5,4 mm e comprimento de 280 mm) com seringa descartável, conforme o pré-tratamento. As extremidades foram fechadas com esferas metálicas. Os macrotubos foram colocados em caixa de isopor de 40 x 30 x 15 cm, durante 20

minutos em vapor de N₂ (-120°C), e, finalmente, armazenado em botijão de N₂ (-96°C).

Descongelamento

Após, no mínimo, uma semana de armazenamento, os macrotubos foram descongelados, conforme o pré-tratamento, a 50°C durante 40 segundos, com leve agitação. Em seguida, o sêmen foi colocado em frascos plásticos, retirada amostra para morfologia (50 µl) e rediluído em Merck I a 30°C, na proporção 1:10.

Após incubação em banho-maria a 38°C durante 10 minutos, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade subjetiva e computadorizada a morfologia.

Análise Estatística

As variáveis SMOT, CMOT e NAR foram analisadas pelo procedimento General Linear Models "GLM" - (SAS, 1985). As médias foram comparadas pelo teste t de Student, sendo consideradas significantes as diferenças para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tab. 1 e 2, são observados os parâmetros de avaliação do sêmen descongelado. O primeiro se baseou na motilidade subjetiva SMOT, com valores médios semelhantes de 55%, 57% e 42%; 55%, 51% e 43% e para os diluentes água de coco e Merck I (Tab. 1) e de 57%, 54%, e 43%; 55%, 51% e 43% para os diluentes água de coco e lactose (Tab. 2), respectivamente, não havendo diferença estatística significativa ($p < 0,05$). É importante, porém, salientar que os pré-tratamentos com longo período de equilíbrio apresentaram melhores resultados que o método convencional. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Arruda *et al.*².

Idênticos resultados foram observados para o parâmetro motilidade computadorizada CMOT (64%, 58% e 45%) e (62%, 58% e 47%) para os diluentes água de coco e Merck I (experimento A), assim como (59%, 54% e 41%) e 62%, 58% e 47%) para os diluentes água de coco e lactose (experimento B), respectivamente. Estes valores não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Tabela 1

Motilidade subjetiva (SMOT) e computadorizada (CMOT) assim como integridade do acrossoma (NAR) de espermatozoides descongelados de suínos, diluídos previamente em água de coco e Merck I (experimento A).

Cachaço (Ejaculados)	Pré-tratamento	SMOT		CMOT		SMOT	
		Ág.coco Merck I		Ág.coco Merck I		Ág.coco Merck I	
		%	%	%	%	%	%
A-E (12)	Grupo 1A	42 ^a	43 ^a	45 ^c	47 ^c	65 ^e	60 ^e
	Grupo 2A	57 ^a	51 ^a	58 ^c	58 ^c	71 ^e	68 ^e
	Grupo 3A	55 ^b	55 ^b	64 ^d	62 ^d	75 ^f	68 ^f

Tabela 2

Motilidade subjetiva (SMOT) e computadorizada (CMOT) assim como integridade do acrossoma (NAR) de espermatozoides descongelados de suínos, tendo a água de coco e lactose como diluentes de refrigeração e congelamento (experimento B).

Cachaço (Ejaculados)	Pré-tratamento	SMOT		CMOT		SMOT	
		Ág.coco Merck I		Ág.coco Merck I		Ág.coco Merck I	
		%	%	%	%	%	%
A-E (12)	Grupo 1A	43 ^a	43 ^a	41 ^c	47 ^c	56 ^e	60 ^e
	Grupo 2A	54 ^a	51 ^a	54 ^c	58 ^c	68 ^e	68 ^e
	Grupo 3A	57 ^b	55 ^b	59 ^d	62 ^d	73 ^f	68 ^f

Letras diferentes na mesma linha e coluna diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

Institut für Reproduktionsmedizin – Tierärztliche Hochschule Hannover – janeiro / fevereiro 1996.

Toniolli²³ não encontrou diferenças significativas entre os valores de motilidade de sêmen de suínos nos diluidores água de coco estabilizada e BTS, embora tenha o autor trabalhado apenas com sêmen resfriado.

Outro resultado que deve ser considerado é a porcentagem de células com acrossoma intacto, ou seja, com borda apical normal (NAR) com valores de 75%, 71% e 65% para o sêmen pré-diluído com água de coco e 68%, 68% e 60% para aquele pré-diluído em Merck I (experimento A) e valores de 73%, 68% e 56% para o sêmen congelado com água de coco e 68%, 68% e 60% para o sêmen congelado com lactose (experimento B).

Embora não havendo diferença estatística significativa, a melhor taxa de NAR com água de coco nos dois experimentos indica a possibilidade do uso deste diluente em novas pesquisas *in vivo* com sêmen de suínos, diminuindo assim os custos de importação de outros diluentes para o sêmen de suínos. Na literatura consultada, não foram encontradas referências sobre a porcentagem de espermatozoides com NAR após a congelação

do sêmen de suínos com água de coco.

CONCLUSÕES

1- A maior porcentagem de espermatozoides com NAR no sêmen pré-diluído em água de coco (experimento A) e porcentagem idêntica no sêmen congelado em água de coco e lactose (experimento B) são de grande importância para as pesquisas de congelamento de sêmen de suínos, pois ficou comprovada a maior proteção deste diluidor à sensível membrana plasmática dos espermatozoides, durante o processo de congelamento;

2- A motilidade pós-descongelamento foi semelhante para ambos os diluidores, sendo, portanto, a água de coco indicada para a pré-diluição ou a congelamento de sêmen suíno;

3- Maiores estudos são necessários para melhorar os resultados com a água de coco, principalmente realizando-se testes *in vivo*.

SUMMARY

Twenty-four ejaculates were collected from five boars for the conventional freezing procedure at the Veterinary School of Hannover (group 1A-1B) and for an extended holding time procedure (group 2A-2B and 3A-3B). The semen were prediluted in two different diluents, coconut water *in natura* and Merck I medium before freezing (experiment A) and prediluted only with Merck I, but cooling and freezing with coconut water *in natura* or lactose (experiment B). The semen were arranged into three groups according to the different holding periods before freezing, group 1A-1B (sperm-rich phase, preserved for 4 hours by 15°C), group 2A-2B (sperm-rich phase, preserved for 16 hours by 18°C) and group 3A-3B (total semen, preserved for 16 hours by 18°C). The quality of the thawed boar spermatozoa was evaluated by subjective motility (SMOT), computerassisted motility (Cell Motion Analyser, Strömberg-Mica - CMOT) and morphology of acrosomal ridges (NAR) after fixation in formol citrate. The acrosomal integrity (NAR) was 65% (group 1A), 71% (group 2A) and 75% (group 3A) for semen prediluted with coconut water and 60% (group 1A), 68% (group 2A) and 68% (group 3A) for semen prediluted with Merck I medium, respectively (experiment A); and 56% (group 1B), 68% (group 2B) and 73% (group 3B) for semen freezing with coconut water diluent, and 60% group 1B), 68% (group 2B and 3B) for semen freezing with lactose (experiment B). Thus, did not differ significantly ($p < 0.05$) between both pre-diluents and both freezing diluents. However, the post thaw motility by both SMOT and CMOT and the acrosome integrity (NAR) were significantly higher ($p < 0.05$) in the semen preserved for extended holding time (group 2A-2B and 3A-3B) than those for short time (group 1A-1B). It is concluded that the extended holding time has a better effect to protect acrosome of boar spermatozoa and also maintain sperm motility. Therefore, preserving boar semen for longer period before freezing is indicated for subsequent research on *in vitro* research with boar semen. And because the results using coconut prediluent and diluent were similar to that using Merck I medium (experiment A) and using lactose (experiment B), it is also indicated to use coconut for diluent and for freezing boar semen.

UNITERMS: Semen; Boar; Freezing; Diluents.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALMLID, T.; HOFMO, P.O. A brief review of frozen semen application i.e. under norwegian A.I. service conditions. *In: INT. CONF. ON BOAR SEMEN PRESERVATION*, 3., Mariensee, 1995. **Proceedings**. p.169-73.
- 2- ARRUDA, E.B.; WABERSKI, D.; WEITZE, K.F. Cooling of boar spermatozoa prior to freezing and post thaw quality. *In: VETERINÄR - HUMANMEDIZINISCHE GEMEINSCHAFTSTAGUNG ÜBER PHYSIOLOGIE UND PATHOLOGIE DER FORTPFLANZUNG*, 29., Wien, 1997. **Proceedings**. p.87.
- 3- BALAKRISHNAN, P.P.; NEELAKANTA, T. Preservation of buck semen at room temperature in coconut milk extender, Kerala. **Journal of Animal Science**, v.13, n.2, p.321-4, 1982.
- 4- BEZERRA, M.B.; EVANGELISTA, J.J.F.; TEXEIRA, M.D.A.; OLIVEIRA, L.F.; NUNES, J. Alterações morfológicas dos espermatozoides de ovinos e caprinos diluídos em fração ativa da água de coco e gel. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA*, 23., Olinda, 1994. **Anais**. p.528.
- 5- BLUME, H.; MARQUES Jr., A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murfdeos. **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 23., Olinda, 1994. **Anais**. p.528.
- 6- BUHR, M.M.; PETTITT, M.J. Frozen-thawed boar sperm: isolation of membranes and measurements. *In: INT. CONF. ON BOAR SEMEN PRESERVATION*, 3., Mariensee, 1995. **Proceedings**. p.147-52.
- 7- CORTEEL, J.M. Viabilité des spermatozoides de bouc conservé avec ou sans leur plasma seminal; effet du glicose. **Ann. Biology Animal Biophysy**, v.14, n.4B, p.741-5, 1974.
- 8- CORTEEL, J.M. Production de sperme chez le bouc: variation saisonaire de la quantité et de la qualité de sperm récolter selon llage des animaux. **C. R. Sj. De la Rech. Ovine et Caprine**, Paris, p.4-7, 1975.
- 9- DIDION, B.A.; SCHOENBECK, R.A. Fertility of frozen boar semen used for AI in commercial settings. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION*, 3., Mariensee, 1995. **Proceedings**. p.141.
- 10- FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W.; PANICH, P.L. Recent advances in Cryopreservation of boar semen. Glycerol revisited. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION*, 3., Mariensee, 1995. **Proceedings**. p.141-6.
- 11- JOHNSON, A.W. Coconut water as a constituent of semen diluents in the tropics, **Veterinary Bulletin**, London, v.35, n.10, p.605-7, 1965.
- 12- KRAUSE, D. Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde. Hannover, **Tierärztliche Hochschule**, 1966. Habilitation-Schrift.
- 13- MONTEZUMA Jr., P.A.; VIANA NETO, R.; NUNES, J.F. Utilização da água de coco *in natura* com adição de gema de ovo como diluente de congelamento do sêmen canino, em paillets de 0,50 ml. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA*, 23., Olinda, 1994. **Anais**. p.535.
- 14- NUNES, J.F. **Etude preliminaire de la recherche sur role physiologique du plasma seminal de bouc**. Paris : DEA Université Pierre et Marie Curie, 1981.
- 15- NUNES, J.F. **Etude des effets du plasma seminal sur la survié *in vitro* des espermatozoides de bouc**. Paris, 1982. Thèse - Université Pierre et Marie Curie.
- 16- NUNES, J.F.; CORTEEL, J.M.; Combarous, Y.; BARYL, Y. Role du plasma seminal dans la servié *in vitro* des spermatozoides de bouc, **Reproduction Nytr. Development**, v.4, n.22, p.77-86, 1982.
- 17- OLIVEIRA, L.F.; EVANGELISTA, J.J.F.; BEZERRA, M.B.; NUNES, J.F. Água de coco *in natura* adicionada ou não de gema de ovo e sob a forma estabilizada de gel como diluente do sêmen de ovino. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA*, 23., Olinda, 1994. **Anais**. p.561.
- 18- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ERIKSSON, B.; LUNDEHEIM, N. Freezing Boar semen in Flat Plastic Bags. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION*, 23., Mariensee, 1995. **Proceedings**. p.161-8.
- 19- SALLES, M.G.F.; NUNES, J.F. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino diluído em água de coco *in natura* e fração "B". *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA*, 23., Olinda, 1994. **Anais**. p.533.
- 20- SIMMET, C. **Kältephysikalische Aspekte der Gefrierkonservierung von Ebersperma in ihrer Auswirkung auf Samenqualität und Befruchtungsrate**. Tierärztlichen, 1993. (Thesis) - Hochschule Hannover.
- 21- TEXEIRA, M.D.A.; RODRIGUES, A.P.R.; SOUSA, N.M.; NUNES, J.F. Avaliação da taxa de degradação da motilidade do sêmen de ovinos deslanados e caprinos, diluídos em água de coco e suas frações. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA*, 23., Olinda, 1994. **Anais**. p.576.
- 22- TONIOLLI, R. Biotecnologia da Reprodução. Aspectos reprodutivos do varrão. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL*, 9., Belo Horizonte, 1991. **Anais**. V.2. p.183-95.
- 23- TONIOLLI, R.; BARITEAU, F.; BUSSIÉRE, J.; COUROT, M.; COMBARNOUS, Y. Conservation prolongée du sperme frais de varrat. **Journées Rech. Porcine en France**, v.27, p.67-70, 1995.
- 24- TONIOLLI, R.; CAVALCANTE, S.G.; MESQUITA, D.S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.14, n.4, p.249-54, 1990.
- 25- WEITZE, K.F. Gefrierschädigung und Gefrierschutz im Rahmen der Tiefgefrierkonservierung lebenden Materials unter besondere Berücksichtigung der Säugersamenzelle. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.82, p.261-7, 1977.

Recebido para publicação: 31/03/1998
Aprovado para publicação: 26/02/1999