

Problemas e soluções com o uso de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Frozen and cooled semen: Challenges and solutions for Mangalarga Marchador breed

Gustavo Mendes Gomes, Leticia Patrão de Macedo Gomes

Centro Avançado de Reprodução Equina, Vassouras, RJ, Brasil

E-mail: bigugomes@gmail.com

Resumo

Inúmeras biotecnologias se tornaram difundidas e comuns tais como a inseminação artificial com a manipulação de sêmen (refrigeração e congelamento) e transferência de embriões. Hoje, o Brasil é um dos países que mais realiza transferência de embriões equinos no mundo, sendo a raça Mangalarga Marchador a que faz o maior número delas. Existem alguns pontos que impedem a difusão plena dessas biotecnologias, como os resultados inconstantes e às vezes insatisfatórios que ocorrem ao trabalhar com sêmen de garanhão Mangalarga Marchador. O objetivo deste trabalho foi revisar os pontos críticos relativos à utilização das biotecnologias de sêmen na raça Mangalarga Marchador.

Palavras-chave: congelamento; Mangalarga Marchador; refrigeração; sêmen.

Abstract

It is widely known the increasing interest in the use of biotechnologies on reproduction by the equine industry. The Mangalarga Marchador breed has shown the worst results for semen cryopreservation when compared to jumping horses and Quarter-horses. For this reason, most of Mangalarga Marchador stallions are included in a group classified as Bad Freezers (Stallions with total sperm motility lower than 30% after frozen-thawed with glycerol). The aim of this study was to review critical points for the application of semen biotechnologies in Mangalarga Marchador breed.

Keywords: cooled semen; frozen semen; Mangalarga Marchador; semen.

Introdução

A “indústria” equina necessita e procura avanços envolvendo as biotecnologias da reprodução com intuito de acelerar o melhoramento genético do plantel. A ampla utilização das biotecnologias trouxe, ao longo dos anos, benefícios aos criadores de cavalos de diversas raças e, com isso, a possibilidade de aumentar o número de produtos obtidos por ano de animais de genética superior. Em relação à reprodução equina, várias tecnologias se tornaram difundidas e comuns tais como a inseminação artificial, a transferência de embriões e a manipulação de sêmen (refrigeração e congelamento). Hoje, o Brasil é um dos países que mais realiza transferência de embriões equinos no mundo, sendo a raça Mangalarga Marchador a que faz o maior número delas. Porém, existem alguns entraves para utilização de certas biotécnicas, como por exemplo, a regulamentação proibitiva das associações de raças de cavalo com determinadas tecnologias, o que impossibilita uma maior velocidade no melhoramento genético.

Existem alguns outros pontos que, de certa forma também impedem a difusão plena dessas biotecnologias da reprodução, como por exemplo, os resultados inconstantes e às vezes insatisfatórios que ocorrem em algumas raças. É sabido que dentre as raças equinas existem diferenças relativas às características reprodutivas e quando as biotecnologias da reprodução são utilizadas os resultados se refletem em baixa fertilidade, tanto quando se utiliza sêmen refrigerado quanto congelado.

Alvarenga *et al.* (1996) demonstraram haver um fator racial relacionado à resistência do sêmen ao processo de criopreservação, onde as raças Mangalarga Marchador e Mangalarga Paulista apresentaram os piores índices de congelabilidade, quando comparadas com as raças de hipismo (Hannoveriano, Holstein e Trackenner) e Quarto-de-milha, sendo que estes apresentaram sêmen com bons padrões de motilidade pós-descongelamento.

Medeiros (2007) concluiu que garanhões da raça Mangalarga Marchador apresentaram maior sensibilidade aos crioprotetores evidenciado por uma menor resistência osmótica dos espermatozoides durante o processo de congelamento.

O objetivo deste trabalho foi revisar os pontos críticos relativos à utilização das biotecnologias de sêmen na raça Mangalarga Marchador.

Sêmen congelado

A criopreservação do sêmen equino representa importante instrumento no melhoramento genético da espécie, pela maximização do uso de bons reprodutores. Muitas associações de raças no Brasil aprovaram a utilização de sêmen congelado equino, dentre elas estão as raças Quarto de Milha, Árabe, as raças de salto, o Mangalarga Paulista e Campolina. Este ano, a associação de criadores do cavalo Mangalarga Marchador foi a mais nova raça nacional a aceitar o uso do sêmen congelado de garanhões.

O principal fator limitante para o uso do sêmen criopreservado de garanhões está relacionado com uma grande variação observada entre indivíduos na habilidade dos espermatozoides sobreviverem ao processo de congelamento. Muitos reprodutores apresentam baixa motilidade espermática e integridade celular após descongelamento e, conseqüentemente, índices de fertilidade insatisfatórios, não havendo até o momento técnicas e protocolos ideais disponíveis para criopreservar o material genético da maioria destes animais (Gomes *et al.*, 2002a).

A menor taxa de fertilidade do sêmen congelado, comparada à do sêmen fresco, constitui um dos maiores entraves à plena difusão dessa biotecnologia. Esta redução da taxa de fertilidade verificada após o processo de congelamento e descongelamento está relacionada, principalmente aos danos causados à estrutura e ao funcionamento das membranas dos espermatozoides (Parks & Graham, 1992). Essas injúrias têm sido identificadas por meio de testes *in vitro* que avaliam a integridade e funcionalidade da membrana. O estresse osmótico induzido pelos crioprotetores aos espermatozoides durante o processo de criopreservação é um dos principais fatores que comprometem a viabilidade espermática (Medeiros, 2007).

Para contornar esses problemas, ocorreram avanços na técnica de congelamento de sêmen equino que incluem novas substâncias crioprotetoras (que protegem os espermatozoides do choque térmico), novos diluidores de congelamento, mudanças na técnica propriamente dita, novas metodologias de inseminação artificial.

Dentre as raças equínas, existe uma variabilidade nas taxas de fertilidade dos garanhões. Este fato foi demonstrado por Alvarenga *et al.* (1996), que comprovaram haver um fator racial relacionado à resistência do sêmen ao processo de criopreservação em que as raças Mangalarga Marchador e Mangalarga Paulista apresentaram os piores índices de congelabilidade, quando comparados às raças de hipismo (Hanoveriano, Holstein e Trackenner) e ao Quarto de Milha que apresentaram padrões pós-descongelamento aceitáveis.

Gomes *et al.* (2002a) confirmaram este fato ao congelar o sêmen de 17 garanhões da raça Mangalarga Marchador, utilizando o glicerol e amidas como crioprotetores, observaram que somente dois animais apresentaram motilidade espermática total pós-descongelamento superior a 30% com o glicerol. Ao utilizar as amidas como crioprotetor foi inverso, somente 2 garanhões (10%) não apresentaram características espermáticas satisfatórias depois da descongelamento.

Medeiros (2007) observaram a partir de dados de fertilidade, que existe uma diferença entre indivíduos em relação à resistência osmótica dos espermatozoides frente aos crioprotetores. Esta sensibilidade ficou evidente nos garanhões da raça Mangalarga Marchador principalmente quando foi utilizado o glicerol. Este autor concluiu que as amidas causam menor dano osmótico comparado ao glicerol, principalmente nos garanhões que não aceitam de forma satisfatória o processo de criopreservação.

Gomes *et al.* (2002b) realizaram um estudo com sêmen congelado de 15 garanhões da raça Mangalarga Marchador. Neste estudo comparou-se a qualidade espermática *in vitro* do sêmen congelado em dois diferentes diluidores: INRA-82 (Palmer, 1984) e o MP-50 (Zahn, 2002). Os dados obtidos nesse estudo estão expostos abaixo (Tab. 1).

Tabela 1. Parâmetros espermáticos pós-descongelamento do sêmen de 15 garanhões da raça Mangalarga Marchador em diferentes diluidores (MP-50 x INRA-82).

	MOT. Total	MOT. Progressiva	Integridade celular
MP-50	49%	23,26%	35,3% ^a
INRA-82	21,46%	8,8%	18,93% ^b

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna (p<0,05).

Nesse estudo pode-se observar que todos os garanhões apresentaram motilidade total e integridade de membrana pós-descongelamento (avaliada por sondas fluorescentes) superiores quando utilizado o meio MP-50, demonstrando sua melhor capacidade em proteger a célula espermática dos danos causados pela congelamento. Os autores acreditam que um dos fatores responsáveis por esta melhoria tenha sido a presença do crioprotetor dimetilformamida (DF) na composição do meio MP-50, visto que este demonstrou melhores resultados quando a intenção foi a congelamento de sêmen de garanhões “Bad Freezers”, de acordo com resultados obtidos por Alvarenga *et al.* (2002).

Gomes *et al.* (2003) comparou o índice de recuperação embrionária realizando inseminações com sêmen fresco e sêmen congelado de um garanhão da raça Mangalarga Marchador. O sêmen foi congelado com o diluente FR-4 com 5% de dimetilformamida. (Tab. 2).

Tabela 2. Recuperação embrionária após inseminação com sêmen fresco e sêmen congelado de um mesmo garanhão.

	Nº total de ciclos	Nº lavados Positivos	Nº lavados Negativos	Nº de ovulações	Embriões recuperados
GI (Sêmen congelado)	10	6 (60%)	4 (40%)	11	7 (63,63%) ^a
GII (Sêmen fresco)	16	13 (81,25%)	3 (18,8%)	19	16 (84,21%) ^a

^{a,b} Letras iguais na mesma coluna, não houve diferença estatística.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à recuperação embrionária ao utilizar sêmen congelado com dimetilformamida ou sêmen a fresco (60% x 81,25%, respectivamente), bem como, em relação ao número de embriões por ovulação (63,63% x 84,21%). Pode-se observar que a recuperação embrionária obteve índices semelhantes aos encontrados quando é utilizado sêmen refrigerado e que o crioprotetor dimetilformamida preservou a capacidade fertilizante do sêmen deste garanhão Mangalarga Marchador.

Nas estações de monta de 2007-2008 e 2008-2009 foram realizadas inseminações artificiais com sêmen congelado de diferentes garanhões da Mangalarga Marchador, realizadas no Centro Avançado de Reprodução Animal em Vassouras, RJ. Para congelamento do sêmen foi utilizado o diluidor FR-4[®] acrescido de 5% de dimetilformamida (Garanhão 1) ou metilformamida (Garanhão 2 e 9), e os demais garanhões foram criopreservados com o Botu-Crio[®]. Foram utilizados somente garanhões que apresentaram características seminais pós-descongelamento acima de 50% de motilidade total e as éguas com saúde reprodutiva conhecida. O protocolo base foi somente uma inseminação com dose de 800×10^6 de espermatozoides até 6 horas após a ovulação. As éguas tiveram as ovulações induzidas com o uso de deslorelina e hCG a partir de um folículo pré-ovulatório com o intervalo de 5 horas.

Tabela 3. Éguas inseminadas com sêmen congelado de 9 garanhões da raça Mangalarga Marchador e número de lavados uterinos em que se obteve embrião (lavados positivos) e lavados negativos (não se recuperou embrião).

Garanhão	Nº de ciclos	Nº lavados Positivos	Nº lavados negativos
1	14	9 (64,3%)	5 (35,7%)
2	10	5 (50%)	5 (50%)
3	14	8 (57,1%)	6 (42,9%)
4	24	18 (75%)	6 (25%)
5	10	6 (60%)	4 (40%)
6	12	7 (58,3%)	5 (41,7%)
7	8	4 (50%)	4 (50%)
8	11	5 (45,5%)	6 (54,5%)
9	8	4 (50%)	4 (50%)
TOTAL	111	66 (60%)	45 (40%)

Os resultados demonstrados nas Tab. 2 e 3 demonstram que é viável a utilização de sêmen congelado de garanhões Mangalarga Marchador em sistemas de transferência de embriões.

Existem outros fatores que limitam a utilização do sêmen congelado, dentre eles está o elevado custo da técnica e mão de obra de um veterinário especializado que domine plenamente o processo de congelamento e a fisiologia do cio da égua, já que esta deve ser inseminada o mais próximo da ovulação, fator que influencia diretamente na fertilidade do sêmen descongelado.

Esta variação observada entre o potencial fertilizante dos garanhões, a carência de testes laboratoriais para determinar o poder fertilizante do sêmen criopreservado, a necessidade de se ter um protocolo clássico para o processo de congelamento e uso do mesmo para a inseminação artificial são os principais fatores que impedem o uso do sêmen congelado de garanhões em larga escala pela indústria eqüestre (Samper *et al.*, 2002).

Sêmen refrigerado

A capacidade de preservar a viabilidade do sêmen pela refrigeração oferece muitas vantagens aos criadores de cavalos. A primeira está na possibilidade de coletar e processar o sêmen num local e transportá-lo a diferentes localidades para inseminação de éguas. Com isso, se elimina o custo e o estresse associado ao envio de éguas até o garanhão, além da redução da transmissão de doenças que poderiam afetar a égua recém chegada. Entretanto, para que essa biotecnologia tenha sucesso o sêmen deve ser processado de forma adequada para garantir sua preservação (Jasko, 1994).

A tecnologia de sêmen refrigerado tem sido estudada pelo interesse em conseguir manter o potencial fertilizante do sêmen eqüino durante vários dias. Na verdade, quanto mais tempo o potencial fertilizante do sêmen refrigerado possa ser estendido, mais fácil será uso do sêmen transportado (Batellier *et al.*, 2001).

Entretanto, há uma variação considerável nas taxas de fertilidade do sêmen eqüino transportado. Os

fatores que podem afetar essas taxas incluem: a fertilidade intrínseca do garanhão e da égua, a composição do diluente, a curva de refrigeração e temperatura de armazenamento do sêmen diluído, a dose inseminante (número de espermatozoides móveis), a proximidade da ovulação e o tempo de armazenamento *in vitro* e a quantidade de plasma seminal presente (Jasko *et al.*, 1991). Além disso, à medida que o tempo de armazenamento aumenta, a fertilidade do sêmen diminui (Pickett, 1995). É sabido que a taxa de fertilidade é muito reduzida quando o período de refrigeração é superior a 48 horas (Batellier *et al.*, 2001).

O sucesso da preservação espermática pela refrigeração depende de fatores como: ambiente adequado (diluidores), taxa de refrigeração relativamente lenta e temperatura de manutenção que reduza o metabolismo espermático, minimize os danos à membrana plasmática e não permita a ocorrência prematura do fenômeno de capacitação (Loomis, 1992).

Modificações estruturais do espermatozoide

A refrigeração do sêmen equino é necessária para que haja a diminuição do metabolismo celular para a sua estocagem por períodos de tempo mais longos (12-48 horas). Entretanto, a taxa de refrigeração e a temperatura de estocagem final são consideradas os maiores determinantes da extensão das injúrias celulares relativos à temperatura (Watson *et al.*, 1987).

A exposição do sêmen desprotegido a baixas temperaturas resulta em desarranjos morfológico e bioquímico que tornam os espermatozoides irreversivelmente imóveis e inférteis (Watson, 1981). Durante esse processo os espermatozoides expostos a uma rápida mudança de temperatura sofrem os danos do *cold shock*, ou choque frio (Watson *et al.*, 1987). Esse processo se caracteriza por padrão anormal de movimento espermático, perda rápida de motilidade, danos ao acrossoma e membrana plasmática, redução de metabolismo e perda de componentes intracelulares (Amann e Graham, 1992).

Métodos de preservação do sêmen equino refrigerado

Como em outras espécies de produção, o sucesso da inseminação artificial nos equinos depende da manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen durante o armazenamento (Ijaz e Ducharme, 1995). Obviamente, quanto mais tempo o sêmen equino possa ser estocado mantendo também a fertilidade, maior flexibilidade terá o proprietário do garanhão em coletar e enviar o sêmen, assim como o proprietário da égua para escolher os cruzamentos e sincronizar a inseminação com a ovulação (Pickett, 1992).

O sêmen deve ser diluído com um extensor ou diluidor para manter sua viabilidade durante a refrigeração. Ele fornece nutrientes para o metabolismo, tampões para a manutenção adequada do pH e também protege as membranas do choque pelo frio. O diluidor também é composto de antibióticos que previnem o crescimento bacteriano durante a estocagem do sêmen (Jasko, 1994).

Os esforços para melhorar a conservação do sêmen refrigerado equino se concentram na modificação de diluentes, bem como na adição de componentes específicos com intuito de manter a integridade de membrana, prevenir o estresse oxidativo e preservar a motilidade do espermatozoide (Samper, 2000). Dentro desse objetivo, ao longo dos anos, uma variedade de diluentes com a combinação de diversos componentes (açúcares, eletrólitos, tampões, gema de ovo, leite, antioxidantes e etc.) tem sido desenvolvida para a refrigeração de sêmen.

Em um estudo recente, testou-se a adição de diferentes açúcares ao diluidor no intuito de identificar qual seria a associação mais benéfica ao sêmen equino quando refrigerado por longos períodos. Neste estudo comprovou-se que os açúcares glicose e suas associações com a lactose ou sacarose podem ser utilizados em diluidores à base de leite desnatado em pó, pois são igualmente eficazes na manutenção da qualidade espermática e integridade de membrana plasmática nas amostras refrigeradas a 5°C por até 96 horas (Macedo, 2005).

Neste mesmo estudo foram testados antibióticos nos diluidores à base de leite desnatado e concluiu-se que o antibiótico sulfato de amicacina não apresentou efeitos deletérios sobre as características de movimento espermático no sêmen refrigerado até 96 horas.

Influência da curva de refrigeração e da temperatura de estocagem

A taxa ou curva de refrigeração é um fator crítico na preservação do sêmen equino para transporte e consequente manutenção da sua fertilidade (Pickett, 1992).

A refrigeração rápida pode causar danos irreversíveis aos espermatozoides. Já a refrigeração feita a uma taxa adequada torna possível o armazenamento do sêmen por períodos longos (Pickett, 1992).

Taxas de 0,5°C ou 0,3°C por minuto são piores ($p < 0,05$) que a taxa de 0,05°C por minuto, considerando os dados obtidos ao longo de 96 horas de armazenamento a 5°C (Kayser *et al.*, 1992).

Quanto à temperatura de estocagem do sêmen, de acordo com Squires *et al.* (1999) se a inseminação ocorrer até 12 horas após a colheita, o sêmen pode ser armazenado tanto a 20°C como a 5°C. Para estocagem por

tempo superior a 12 horas, o sêmen deve ser refrigerado lentamente até 5°C. Kayser *et al.* (1992) demonstraram através de análise computadorizada de motilidade que a temperatura de 5°C foi superior à de 20°C após 24 horas de estocagem.

De acordo com Love *et al.* (2002) o DNA do espermatozóide equino desnatura em diferentes taxas dependendo da temperatura de estocagem e da fertilidade do garanhão. Neste estudo, de todos os garanhões (n = 18) avaliados, o sêmen estocado a 5°C em diluente à base de leite mostrou nenhuma alteração na taxa de desnaturação do DNA por 46 horas, entretanto o sêmen estocado a 20°C mostrou taxa moderada de desnaturação e a 37°C mostrou a maior taxa.

Efeito do plasma seminal sobre o sêmen refrigerado

O sêmen é composto de células espermáticas e do plasma seminal que contém substâncias que são benéficas aos espermatozoides. Entretanto, não é o meio ideal para refrigerar e armazenar os espermatozoides. Altas concentrações de plasma seminal são deletérias aos espermatozoides submetidos à refrigeração e armazenamento (Brinsko *et al.*, 2000).

Os efeitos deletérios do plasma seminal podem ser reduzidos colhendo e diluindo somente a fração rica em espermatozoides do ejaculado ou pelo uso de altas diluições (>3:1) de diluente: sêmen com todo o ejaculado. O primeiro método é um tanto trabalhoso, além de reduzir o número total de espermatozoides colhidos num ejaculado. O segundo método é freqüentemente utilizado para refrigeração e transporte de sêmen refrigerado; entretanto alguns garanhões não se beneficiam com esse procedimento, principalmente os oligozoospermicos (Brinsko *et al.*, 2000).

Uma alternativa para reduzir as concentrações de plasma seminal do ejaculado é a centrifugação do sêmen. De acordo com Jasko *et al.* (1992) aproximadamente 5% de plasma seminal são necessários para manter a motilidade do sêmen refrigerado equino. De acordo com Macedo (2005), a centrifugação do sêmen (600g/10 min.) para retirada do plasma seminal só apresentou benefícios quando o período de refrigeração foi superior a 24 horas.

Apesar das técnicas de criopreservação do sêmen equino, tanto a congelamento quanto a refrigeração, serem amplamente difundidas por todo o mundo, ainda são necessários estudos para uma uniformização dos resultados não só *in vitro* quanto *in vivo*. Entretanto, para que isso seja possível, há que considerar as variações raciais que são um ponto fundamental para adequação da técnica e de seus resultados, principalmente daquelas raças que apresentam resultados não satisfatórios na aplicação dessas biotecnologias.

Referências

- Alvarenga MA, Leão KM, Papa FO, Graham JK.** Improvement of stallion sêmen post-thaw motility with the utilization of dimethyl-formamide as cryoprotector. *Theriogenology*, v.57. p.459, 2002. (Abstract; Annual Conference of the International Embryo Society, 2002, Foz do Iguaçu, Brazil).
- Alvarenga MA, Papa FO, Buratini Junior J.** The effect of breed and spermatoc parameters over equine semen freezability. In: Symposium on Stallion Semen, 1996, Amersfoort. *Proceedings...* Amesterfoort, SSS, 1996. p.82. (Abstract).
- Amann DP, Graham JK.** Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.715-745.
- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M.** Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.181-190, 2001.
- Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL.** Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v.54, p.129-136, 2000.
- Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA.** Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative crioprotectants for Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, v.58, p.277-279, 2002a.
- Gomes GM, Macedo LP, Jacob JCF, Papa FO, Alvarenga MA.** Índice de recuperação embrionária com a utilização do crioprotetor dimetilformamida para o congelamento de sêmen de garanhão da raça mangalarga marchador-resultados parciais. *Acta Sci Vet*, v.31, p.400-401, 2003.
- Gomes GM, Papa FO, Jacob JCF, Macedo LP, Leão KM, Machado MS, Alvarenga MA.** Melhoria dos parâmetros espermáticos pós- descongelamento com o meio MP-50 para sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.187-189, 2002b.
- Ijaz A, Ducharme R.** Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C. *Theriogenology*, v.44, p.1039-1050, 1995.
- Jasko DJ.** Procedures for cooling and freezing of equine semen. *ARS Veterinaria*, v.10, p.156-165, 1994.
- Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL.** Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.37, p.1241-1252, 1992.
- Jasko DJ, Moran DM, Farlin ME, Squires EL.** Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal



- motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, v.35, p.1059-1068, 1991.
- Kayser JP, Amann RP, Shideler EL, Jasko DJ, Pickett BW.** Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.601-614, 1992.
- Loomis PR.** Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. *Proc Am Assoc Equine Practit*, v.39, p.629-647, 1992.
- Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD.** Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*, v.57, p.1135-1142, 2002.
- Macedo LP.** *Efeito de diferentes diluentes e antibióticos sobre a longevidade e fertilidade do sêmen equino refrigerado a 5°C.* 2005. 80f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 2005.
- Medeiros ASL.** *Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade do sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores.* 2007 Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 2007.
- Palmer E.** Factors affecting stallion semen survival and fertility. *In: International Congress Animal Reproduction AI, 10, Local. Proceedings ... Local: ICAR, 1984. v.3, p.377. (Abstracts).*
- Parks EJ, Graham JK.** Effects of cryopreservation procederes on sperm membranas. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.
- Pickett BW.** Seminal extenders and cooled semen. *In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). Equine reproduction.* Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.715-745.
- Pickett BW.** The stallion: Retrospective analysis and opinions. *Biol Reprod Mono*, n.1, p.547-564, 1995.
- Samper JC.** *Artificial insemination.* Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p.109-131.
- SamperJC, Vidament M, KatilaT, NewcombeJ, Estrada A, Sargeant J.** Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi-center study. *Theriogenology*, v.58, p.647-650, 2002.
- Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE.** *Cooled and frozen stallion semen.* Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, 1999. (Bulletin, 9).
- Watson PF.** The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil*, v.62, p.483-492, 1981.
- Watson PE, Plummer JM, Allen WE.** Quantitative assessment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions. *J Reprod Fertil Suppl*, v.35, p.651-653, 1987.
- Zahn FS.** *Efeito da incorporação de colesterol na membrana plasmática de espermatozoides sobre os parâmetros espermáticos e índice de fertilidade do sêmen congelado na espécie equina.* 2002. 110f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2002.
-