

**JOSÉ VICTOR DE OLIVEIRA**

**CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE EQÜÍDEOS E SEU USO:  
LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS**

Monografia apresentada à Disciplina de Seminários I, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

**Docentes responsáveis: Prof. Dr. SONY DIMAS BICUDO  
Prof. Dra. MARIA DENISE  
LOPES**

DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**BOTUCATU - 2002**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	3
INTRODUÇÃO	4
REVISÃO DA LITERATURA	6
Princípios da criopreservação	6
Taxa de congelamento e descongelamento	9
Crioprotetores	10
Penetrantes	10
Não Penetrantes	11
Aditivos	11
Principais diluentes utilizados para jumentos	11
Aprimoramento da IA para a espécie	13
Dose inseminante	13
Local de deposição do sêmen	14
Uso hormonal	16
Considerações finais	16
Referências Bibliográficas	18

## **ABREVIATURAS UTILIZADAS**

**Espermatozoides – sptz**

**Inseminação Artificial – IA**

**Jumento Poitou – JP**

**Jumento Marchador Brasileiro – JMB**

**Nitrogênio – N<sub>2</sub>**

**Membrana Plasmática – MP**

**Glicerol – GLI**

**Glutamina – GLU**

**Gema de Ovos - GO**

**Gema de Ovos de Galinha – GOG**

**Gema de Ovos de Codorna – GOC**

**Basal Medium Eagle – BME**

**Junção Útero Tubárica – JUT**

**Prostaglandina E2 - PGE<sub>2</sub>**

## **Introdução:**

Apesar dos resultados envolvendo a congelação de espermatozóides (sptz) eqüinos ter sido divulgado por Barker e Gandier (1957), apud Squires et al (1999), as pesquisas nessa espécie se intensificaram mais tardiamente, provavelmente devido a relutância da maioria das Associações de Criadores em aceitar o uso de sêmen manipulado, fato hoje parcialmente revertido, conforme relatam Squires et al., (1998).

Os estudos sobre o tema, em eqüinos, são vastos (Papa e Alvarenga, 1984; Neves Neto et al, 1995; Papa et al, 1998; Alvarenga, 1998; Trimeche et al., 1999).; todavia os problemas persistem, embora não sejam exclusivos desta espécie (Holt, 2000). Por este motivo, vários centros de pesquisa no mundo todo, procuram uma metodologia para saná-los; conseqüentemente, é compreensível o fato de não haver uma universalmente aceita para esta espécie, como a existente para bovinos, segundo Samper e Morris, (1998).

A indústria eqüina vê nesta busca, a perspectiva de empregar as tecnologias geradas, para maximizar o uso de garanhões, derrubar barreiras geográficas, eliminar ou diminuir a propagação de doenças sexualmente transmissíveis e possibilitar o uso de animais já mortos (Squires et al 1998).

Uma outra finalidade desta tecnologia, é a preservação de material genético por um inesgotável período de tempo, propiciando a formação de um banco de germoplasma, conhecido como preservação “ex situ”. (Mariante e Cavalcanti, 2000).

Segundo Dos Santos (1994), o produto proveniente do cruzamento entre jumento e égua, é bastante desejável no meio rural, pois reúne as melhores características dessas espécies em um único animal (mula ou burro). Mesmo sendo geneticamente próximas, há dificuldades em se obter o muar em monta a campo, pois existe uma aversão mútua, decorrente de características sociais e reprodutivas distintas, o que pode ser contornado com o uso da Inseminação Artificial (IA).

Algumas raças de asininos, devido a seu abate indiscriminado e mesmo a pouca atenção recebida em relação a atividade reprodutiva, estão hoje sob risco de extinção. Como exemplo temos o “Jumento Poitou” (JP), com 180 exemplares no

mundo e o “Jumento Marchador Brasileiro” (JMB) com, aproximadamente, 80 cabeças (Philippe M.A., 1994 appud Trimeche et al. 1998; Mariante e Cavalcanti, 2000).

Os poucos trabalhos encontrados, nessa espécie, não fazem uso do teste de fertilidade (Polge e Minotakis, 1964; Dos Santos, 1994; ARRUDA et al., 1989; Silva, et al., 1997), ou utilizaram éguas (Papa et al., 1999) ou não foi possível sua repetição em nossas condições (Trimeche, A. et al., 1998), necessitando serem aclarados.

Portanto, o objetivo desta monografia, é discutir a: criopreservação das células espermáticas; taxa de congelamento e descongelamento; crioprotetores; aditivos; diluentes utilizados para jumentos e aprimoramento da IA para a espécie, comentando perspectivas de aperfeiçoamento para elevar os atuais índices de fertilidade.

## REVISÃO DA LITERATURA:

### a) Princípios da criopreservação :

A congelação de sêmen de eqüinos varia individualmente e é um dos fatores mais importantes na determinação da taxa de prenhez de éguas, quando este sêmen é utilizado (Samper, 1998). Embora a maior parte da literatura enfoque a criopreservação das células espermáticas somente durante este processo, os sptz são passíveis de lesões físicas e/ou estruturais antes, durante e após a criopreservação, que estão sumarizadas na Fig. 1.

Causas	Conseqüências
Coleta de sêmen e diluição	Proteínas seminais são adicionadas ao sptz, estimulam a motilidade
Centrifugação	Viabilidade espermática depende das condições de centrifugação
Adição de leite, gema de ovo e glicerol (GLI)	Estresse osmótico passageiro; células rapidamente desidratam e então lentamente retomam o volume normal enquanto GLI se interioriza na célula
Refrigeração a 5° C	Ocorrem mudanças nas membranas que podem resultar em choque térmico e/ou danos de refrigeração às membranas
Congelação celular (remoção de água do sistema em forma de gelo)	Mudanças osmóticas (perda de água) causa desidratação celular e podem resultar em danos osmóticos; redução na temperatura pode causar danos de refrigeração, formação de cristais de gelo e danos à célula
Estocagem em Nitrogênio (N <sub>2</sub> ) líquido	Células devem permanecer nos canais não congelados
Descongelação (retorno da água a sua forma líquida)	Mudanças osmóticas (“adição de água”) restaura o volume celular, danos de recristalização, danos osmóticos
Remoção do GLI (retirada do GLI antes da IA ou só IA)	Desequilíbrio passageiro de osmolaridade, célula rapidamente aumenta seu tamanho e então vagarosamente retorna ao volume original conforme o GLI deixa a célula, pode ser muito lesivo

**Figura 1 : Principais causas e conseqüências das injúrias antes, durante e após a criopreservação nas células espermáticas.** (Adaptado de Graham, 1996)

Muito embora os sptz sejam uma célula simples (sem retículo endoplasmático, lisossomas, e boa parte de seu citoplasma), o restante é ainda muito complexo,

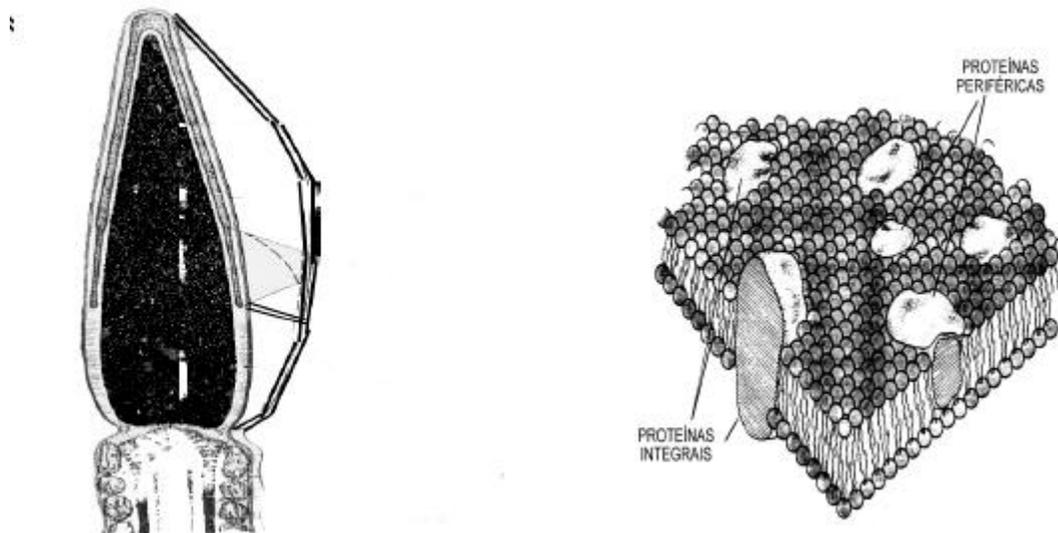
possuindo múltiplos compartimentos celulares, membranas e estruturas subcelulares. Um outro detalhe de particular interesse para os criobiologistas, é o fato que o DNA destas células está condensado a ponto de impedir que seus genes se expressem, impossibilitando-a de realizar um auto-reparo a qualquer dano sofrido (Graham, 1998).

Para serem ainda férteis, os sptz deverão ultrapassar todas estas dificuldades impostas, preservando as seguintes características que estão destacadas na Fig. 2.

Morfologia aceitável
Metabolismo para produção de energia
Motilidade progressiva
Membranas plasmáticas e acrossomal estabilizadas
Presença de enzimas para fertilização

**Figura 2 – Características e atributos do sptz para fertilização** (Adaptado de Squires et al., 1999)

A célula espermática é revestida mais externamente pela membrana plasmática (MP) (Fig. 3). A MP é composta de uma camada bimolecular de lipídios (fosfolipídeos, glicolipídios e colesterol), e proteínas (Fig. 4). É metabolicamente ativa e devido a sua composição é impermeável a maioria das moléculas. Tem um importante papel de isolar a célula do meio exterior e media reações com o meio que a cerca, controlando o fluxo de água e eletrólitos (Cooper, 1996)



### **Figura 3 e 4 – AMMAN e GRAHAM (1993)**

A integridade estrutural da MP é determinada pela temperatura e pela solução na qual ela está banhada; na temperatura corporal a membrana está fluída. Essa característica é decorrente da ampla mobilidade lateral dos fosfolipídeos, porém não possuem a mesma facilidade de se movimentar entre as faces externa e interna (Amman et al, 1993; Cooper, 1996; Graham, 1998).

Para a realização da criopreservação é imposto aos sptz, entre 19 °C e 5°C, o primeiro estresse térmico. Nesta faixa de temperatura a MP passa por uma fase de transição, do estado líquido cristalino para o de gel, podendo ocorrer perda de movimentos progressivos, alterações nas membranas plasmática e acrossomal, sendo o primeiro desafio para estas células (Watson, 1995).

Quando a temperatura do meio atinge entre  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $-10^{\circ}\text{C}$ , cristais de gelo se formam, a partir da água pura no meio extracelular, porém protegido pela MP o meio intra-celular não se congela, (super refrigerado). Segundo Mazur (1984), o ponto de congelação de uma solução é determinado pela concentração de solutos que ela participa. Em decorrência, a água do interior da célula flui por osmose para o meio externo e também se congela. Os outros elementos do meio extracelular (sais, proteínas, gorduras), permanecem na porção não congelada (Amman et al, 1993; Holt, 2000). Com a temperatura diminuindo, mais moléculas de água se cristalizam, resultando em uma concentração maior de solutos na fração não congelada, que formarão os “canais não congelados” (Fig. 5). O volume destes canais é importante, pois somente as células que estiverem neles irão sobreviver a criopreservação (Aman e Pickett, 1987).

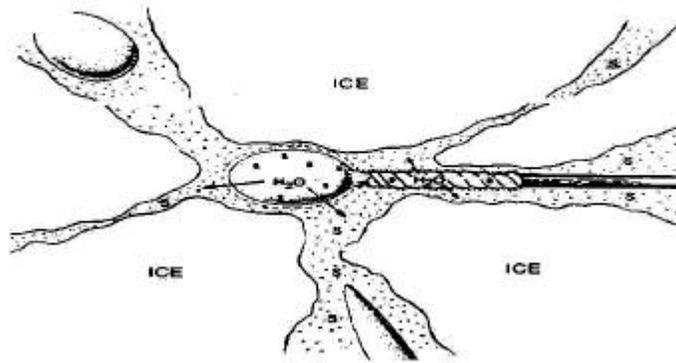
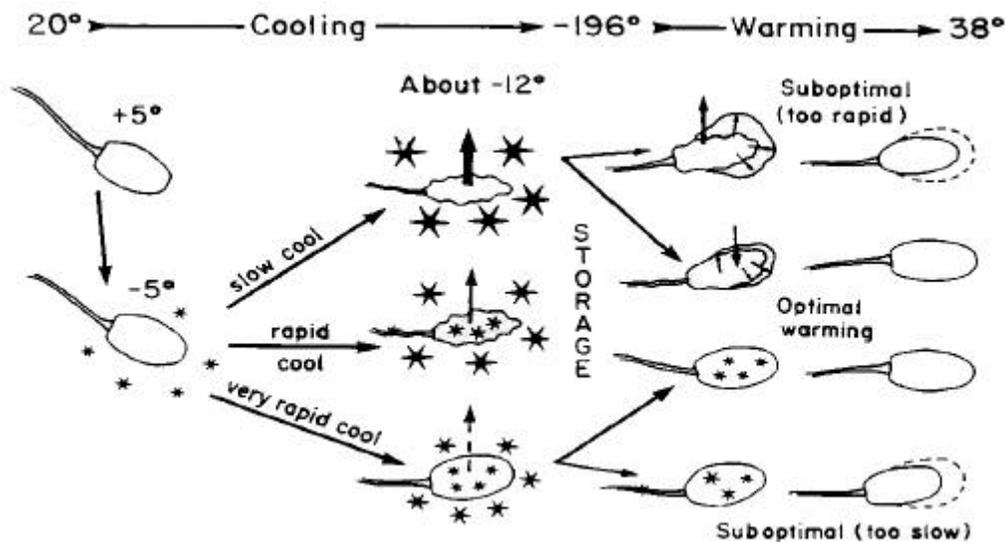


Figura 5 – Canais não congelados (Squires et al. 2000)

### **b) Taxa de congelamento e descongelamento**

A taxa de congelamento também pode causar lesões nas células. Segundo Mazur (1990); caso a célula sofra uma queda de temperatura muito rápida, que não permita a sua desidratação, ocorrerá a congelação intracelular (macrocrístais), lesando seu interior. Se essa congelação for muito lenta, estas células poderão se desidratar em decorrência do meio exterior muito concentrado, não formando grandes cristais intracelular, mas desencadeando um desarranjo morfofuncional pela desidratação intracelular exagerada.

Da mesma forma o descongelamento poderá causar sérios inconvenientes que deixarão esta célula com sua sobrevivência e/ou funcionamento comprometidos. Squires et al. (2000), indica que a taxa de descongelamento deve ser o mesmo que a da congelação (lenta/lenta ou rápida/rápida). Figura 6.



**Figura 6 – Taxas de congelação e descongelação** (Squires et al. 2000)

### c) Crioprotetores:

A procura por substâncias com propriedades crioprotetoras tem sido motivo de pesquisa de vários criobiologistas. Essa busca tem sido impulsionada pelo fato de somente uma parte dos ganhões apresentam sêmen com uma boa resposta à congelação, com os meios utilizados, conforme atestam Arruda et al. (1989) e Alvarenga et al. (2000). Ao longo de vários anos uma gama de substâncias tem sido utilizadas para fornecer proteção adequada as células espermáticas durante a criopreservação.

Observando a literatura existe uma divisão básica que agrega os crioprotetores em penetrantes e não penetrantes (Keith, 1998)

#### c-1) Penetrantes

São substâncias que atuam tanto no meio intra como extracelular. Sendo os mais comumente utilizados Glicerol (GLI), etilenoglicol, DMSO e amidas (Keith, 1998)

Seu mecanismo de ação não está bem compreendido. Watson, (1979) appud Keith, (1998), sugere que estas substâncias atuem através de propriedade coligativa com a água. Uma propriedade coligativa é a depressão do ponto de congelamento de uma solução. Em uma solução que contenha GLI, disporá de mais água não

congelada do que outra sem o GLI, aumentando o volume dos canais de solventes não congelados, reduzindo a concentração de sais das porções não congeladas. Portanto atuam tanto como solvente como soluto.

### **c-2) Não penetrantes**

Incluem-se nesta categoria os açúcares (lactose, frutose, rafinose ou threalose), polímeros sintéticos (metil celulose). Esta categoria protege as células basicamente através de efeitos osmóticos. As células em suspensão em um meio hipertônico perdem seu conteúdo de água. Desta forma diminuem a possibilidade de formação de cristais dentro da célula. Estes componentes agem como solutos ou colóides, não servindo como solventes (Graham, 1996).

### **c-3) Aditivos**

Para evitar danos celulares na fase de resfriamento, prevenção do choque térmico, os diluidores utilizados para criopreservação do sêmen equino possuem lipídios ou moléculas lipofílicas, presentes na gema de ovo (GO) e/ou leite desnatado. Sua função se deve a ação de moléculas de baixa densidade, em particular os fosfolipídeos, que atuam estabilizando a MP da célula do sptz, embora não se tenha detectado interação entre estes fosfolipídeos e membranas do sptz. Outro elemento incorporado é o etilendiaminotetracético (EDTA), que pode se ligar ao cálcio e magnésio, reduzindo a sua entrada na célula, visto que o seu excesso provoca lesões celulares, durante o resfriamento (Arruda, 2000). O OEP (orvus-Espaste), um agente emulsificante, reforça a proteção dos fosfolipídeos (Martin et al., 1979).

### **d) Principais diluentes utilizados para jumentos:**

Os meios diluentes para congelação, utilizados com sucesso com jumento, são o T2-94 (Trimeche, et al., 1998) e o M9 (Papa et al., 1999).

Trimeche et al. (1996), testaram concentrações de glutamina (GLU) em meio INRA 82, e através da análise computadorizada do sêmen, determinaram que a melhor concentração de GLU foi 80 mM. Salientaram que a associação da GLU e

GLI foi necessário para um melhor resultado, indicando que possuem mecanismos de criopreservação diferentes.

Ao compararem as gemas dos ovos de galinha (GOG) e codorna (GOC), Trimeche et al. (1997), encontraram que a composição geral era igual, embora a GOC possuía significativamente mais phosphatidylcholina, menos phosphatidylethanolamine e uma menor taxa de ácidos polinsaturados : saturados, que a GOG. Utilizaram a GOC ou de GOG, no meio INRA 82, processaram o sêmen de JP para congelamento, acompanhada da análise computadorizada do sêmen. Os resultados foram superiores para o sêmen proveniente do meio com GOC. Os autores creditam este fato as características da GOC.

O GLI é um importante crioprotetor e muito utilizado na congelação do sêmen de eqüino, (Martim et al., 1979; Papa et al., 1999). Porém ao lado da sua função que atenua as lesões celulares na congelação, são também conhecidos seus efeitos tóxicos (Squires, 1999).

Alguns pesquisadores tem chamado a atenção para a remoção do glicerol após a descongelação. Ball (2001), estudou a retirada do GLI do sptz de equinos, em uma ou várias etapas. O autor analisou a motilidade e a integridade das membranas e encontrou que quando o sptz era abruptamente retornado em meio isotônico (1 passo), houve redução ( $P < 0,01$ ) da percentagem de vivos e acrossoma íntegro, quando comparado as células com várias passagens (7). Salienta o autor que a rápida retirada do GLI em meio isosmótico parece ser o aspecto mais nocivo do estresse osmótico. Vidament et al. (2001), fizeram a retirada do GLI através de 1 ou vários passos (diluições fixas) e não encontrou diferença significativa, 38% X 36% respectivamente, entre os métodos estudados, para a característica motilidade em sêmen congelado.

Na única literatura encontrada sobre uso de sêmen de jumento congelado em jumentas da raça Poitou, Trimeche et al (1998), relataram sucesso. O protocolo utilizado pelos autores destaca: 1- congelação do sêmen através de palhetas 0,5 de ml e concentração de  $60 \times 10^6$ ; 2- após a descongelação o sêmen foi processado de duas formas distintas: com ou sem a retirada do GLI (com o auxílio do T2-94, sem GLI (v/v)); 3- inseminações sucessivas a partir de um folículo de 30 mm, dose

inseminante de  $600 \times 10^6$  até a ovulação. No decorrer de 4 ciclos, os resultados obtidos foram:

Animais	Glicerol	Dose inseminante	Volume (ml)	Gestantes
17	Com	$600 \times 10^6$	10	0
21	Sem	$600 \times 10^6$	20	8

Em publicação também pioneira e única Papa et al. (1999), relataram 2 gestações (66%) em éguas com uso de sêmen de jumento congelado em M9H composto a base de Merk-gema (Martin et al., 1979), adicionado de meio a base de leite desnatado e glicose (Kenney et al., 1975 appud Papa et al. 1999) e acrescido de Basal Medium Eagle (BME).

## **e) Aprimoramento da IA para a espécie**

### **e-1) DOSE INSEMINANTE**

O número de células espermáticas por dose inseminante, em eqüinos, é controverso. Samper, et al. (1998), em um levantamento realizado em 25 laboratórios do mundo, verificaram valores variando de 250 a  $700 \times 10^6$  de células por dose. Dellaqu'Aqua (2000), utilizando doses inseminantes de 50, 100, 300 e  $800 \times 10^6$ , não obteve diferenças significativas para taxa de prenhez em éguas. Trimeche et al. (1998), utilizaram sêmen congelado de jumento com  $600 \times 10^6$  em jumentas Poitou, e alcançaram taxa de gestação da ordem de 38%. Papa et al. (1999), trabalhando com sêmen de jumentos na dose de  $800 \times 10^6$ , obtiveram 66% de éguas gestantes .

Para verificar o efeito da dose e do diluente, Burns et al (2000), utilizaram o extensor sem sptz e sêmen criopreservado nas doses de  $150 \times 10^6$ ,  $700 \times 10^6$  e  $1,2 \times 10^9$ , em éguas reprodutivamente normais, avaliaram através da ultra-sonografia o grau e característica do fluído acumulado nos seguintes momentos: quando da

aplicação do hCG; na IA e 14 horas após IA. Encontraram fluido uterino às 14 horas pós IA, em 3 animais: 1 que recebeu dose espermáticas de  $150 \times 10^9$ , outra do grupo inseminado com  $1,2 \times 10^9$  e em uma das que recebeu somente o diluente. Concluíram que em éguas reprodutivamente normais, a elevação da concentração da dose inseminante não causou reação uterina perceptível pelo ultra-som.

## **e-2) Local de deposição do sêmen**

Os estudos da distribuição do sêmen quando depositado no trato genital feminino, poderão auxiliar a técnica da IA em jumentas da raça Brasileira. Nesta linha de pesquisa, Katila, et al. (2000), encontraram que entre 8 a 20 minutos pós IA de  $2,0$  a  $2,5 \times 10^9$ , as células espermáticas já haviam migrado para o ápice dos cornos uterinos.

Fêo (1994), na primeira fase do seu experimento, utilizando éguas de matadouro, inseminou-as no corpo e corno uterino do lado homólogo ao folículo dominante, 1 a 2 horas antes do seu sacrifício. Recolheu as peças (trompas, cornos e cerviz) e após lavagem com ringer lactato, contou os sptz recuperados de cada segmento e verificou que a IA intracornual propiciou um número significativamente maior de sptz no corno uterino correspondente, quando comparado à IA no corpo do útero. Embora os valores celulares encontrados nas trompas não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos, houve uma tendência a ser maior no lado da IA quando comparado a aplicação do sêmen no corno uterino. Na fase de campo, utilizando os dois métodos, foram inseminadas 73 fêmeas. Com expressiva vantagem ( $p < 0,0001$ ), para as gestações obtidas através da IA intracornual, 66% (48/32), em oposição a no corpo uterino 32% (25/8).

Nie et al. (2000), utilizaram trinta éguas divididas em dois grupos: G1- Inseminação com  $1 \times 10^6$  de sptz móveis; G2- Inseminação com  $1 \times 10^6$  de sptz móveis selecionados pelo sephadex. As doses foram aplicadas no ápice do corno uterino (JUT) ipsilateral ao folículo dominante, com uma pipeta flexível. As taxas de fertilização foram respectivamente para o G1 e G2 de 18,8% e 7,1%, sem diferença

estatística. Os autores acreditam que o uso da dose inseminante mais concentrada, depositada na JUT, poderá tornar mais eficiente o uso do garanhão, do que a dose de  $500 \times 10^6$  de células viáveis, quando depositado no corpo uterino.

Woods et al. (2000), ao utilizarem  $25 \times 10^6$  de spz, no corno e no corpo uterino não encontraram diferenças significativas, entre as técnicas, para os valores de gestação.

A técnica de IA intracornual ganha relevância, para uso em asininos quando Papa (2002)<sup>1</sup>, relataram refluxo, após a IA no corpo do útero, ao utilizarem na jumenta da raça Brasileira o volume sugerido por Trimeche (1998), 20 ml. O autor justificou o fato devido às diferenças zoomorfológicas, entre as raças, que são resumidas nas Fig. 7.

CARACTERÍSTICAS	RAÇAS	
	BRASILEIRO	POITOU
Peso (Kg)	240 – 350	260 – 600
Altura (m)	1,15 - 1,30	1,32 – 1,53

**Figura 7 – Características de peso e altura de animais das raças Brasileiro e o Poitou (Adaptado de Chieffi, 1947)**

Por não dispor dos diâmetros dos cornos uterinos de jumentas da raça Poitou, a comparação foi realizada entre jumentas Brasileira e potras da raça Brasileira de Hipismo, com 2 anos, que apresentavam valores corporais próximos aos da raça Poitou, (Fig. 8).

Características	Éguas n=15	Jumentas n=15
Peso (Kg)	486	304
Altura (m)	1,58	1,28
Diâmetro médio do corno uterino (mm)	34	22,6

**Figura 8 – Valores médios dos diâmetros dos cornos uterinos entre jumentas da raça Brasileira e potras Brasileira de Hipismo.**

Baseado nos valores apresentados, Papa (2002)<sup>1</sup> propõe que o uso da IA intracornual ipsilateral ao folículo dominante, é mais apropriado ao uso de um volume maior de sêmen sem refluxo, o que concorrerá para uma maior possibilidade de colonização da JUT.

### **e-3) Uso hormonal**

O papel seletivo da junção útero tubárica (JUT) sobre as estruturas embrionárias de eqüinos é amplamente aceito. Anatomicamente, esta região é privilegiada por possuir uma forte camada muscular que age como um esfíncter (Weber e Wods, 1993). A ação miorelaxante da Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), na trompa da égua, foi estudada por Weber (1995).

Robinson, (2000), gotejou na trompa uterina, por laparoscopia, 0,25 mg de PGE<sub>2</sub> ou solução salina no dia 4 pós ovulação. As coletas realizadas no dia 5 encontraram estruturas (embriões e oócitos não fertilizados) nos animais tratados com PGE<sub>2</sub>, enquanto que no grupo controle foram recuperados somente embriões nos dias 7 e 8 pós ovulação.

Ao estudarem o efeito da PGE<sub>2</sub>, na fertilidade de éguas saudáveis, Woods et al (2000), depositaram com o auxílio de uma pipeta, no ápice do corno ipsilateral ao folículo pré-ovulatório 2 horas antes da IA, 0,2 mg de PGE<sub>2</sub> e inseminaram no corpo e/ou corno uterino do mesmo lado da instilação de PGE<sub>2</sub>, sêmen de garanhões com histórico de alta ou baixa fertilidade. Os resultados mostraram que a PGE<sub>2</sub>, aumentou a taxa de fertilidade, somente para garanhões de boa fertilidade, independente do local da inseminação.

### **f) Considerações finais**

Como visto a despeito do tempo de utilização de sêmen congelado em eqüídeos, os relatos dos resultados a campo obtidos com asininos são muito reduzidos e inconsistentes. A metodologia empregada em cavalos, aparentemente

não pode ser somente copiada para a espécie asinina. Há uma lacuna de conhecimentos para a espécie a ser preenchida com pesquisas nas áreas:

- Estudo sobre a preservação da membrana espermática
- Avaliação de formulações de crioprotetores alternativos
- Curvas de congelamento
- Desglicerolização antes da IA
- Determinação da dose inseminante
- Local da Inseminação
- Uso de hormônios ( $PGE_2$ )

Assim estudos nas áreas acima assinaladas permitirão que as dificuldades hoje impostas possam ser ultrapassadas e conseqüentemente os resultados com sêmen congelado possam ser mais favoráveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M.A.; LANDIM e ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M.; Utilization of ethylene glycol as cryoprotector for equine semen. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, Baltimore, Maryland, 1998. **Proceedings**. Baltimore: Society for Theriogenology, 1998. p. 155.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, 32, (6) p. 541-45, 2000.

AMMAN, R.P.; GRAHAM, Spermatozoal function. In: McKinnon, A.O.; VOSS, J.L.. (Eds.). **Equine Reproduction**. Philadelphia, London: Lea & Febiger, 1993. p.715-45.

AMMAN, R.P.; PICKETT, B.W.. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.7, p.145-73, 1987.

ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; BARBOSA, R.T.; MANZANO, A. Características seminais de eqüídeos destinados a seleção para a congelação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, p. 214, 1989.

ARRUDA, A.P.; VIEIRA, R.C.; BARBOSA, R.T.. Congelação do sêmen de jumentos: características reprodutivas de um doador. **Revista Brasileira Reprodução Animal Suppl.**, ; 1: 215-1, 1989.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo, 2000. 113p. Dissertação (Livre docência)- Faculdade Veterinária – USP.

BALL, B.A. Osmotic effects of glicerol addition and removal on equine sperm. EQUINE NUTRITION AND PHYSIOLOGY SYMPOSIUM. **Proceedings**. Kentucky. 2001, p. 325-28.

BURNS, T.E.; PIERSON, R.; CARD, C.E. Subjective and quantitative ultrasonographic assesment of endometrial changes in mares inseminated with cryopreserved semen. ANNUAL CONFERENCE THE AMERICAN COLLEGE OF THERIOGENOLOGISTS, 2000, **Proceedings**. Society for theriogenology. 2000, p. 175.

COOPER, G.M. **The cell: a molecular approach**. 1 ed., ASN Press: Washington, 1996, 673p.

DELL'AQUA Jr., J.A.; **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado eqüino.** Botucatu, 2000. 81 p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade Veterinária – UNESP.

DOS SANTOS, G. F.. **Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre as características físicas e morfológicas dos espermatozoides de jumentos (*Equus asinus*), preservados a 5°C.** Belo Horizonte. 1994. 82p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária - UFMG.

FEO, J.C.S.A. **Inseminação artificial equina: Dstribuição espermática no trato Genital. Estud comparativo entre deposição de sêmen no corpo e no corno uterino ipsilateral ao folículo ovulatório.** Botucatu, 1991. 28 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – UNESP.

GRAHAM, J. K. Response of spermatozoa to freezing. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1996, **Proceedings.** Society for Theriogenology, 1996. p.83-95.

GRAHAM, J. K. Sperm physiology: Response to freezing & analisis of sperm function. ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1996, **Proceedings.** Society for Theriogenology, 1998. p.54-9

HOLT, W.V.. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, 47-58, 2000.

KATILA, T.; SANKARI, S.; MÄKELA, O. Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares. **Journal Reproduction and Fertility.** Suppl. 56, p. 571-78, 2000.

KEITH, S.L. **Evaluation of new cryoprtectants for the preservation of equine spermatozoa.** 1998. P.116. Dissertação (Doutorado) – Colorado State University.

MARIANTE, A. S.; CAVALCANTI, N.; **Animais do descobrimento.** 1º ed. Ministério da Agricultura e Abastecimento, EMBRAPA. Brasília, 2000. 228p.

MARTIN, J.C.; KLUG,E.; GÜNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal Reproduction Fertility**, Suppl v.27, p.47-51,1979.

MAZUR, P. Freezing of living cells. Mechanisms and applications. **American Journal Phisiology**, v.247, p. 125-42, 1984.

MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophysical.** v.17, p.53-92.1990.

NEVES NETO, J.R.; MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P.. Fertilidade do sêmen congelado eqüino em etilenoglicol e glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11.,1995, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte: 1995. p.292.

NIE, G.J.; JOHNSON K.E. Pregnancy rate in mares following insemination with a low-dose of progressively motile or filtered sperm cells deep in the uterine horn. ANNUAL CONFERENCE THE AMERICAN COLLEGE OF THERIOGENOLOGISTS, 2000, **Proceedings**. Society for theriogenology. 2000, p. 303.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A . Influência de diferentes substâncias como pós-diluentes sobre a motilidade de sêmen congelado de eqüino em teste de resistência térmica a 38°C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 29, 1984, **Anais**. Belém, 1984. p.66.

PAPA, F.O.; NEVES, NETO, J.R.; FERREIRA, J.C.P.; ALVARENGA,M.A.; LEME,D.P.. A comparative study between the freezability and fertility of stallion semen using diferent extenders. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore, Maryland. **Proceedings**. Baltimore: Society for Theriogenology, 1998. p.155.

PAPA, F.O.; MEIRA, C.; SIMON, J.J.; FERREIRA, J.C.P.; DELL'AQUA Jr., J.A.; LEME, D.P.. Pregnancies in mares using donkey (equus asinus) frozen semen. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.27, p.262, 1999.

POLGE, C.; MINOTAKIS, C. Deep-freezing of jackass and stallion semen. In: V° CONGRESSO INTERNAZIONALE PER LA RIPRODUZIONE ANIMALE E LA FECUNDAZIONE ARTIFICIALE, Trento, Italia. 1964.

ROBINSON, S.J.; NEAL, H.; ALLEN, W.R. Modulation of oviductal transport in mares by local application of prostaglandin E<sub>2</sub> . **Journal Reproduction and Fertility**, Suppl. 56, p. 587-92, 2000.

SAMPER, J, C. and MORRIS C. A.. Current methods for a stallion semen cryopreservation: A survey. **Theriogenology**, v.49, 895-03, 1998.

SILVA, S.S.; HENRY, M.; NUNES, S.A., MELLO, S.L.V.. Influência do sistema de envasamento sobre a qualidade espermática de jumentos (Equus asinus) avaliada "in-vitro" pós-descongelção. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v.21,(3), p.140-146. 1997.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWAL, D.K.; McCUE P.M. and BRUEMMER, J.E.. **Cooled and frozen stallion semen**, Bulletin nº 9, Fort Collins, Colorado University. 1999.

TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P.; GANDEMER, G.; TAINTURIER, D. Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for freeze preservation of Poitou jackass sperm. **Cryobiology**. 34, 385-93, 1997.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D.. A procedure for poitou jackass sperm criopreservation. **Theriogenology**, v.50, p.793-06, 1998.

TRIMECHE, A.; YVON, J.M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M.. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, p.181-93, 1999.

VIDAMENT, M.; YVON, J.M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; INGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTRON, S.; LE TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. **Animal Reproduction Science** 68 p. 201–218, 2001.

WATSON, P.F. The preservation of semen in mamals. In: FINN,C.A. **Oxford reviews of reproductive biology**. New York: Oxford Univ Press. v. 1. 1979, p. 283-330.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the criopreservation of spermatozoa and the assesment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility Development**, v.7, p.871-91,1995.

WEBER, J.A.; WOODS, G.L. Influence of embryonic secretory chemicals on seletive oviductal transport in mares. **Equine Veterinary Journal**. Suppl. 15, p. 36-8, 1993.

WEBER, J.A.; WOODS, G.L. Relaxatory effect of prostaglandin E<sub>2</sub> on circular smooth muscle isolated from the equine ovidutal isthmus. **Biology of Reproduction Monograph Series**. 1, p. 125-30, 1995.

WOODS, J.; RIGBY, S.; BRINSKO, S.; STEPHENS, R.; VARNER, D.; BLANCHARD, T. Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E<sub>2</sub> prior to insemination of mares in the uterine horn or body. **Theriogenology**, v. 53, p. 1827-36, 2000.