

SOBREVIDA DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS EQUINAS CRIOPRESERVADAS APÓS DESCONGELAÇÃO E DILUIÇÃO UTILIZANDO-SE DOIS DILUENTES COMERCIAIS

MARINA FERREIRA ZIMMERMANN,¹ ADALBERTO FARINASSO,² CELY MARINI MELO,³ FREDERICO OZANAM
PAPA⁴ E JAIRO PEREIRA NEVES⁵

1. Mestranda em Ciências Agrárias, UnB. E-mail: mfzbsb@yahoo.com.br

2. Laboratório Unicórnio de Reprodução Equina

3. Doutoranda, Unesp/Botucatu

4. Professor adjunto da área de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Campus Botucatu

5. Professor adjunto de Reprodução Animal da FAV/ UnB

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar parâmetros de motilidade e viabilidade *in vitro* na diluição do crioprotetor dimetil-formamida a 5% pós-descongelamento para concentrações de 2,5% e 1,25%, mediante utilização de dois diluentes comerciais adicionados junto ao sêmen. Após a descongelamento, as amostras foram diluídas com a finalidade de manter as concentrações finais (2,5% e 1,25%) de crioprotetor, utilizando-se dois diluentes comerciais (FR4[®] e Botu-Crio[®]) em dois tempos: inicial (Ti) e final (Tf).

Empregaram-se quinze amostras de ejaculados distintos de cinco garanhões de raças nacionais. Os parâmetros de motilidade foram observados através da análise computadorizada e os de integridade de membrana plasmática pela microscopia de epifluorescência. Verificou-se melhora nos parâmetros de motilidade total e progressiva dos espermatozoides, no tempo final ($P < 0,05$) com o diluente Botu-Crio[®] em relação ao FR4[®]. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos quanto à integridade de membrana plasmática.

PALAVRAS-CHAVES: Crioprotetor, congelamento, descongelamento, diluente, equino.

ABSTRACT

EQUINE FROZEN SPERMATIC CELL SURVIVOR AFTER THAWED AND DILUTION USING TWO DIFFERENT COMMERCIAL EXTENDERS

The purpose of this study was to evaluate the motility and viability of stallion semen cryopreserved with 5% dimethyl-formamide as cryoprotectant and posterior dilution to 2.5 and 1.25% as final concentration of cryoprotectant. After thawing, samples were diluted with two commercial extenders (FR4[®] and Botucio[®]) in two moments: initial (Ti) and final (Tf). A total of 15 distinct ejaculates from five stallions of national breeds were analysed. Motility

was observed using a computer assistant system analysis and viability was analyzed using fluorescent probes. A significant ($P < 0.05$) increase on total and progressive motility parameters was observed at the final time using Botu-Crio[®] compared with FR4[®]. Statistical difference ($P > 0.05$) on membrane integrity between treatments was not observed.

KEY WORDS: Cryoprotectant, diluent, equine, freezing, thawing.

INTRODUÇÃO

Dada a notoriedade do interesse comercial pelo uso da técnica de inseminação artificial (IA) com sêmen congelado, pesquisas na área de criopreservação de sêmen equino têm sido constantemente desenvolvidas, embora seus resultados sejam ainda pouco satisfatórios no que diz respeito aos índices de fertilidade. A modernização dessa técnica, aliada ao incremento de uma maior viabilidade espermática, é de suma importância para médicos veterinários que trabalham na área, tendo em vista a busca por resultados mais expressivos, quer do ponto de vista da fertilidade das matrizes, quer quanto à otimização do sêmen dos garanhões, isso sem contar o fato de acarretar menos trabalho para o profissional e resultar em consequente redução nos honorários deste para os criadores.

A criopreservação de sêmen equino, bem como de várias outras espécies, não atingiu uma padronização de técnica que proporcione resultados satisfatórios e repetitivos, como ocorre na espécie bovina (WATSON, 2000). A maior limitação ao uso do sêmen congelado na espécie equina decorre da grande variabilidade individual na congelabilidade espermática, em virtude de fatores genéticos e ambientais. Vale registrar que grande parte dos garanhões produz sêmen que não suporta a criopreservação.

Muitos estudos têm como foco a identificação dos danos causados aos espermatozoides durante o processo de congelamento e descongelamento. Parece haver duas classes maiores de danos espermáticos: o oxidativo e o osmótico. SQUIRES (2005) concluiu que, para uma melhoria na sobrevivência espermática pós-congelamento, devem-se minimizar os estresses oxidativo e osmótico.

Para o processo de criopreservação, é necessário o uso de agentes crioprotetores junto ao sêmen, para manutenção da viabilidade espermática, uma vez que eles protegem tais células dos danos causados pelo choque térmico provocados pela formação de cristais de gelo, desidratação e posterior descongelamento (SNOECK, 2002). No entanto, esses agentes também causam efeitos tóxicos deletérios às células espermáticas quando adicionados ou retirados destas. Acredita-se que a variação no

volume celular decorrente da entrada e da saída do crioprotetor e da água (choque osmótico) seja uma das principais causas da baixa viabilidade do sêmen após a descongelamento (BALL & VO, 2001). Ressaltam DEMICK et al. (1976) que um dos fatores envolvidos na variabilidade da resposta pós-descongelamento do sêmen equino é o uso do glicerol como agente crioprotetor. Portanto, a utilização de crioprotetores com maior permeabilidade às células espermáticas é desejável, por minimizar o choque osmótico (GOMES et al., 2002). Segundo ALVARENGA et al. (2005), a menor viscosidade e o menor peso molecular das amidas favorecem uma maior permeabilidade desses componentes dentro da membrana plasmática.

Para WATSON (2000), o processo de criopreservação de sêmen resulta em diminuição da fertilidade quando comparado ao sêmen a fresco e, por isso, deve-se buscar um aumento na taxa de fertilidade, o que significa atentar não só para protocolos de congelamento, mas também para protocolos que permitam maior habilidade funcional da população de espermatozoides que sobreviveram a todo o processo de congelamento/descongelamento. BALL & VO (2001) relataram que uma rápida remoção de crioprotetores resulta num choque hiposmótico relativo à diluição em meios extensores isotônicos ou nos fluidos do trato uterino da égua, o que tem reflexo na rápida perda da motilidade espermática, integridade de membrana e potencial mitocondrial da membrana (POMMER et al., 2002).

Assinale-se, no entanto, que, além de todo o cuidado com o processo de criopreservação, é comum a observação de endometrite persistente pós-inseminação quando utilizado o sêmen congelado. A acumulação de líquido ou a ocorrência de edema uterino pode reduzir seriamente as chances de prenhez nas fêmeas (TROEDSSON et al., 1995). METCALF (2000) avaliou que as inflamações uterinas pós-inseminação ou endometrite aguda após a utilização de sêmen congelado não são mais severas do que as realizadas com sêmen a fresco ou resfriado. Entretanto, elas parecem ser mais duradouras e variar conforme a concentração de espermatozoides depositada e o agente crioprotetor utilizado. Concluíram KOTILAINEN et al.

(1994) que o uso do sêmen congelado não induz uma inflamação uterina mais severa do que o uso do sêmen fresco. No entanto, em decorrência de seu menor volume e de sua maior concentração espermática, a resposta uterina tende a ser mais duradoura em relação ao sêmen a fresco.

LOOMIS & SQUIRES (2005) observaram presença de fluido uterino pós-inseminação em 23% das éguas inseminadas com sêmen congelado, não constatando diferença na incidência do fluido uterino em éguas inseminadas uma ou mais vezes por ciclo. A presença de fluido uterino pós-inseminação está associada a um efeito negativo nas taxas de fertilidade e a uma diminuição nas taxas de concepção (BARBACINI et al., 2003). Para o sucesso da inseminação com sêmen congelado, além da necessidade de este estar com bons padrões pós-descongelação, é essencial contar com um histórico reprodutivo das éguas que serão utilizadas. Deve-se realizar o acompanhamento folicular diário e utilizar a melhor técnica para a deposição do sêmen no ambiente uterino. As fêmeas com idade acima de oito anos e com histórico de problemas reprodutivos têm, em geral, baixas taxas de prenhez e são candidatas em potencial a não conceberem (SAMPER et al., 2001).

Este trabalho objetivou avaliar *in vitro* os efeitos da redução da concentração nas células espermáticas do crioprotetor dimetil-formamida a 5% pós-descongelação, para 2,5% e 1,25%, mediante utilização de dois diluentes comerciais em sêmen de equinos criopreservado.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se cinco garanhões de raças nacionais: Pantaneira (2), Campeira (2) e Campolina (1), com idades entre quatro e quinze anos, aptos à reprodução e com boa fertilidade. A congelação do sêmen foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / CENARGEN, Fazenda Experimental Sucupira, Brasília, DF.

Procedeu-se às coletas mediante a utilização de vagina artificial modelo Botucatu e filtro de *nylon* próprio para remoção da fração gel. Após a coleta realizou-se exame para verificação

das seguintes características: volume, aspecto, coloração, motilidade (0–100), vigor (0-5) e concentração espermática em câmara de Neubauer, mediante diluição na proporção de 1:20 em microscópio e objetiva de 20 X.

Diluiu-se o sêmen com diluente à base de leite desnatado (proporção de 1:1), centrifugando-o a 600g/10min. Retirou-se o sobrenadante e os espermatozoides foram ressuscitados com meio de congelamento FR4[®] (Nutricell, Campinas/SP) contendo 5% de crioprotetor dimetil-formamida (SIGMA-ALDRICH[®]), para se obter uma diluição com concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL. Realizou-se o envase em palhetas de 0,5mL, as quais foram identificadas e lacradas com álcool polivinílico. Resfriaram-se as palhetas a 5°C por 60 minutos em refrigerador doméstico. Em seguida, elas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido a uma altura de 5cm do nível de N₂ líquido e armazenadas em botijão criobiológico.

Procedeu-se as análises das amostras de sêmen no Laboratório de Andrologia do Departamento de Radiologia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Unesp/Campus Botucatu. Foram descongeladas quinze amostras, de quinze ejaculados distintos (três amostras de sêmen de cada um dos cinco garanhões utilizados). Descongelaram-se as palhetas à temperatura de 45°C por vinte segundos e procedeu-se ao armazenamento do sêmen em tubos de microcentrifuga previamente aquecidos a 37°C, separados em cinco frações correspondentes aos tratamentos, conforme Figura 1.

Desenvolveram-se as análises iniciais dez minutos após as diluições (tempo de estabilização) nas amostras acondicionadas a 37°C, com avaliações realizadas mediante análise computadorizada da motilidade (CASA), de acordo com os seguintes parâmetros: motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), velocidade média (VAP μ m/s), velocidade progressiva (VSL μ m/s), velocidade curvilínea (VCL μ m/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH μ m), frequência de batimento flagelar (BCF Hz), quantidade de espermatozoides rápidos (RAP%) nos tempos inicial (Ti) e final, uma hora após as diluições (Tf).

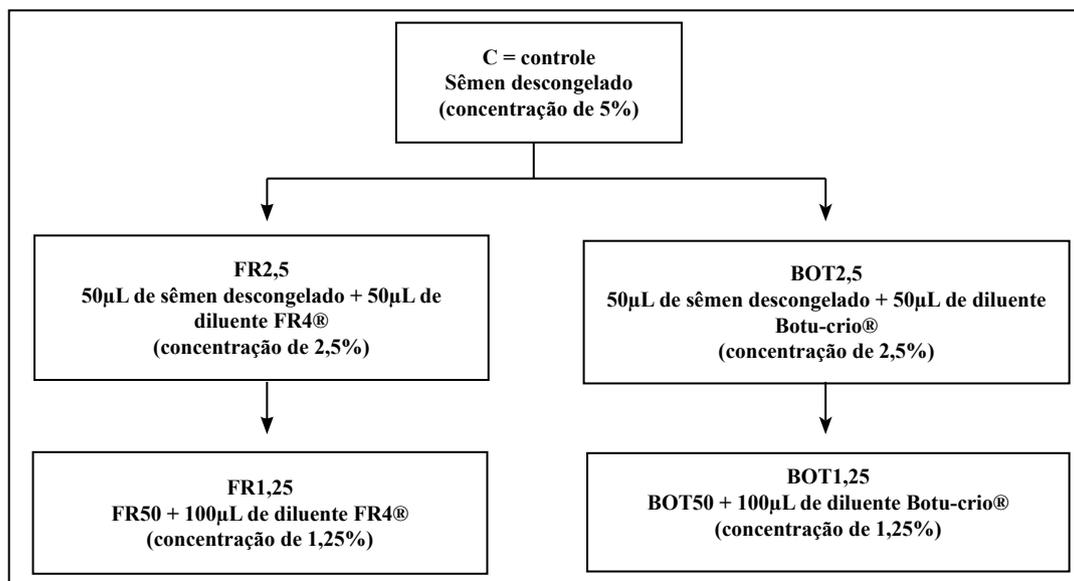


FIGURA 1. Tratamentos utilizados no sêmen descongelado considerando diferentes diluentes (sem crioprotetor), concentrações e controle.

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática (IMP), foi utilizada a técnica de coloração descrita por ZÚCCARI (1998). Adicionaram-se 40µL de sêmen de cada tratamento na solução corante, seguindo-se as avaliações em microscopia de epifluorescência, 200 céls/trat./ lâmina. Os espermatozoides corados em verde foram considerados com a membrana íntegra e os corados em vermelho com membrana lesada.

Para análise estatística empregou-se o teste de Tukey para comparação entre médias das variáveis de motilidade e integridade de membrana plasmática. Fez-se uso de teste de Dunnet para comparação entre cada um dos quatro tratamentos com o controle, e da análise de variância, visando comparar efeitos entre diluentes e entre diluições, todos no tempo inicial (Ti) e final (Tf).

O programa SPSS 13.0 (Statistical Program for Social Sciences) foi empregado para as análises estatísticas, considerando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

O presente estudo avaliou os efeitos da redução da concentração do crioprotetor dimetil-formamida a 5% pós-descongelção nas células espermáticas com

base nos parâmetros de motilidade e de viabilidade. As médias de motilidade espermática total (MT) e motilidade progressiva (MP) do controle dos animais estudados foram de 59% e 16%, respectivamente, e de 48% de integridade de membrana plasmática (IMP) no teste de epifluorescência.

Observou-se diferença significativa entre as médias dos tratamentos (controle, FR2,5, BOT2,5, FR1,25 e BOT1,25) para MP, VSL, ALH e BCF no Ti, não sendo observada diferença significativa ($P>0,05$) para MT, VAP, VCL, RAP e IMP. No Tf, não foram constatadas diferenças significativas ($P<0,05$) para MT, MP, VAP, VSL, VCL, BCF e RAP, nem ($P>0,05$) para IMP, entre as médias dos tratamentos (Figura 2; Tabela 1).

Houve diferença ($P<0,05$) na MP quando utilizado o diluente Botu-Crio®: controle, 15,8%; BOT2,5, 28,5%; e BOT1,25, 25,9%; e ALH (7,7; 6,6; 6,9, respectivamente) no Ti. Foi observada, ainda, diferença para BCF entre controle e BOT2,5, FR1,25 e BOT1,25, para VSL entre o controle e todos os tratamentos. Não houve diferença ($P>0,05$) na MT, VAP, VCL e RAP (Figura 2; Tabela 1). No teste de IMP não houve diferença entre os tratamentos.

Para o Tf, houve diferença ($P<0,05$) na MP entre controle, FR2,5, BOT2,5, FR1,25 e

BOT1,25, também para VAP, VSL, VCL e RAP; na MT entre controle e FR2,5, BOT2,5 e BOT1,25; para BCF entre controle e BOT2,5 e BOT1,25.

Não houve diferença ($P > 0,05$) para IMP e para ALH (Figura 2; Tabela 1).

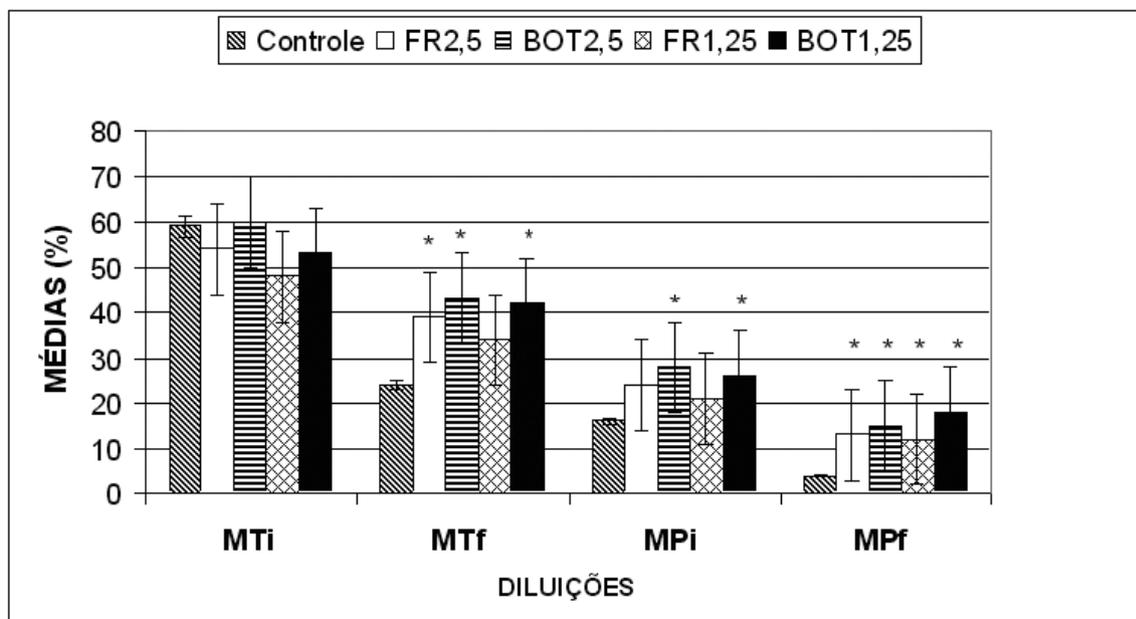


FIGURA 2. Expressão gráfica das médias em porcentagem (teste de Dunnett), em comparação do controle com os demais tratamentos, mediante a utilização das seguintes variáveis: motilidade total inicial (MTi), motilidade total final (MTf), motilidade progressiva inicial (MPi), motilidade progressiva final (MPf). *= diferença estatística ($P < 0,05$).

TABELA 1. Médias (\pm) desvio-padrão e diferença significativa ($P < 0,05$) dos tratamentos de sêmen equino descongelado e tratado, avaliados pelo CASA e pelo teste de epifluorescência (IMP) no tempo inicial (Ti) e final (Tf).

Var. indep.	Tempo	Controle	FR2,5	BOT2,5	FR1,25	BOT1,25
MT (%)	I	59 \pm 8,8 ^a	53 \pm 8,5 ^a	60 \pm 9,1 ^a	48 \pm 6,9 ^a	53 \pm 12,5 ^a
	F	24 \pm 9,3 ^a	39 \pm 7,7 ^b	43 \pm 9,2 ^b	34 \pm 10,2 ^{a,b}	41 \pm 4,6 ^b
MP (%)	I	16 \pm 4,6 ^a	24 \pm 3,9 ^{a,b}	28 \pm 7,5 ^b	21 \pm 6,8 ^{a,b}	26 \pm 9,2 ^b
	F	13 \pm 4,8 ^a	13 \pm 4,8 ^{b,c}	15 \pm 5,8 ^{b,c}	11 \pm 4,6 ^b	18 \pm 3,8 ^c
VAP (μ m/s)	I	97 \pm 10,5 ^a	106 \pm 7,7 ^a	103 \pm 5,4 ^a	104 \pm 10,3 ^a	101 \pm 11,6 ^a
	F	67 \pm 7,1 ^a	91 \pm 10,2 ^b	89 \pm 8,4 ^b	94 \pm 5,5 ^b	95 \pm 6,7 ^b
VSL (μ m/s)	I	69 \pm 7,6 ^a	81 \pm 4,2 ^b	80 \pm 5,6 ^b	81 \pm 9,0 ^b	79 \pm 9,6 ^b
	F	47 \pm 5,6 ^a	69 \pm 8,3 ^b	68 \pm 7,3 ^b	71 \pm 5,0 ^b	74 \pm 5,8 ^b
VCL (μ m/s)	I	180 \pm 18,8 ^a	197 \pm 12,4 ^a	181 \pm 12,8 ^a	171 \pm 65,6 ^a	176 \pm 22,6 ^a
	F	133 \pm 14,3 ^a	169 \pm 21,3 ^b	168 \pm 18,2 ^b	175 \pm 10,3 ^b	169 \pm 15,2 ^b
ALH (μ m/s)	I	7,7 \pm 0,2 ^{b,c}	8,1 \pm 0,4 ^c	6,7 \pm 0,5 ^a	8,0 \pm 0,9 ^c	6,9 \pm 0,9 ^{a,b}
	F	7,3 \pm 0,4 ^a	7,3 \pm 0,6 ^a	7,3 \pm 0,7 ^a	7,7 \pm 0,6 ^a	6,8 \pm 0,7 ^a
BCF (Hz)	I	24 \pm 3,1 ^a	26 \pm 2,0 ^a	30 \pm 2,8 ^b	27 \pm 1,6 ^{a,b}	30 \pm 3,6 ^b
	F	21 \pm 5,7 ^a	26 \pm 3,3 ^b	28 \pm 4,4 ^b	23 \pm 2,5 ^{a,b}	29 \pm 4,3 ^b
RAP (%)	I	41 \pm 9,9 ^a	42 \pm 7,4 ^a	49 \pm 8,4 ^a	39 \pm 6,2 ^a	41 \pm 12,5 ^a
	F	10 \pm 5,4 ^a	28 \pm 8,7 ^b	29 \pm 8,6 ^b	24 \pm 7,9 ^b	31 \pm 3,6 ^b
IMP (%)	I	48 \pm 6,9 ^a	49 \pm 8,2 ^a	50 \pm 6,2 ^a	46 \pm 5,7 ^a	46 \pm 7,9 ^a
	F	36 \pm 12,7 ^a	40 \pm 6,3 ^a	43 \pm 3,8 ^a	38 \pm 7,3 ^a	40 \pm 7,0 ^a

MT= motilidade total inicial; MP= motilidade progressiva; VAP= velocidade média; VSL= velocidade progressiva; VCL= velocidade curvilínea; ALH= deslocamento lateral de cabeça; BCF= frequência de batimento flagelar; RAP= quantidade de espermatozoides rápidos; IMP= integridade de membrana; I= tempo inicial; F= tempo final.

Valores com letras diferentes (a, b, c) na mesma linha divergem estatisticamente ($P < 0,05$).

Quando comparados o diluente e a diluição em fatorial 4 x 4, observou-se diferença ($P < 0,05$) somente para ALH e BCF no Ti entre os diluentes testados, não havendo diferença ($P > 0,05$) entre diluições. Já no Tf, para as médias entre diluentes

houve diferença ($P < 0,05$) na MT (37% e 42%), MP (12% e 17%), ALH (7,5 e 7,0) e BCF (25 e 29), respectivamente, com FR4® e Botu-Crio®. Não houve diferença ($P > 0,05$) na VAP, VSL, VCL, RAP e IMP (Tabela 2).

TABELA 2. Comparação das médias entre os diluentes e as diluições da motilidade espermática total e progressiva e da integridade de membrana plasmática de sêmen equino descongelado e submetido a tratamento.

	FR 2,5	FR 1,25	FR Total	BOT 2,5	BOT 1,25	BOT Total	Total 2,5	Total 1,25	Total %
MT	39,0	34,5	37,2	43,1	41,8	42,4*	41,2	39,2	40,2
MP	13,2	11,7	12,6	14,9	18,5	16,8*	14,1	16,1	15,0
IMP	40,2	37,8	39,3	42,9	40,3	41,5	41,6	39,4	40,6

MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; IMP= integridade de membrana.

*= valores com diferença significativa ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados diferem dos observados por WESSEL & BALL (2004), em que a rápida remoção do glicerol de sêmen equino a fresco resultou numa redução da motilidade e da integridade de membrana dos espermatozoides, enquanto a diluição seriada do glicerol desse mesmo sêmen resultou numa melhora na manutenção tanto da motilidade quanto da integridade de membrana dos espermatozoides. Conclui-se não haver efeito benéfico similar quando feita a diluição seriada com o sêmen criopreservado. Não há relatos desse benefício quando utilizada a dimetil-formamida como crioprotetor numa diluição seriada.

A análise feita no Tf mostrou melhora e diferença significativa em todos os parâmetros analisados, exceto o ALH e IMP, indicando que uma diluição do crioprotetor após a descongelamento pode aumentar a sobrevivência das células espermáticas sem que ocorram lesões às suas membranas. Foi observada, ainda, melhora ($P < 0,05$) nos parâmetros de MP e MT para o sêmen tratado com o diluente Botu-Crio® quando comparado com o FR4®. Estudo feito por MELO et al. (2006) com o diluente Botu-Crio® demonstrou que, apesar das amidas utilizadas em seu experimento apresentarem estruturas químicas semelhantes, uma combi-

nação entre este diluente e dimetil-acetamida a 4% mostrou superioridade na proteção espermática durante o processo de congelação em relação à associação entre o diluidor e dimetil-formamida a 4%, embora não houvesse diferença significativa no teste de fertilidade entre ambos.

No presente estudo não se verificou diferença entre diluições (2,5 ou 1,25%) para todos os parâmetros analisados, resultado esse que está de acordo com os relatos por WESSEL & BALL (2004), em que o tipo de diluição realizado em seu experimento após a descongelamento não afetou a motilidade espermática total e progressiva dos espermatozoides. Entretanto, observou-se efeito entre ganhões. Neste estudo não foi observada uma interação entre diluentes e diluições nos tempos observados (Tabela 2).

Alguns estudos relataram os benefícios teóricos de uma diluição seriada para remoção dos crioprotetores de sêmen congelado em humanos. Entretanto, há poucos resultados experimentais acerca dos efeitos nas células espermáticas, o que torna os dados ainda pouco consistentes (GAO et al., 1995; GILMORE et al., 1997). GAO et al. (1995) observaram que a motilidade espermática é muito mais sensível a condições anisomóticas do que a integridade de membrana. A motilidade espermática demonstrou ser ainda mais sensível às

condições hipo do que hipertônicas em células humanas. Segundo BALL & VO (2001), uma rápida remoção de crioprotetores permeáveis resulta em um possível menor choque hiposmótico quando diluídos em meios diluentes ou nos fluidos do trato reprodutivo das éguas. Isso pressupõe que a diluição do sêmen congelado antes da inseminação pode acarretar uma perda menor das células espermáticas, levando a uma menor reação uterina nas éguas que forem posteriormente inseminadas e a um provável aumento nas taxas de concepção.

As diluições pós-descongelamento de sêmen equino criopreservado com crioprotetor dimetilformamida a 5% utilizando dois diluentes comerciais (Botu-Crio[®] e FR4[®]) proporcionaram uma maior sobrevivência das células espermáticas. O diluente Botu-Crio[®] resulta em melhores resultados, comparado ao diluente FR4[®]. Ressalte-se, contudo, que tais resultados precisam ainda de confirmação em testes *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro e provimento de bolsas.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, n. 89, p. 105-113, 2005.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, n. 22, p. 1061-1069, 2001.
- BARBACINI, S.; NECCHI, D.; ZAVAGLIA, G.; SQUIRES, E.L. Retrospective study of the incidence of post-insemination uterine fluid in mares with frozen-thawed semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, n. 23, p. 493-496, 2003.
- DEMICK, D.S.; VOSS, J.L.; PICKETT, B.W. Effect of cooling, storage with glycerolization and spermatozoa number on equine fertility. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 633-637, 1976.
- GAO, D.Y.; LIU, J.; LIU, C.; MCGANN, L.E.; WARSON, P.F.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reproduction**, n. 10, p. 1109-1122, 1995. (Resumo).
- GILMORE, J.A.; MCGANN, L.E.; LIU, J.; GAO, D.Y.; PETER, A.T.; LEINHANS, F.W.; CRISTER, J.K. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. **Human Reproduction**, n. 12, p. 112-118, 1997.
- GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, p. 277-279, 2002.
- KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, n. 41, p. 629-636, 1994.
- LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. Disponível em: <<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the>>. Acesso em: 25 jun. 2005.
- MELO, C.M.; PAPA, F.O.; MACEDO, L.P.; CROCCI, A.J.; ALBERTI, K.; DELL'AQUA JR., J. A. Utilização de diferentes diluentes de centrifugação e crioprotetores na fertilidade de sêmen congelado equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, 34, supl.1, p. 566, 2006.
- METCALF, E.L. The effect of post-insemination endometritis on fertility of frozen stallion semen. In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 46., 2000. **Proceedings...** v. 46, p. 332-400, 2000.
- POMMER, A.C.; RUTLLAND, J.; MEYERS, S.A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. **Theriogenology**, n. 58, p. 1373-1384, 2002.
- SAMPER, J.C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 219-228, 2001.
- SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; JULIANI, G.C. Efeito de três temperaturas de descongelamento sobre os espermatozoides equinos congelados com diferentes agentes crioprotetores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 454-455, 2002.
- SPSS 13.0. Statistical Program for Social Sciences for Windows.

SQUIRES, E.L. Integration of future biotechnologies into the equine industry. **Animal Reproduction Science**, v. 89, Issues 1-4, p. 187-198, oct. 2005.

TROEDSSON, M.H.T.; STEIGER, B.N.; IBRAHIM, N.M.; FOSTER, D.N.; CRABO, B.G. Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. **Biology Reproduction**, 52, Suppl 1, p. 91, 1995.

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

WESSEL, M.T.; BALL, B.A. Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, n. 84, p. 147-156, 2004.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Reprodução Animal, da FMVZ – Unesp, Botucatu, SP, 1998.

Protocolado em: 19 out. 2007. Aceito em: 19 fev. 2008.