

Princípios do Congelamento de Sêmen do Garanhão

Principles of Stallion Semen Freezing

Jair Perez Osório*
 Igor Frederico Canisso**
 Fernando Andrade Souza*
 Erotides Capistrano da Silva*
 Anali Linhares Lima***

* Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

** Aberystwyth The University of Wales

*** Universidade Federal de Viçosa (UFV)

****Universidade de São Paulo (USP)

Resumo

A criopreservação de sêmen equino é uma técnica que apresenta inúmeras vantagens, mas algumas limitações. Os procedimentos envolvidos com essa biotecnologia devem ser metódicos e cautelosos. De modo geral, as etapas da criopreservação compreendem: exame andrológico, colheita e avaliação seminal, centrifugação, desprezo do sobrenadante, ressuspensão do pellet (diluinte de congelamento), resfriamento, congelamento e descongelamento. O conhecimento dos aspectos básicos inerentes à técnica constitui-se em um pilar fundamental para a correta aplicação, bem como o alicerce nas quais as pesquisas se norteiam e assim possam buscar novas substâncias e metodologias capazes de melhorar os atuais níveis de fertilidade do sêmen criopreservado.

Palavras-chave: Fundamentos. Criopreservação de Sêmen. Equinos. Crioprotetores

Abstract

Cryopreservation of equine semen is a technique that presents several advantages but also some limitations. The procedures involved in that biotechnology should be methodical and cautious. In general, the stages of cryopreservation comprehend: breeding evaluation, semen collection and evaluation, centrifugation, discard of supernatant, pellet resuspension (freezing dilutor), cooling, freezing and thawing. The knowledge of the basic aspects inherent to the technique is fundamental for its correct application, as well as of the foundations on which researches are based. Thus, it is possible to search for new substances and methodologies capable of improving the current levels of fertility of the cryopreserved semen.

Key words: Foundations. Semen cryopreservation. Equines. Cryoprotectors.

1 Introdução

A criopreservação ou congelamento de sêmen equino não é uma técnica tão recente, pois há cerca de duas décadas o conhecimento acumulado neste seguimento permite que se utilize essa biotecnologia com razoável sucesso. Nos últimos anos, grandes avanços ocorreram, como se a técnica fosse “redes-coberta” e, novas metodologias, materiais e técnicas alternativas foram desenvolvidos (LOOMIS, 2006).

Os avanços na criopreservação de sêmen de equinos só não foram plenos nas últimas décadas devido às restrições impostas por parte das as-sociações de criadores, que não permitiram, por muito tempo, o registro de potros provenientes do uso de sêmen criopreservado. As alegações para a proibição é que poderia aumentar o número de fraudes no registro genealógico (ALVARENGA, 2002). Todavia, a legislação, recentemente, foi alterada em muitas raças de equinos, permitindo a utilização de sêmen congelado. Porém, as duas principais raças do Brasil, Mangalarga Marchador e Crioulo não permitem o registro de potros nascidos a partir desta técnica.

A criopreservação de sêmen oferece inúmeras vantagens para os criadores e para a raça, tais como: manter o sêmen estocado por período indeterminado a

baixas temperaturas em nitrogênio líquido; acelerar o melhoramento genético com a utilização de garanhões superiores, principalmente em locais de difícil acesso; permitir preservar características raciais ou linhagens que no momento não seja de interesse, mas no futuro possam ser resgatadas caso o direcionamento genético da raça necessite destas, funcionando como banco genético, contornar problemas com transporte de sêmen (custos elevados, transporte inadequado com variações na temperatura); evitar a transmissão de doenças entre haras, uma vez que se elimina a necessidade do transporte da égua e potro até o garanhão ou vise versa (AMANN; PICKETT, 1987).

Contudo, existem algumas limitações de ordem técnica e características fisiológicas da espécie, destacando-se: a exigência de veterinário especializado em equinos para realização de procedimentos de criopreservação e acompanhamento da dinâmica folicular ovariana; os custos de estocagem do sêmen; a demanda de botijão criogênico; demais honorários veterinários, além disto, o espermatozóide equino apresenta, quando comparado com outras espécies de animais domésticos, maior sensibilidade ao choque térmico pelo frio e ao estresse osmótico; individualidade (certos garanhões tem sêmen mais frágil à manipulação), uma vez que

nem todos os garanhões apresentam criopreservação de sêmen satisfatória, sendo que a raça Mangalarga Marchador, comparada com outras raças, apresenta maior proporção de garanhões com baixa capacidade de criopreservação do sêmen (GOMES *et al.*, 2002). Porém, deve-se salientar que em todas as raças há “bons e maus congeladores”.

Os objetivos deste trabalho foram apresentar as principais etapas envolvidas com a criopreservação de sêmen eqüino, com ênfase nos aspectos das bases fundamentais dos procedimentos.

2 Desenvolvimento

2.1 Coleta e avaliação do sêmen

Para o processo de congelamento do sêmen eqüino, faz-se necessário antes do procedimento propriamente dito, a realização de exame andrológico para constatação das condições reprodutivas do garanhão. Após a avaliação andrológica, caso seja detectada normalidade, é que se pode dar início ao processo de esgotamento das reservas espermáticas extra-gonadais, que pode ser efetuado através de coberturas ou coletas diárias por sete dias consecutivos, ou três dias consecutivos com duas coletas ou montas por dia. Assim, se renovam as reservas e nova população espermática estará presente nos ejaculados (JASKO, 1994).

As coletas de sêmen são realizadas com o auxílio de vagina artificial, que pode ser de diferentes tipos e modelos: do tipo fechada como Hanover, Nishikawa, Colorado, Missouri, Botucatu; ou do tipo aberta Polonesa, (TISCHNER, 1979). A vagina deve ser preenchida com água, e completada ou não com ar para adequação da pressão interna. A temperatura da água a ser posta varia com o modelo de vagina, preferências de cada profissional e de cada garanhão; de modo geral varia de 48 a 55°C no preenchimento, para que no momento da coleta a temperatura interna esteja entre 40 e 42°C (BRINSKO *et al.*, 1999).

Após ou durante a colheita, as frações gelatinosa e a rica em espermatozoides devem ser separadas por filtragem em filtro próprio. Em seguida, com auxílio de microscópio são feitas avaliações das características do ejaculado como: motilidade total, motilidade progressiva, vigor, concentração, coloração e aspecto. Para a seleção dos ejaculados para o congelamento é desejável que o mesmo apresente pelo menos 50% de motilidade progressiva e no mínimo 60 milhões espermatozoides/mL (ALVARENGA *et al.*, 2005).

2.2 Centrifugação

Logo após as avaliações seminais iniciais, o sêmen deve ser diluído para que se realize a centrifugação, com a finalidade da remoção de grande parte do plasma seminal, e concentração do ejaculado para posterior adição do extensor de congelamento (ASHWOOD-SMITH, 1987). Apesar de ser necessária, a centrifugação não é um processo inócuo para o espermatozoide, podendo ser considerada um ponto crítico por induzir a peroxidação dos lipídeos da membrana (PARINAUD *et al.*, 1997).

Para a centrifugação, a porção livre de gel do ejaculado é diluída no meio extensor apropriado procurando diluir o sêmen até obter, aproximadamente, 50×10^6 spzt/mL. O meio extensor é pré-aquecido a 37°C e o sêmen diluído é colocado em tubos de 15 ou 50 mL e centrifugado por 10 a 15 minutos a 400 – 600 g. Os diluidores normalmente utilizados para o processo de centrifugação são: citrato - EDTA, glicose – EDTA e lactose – EDTA, glicose-leite desnatado, leite desnatado UHT, INRA 82, entre muitos outros (MARTIM, KLUG; GUNZEL, 1979; MCKINNON, 1996; VIDAMENT, 2005).

2.3 Plasma seminal

Um dos fatores que pode influenciar a longevidade da motilidade espermática, bem como a qualidade da cromatina nuclear após o descongelamento, é a quantidade de plasma seminal (LOVE *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstraram que a alta proporção de plasma seminal na diluição final reduz a motilidade espermática (BRINSKO; CROCKETT; SQUIRES, 2000). Entretanto, outros estudos demonstraram não haver diferenças significativas na motilidade após o descongelamento com altos níveis de plasma seminal (JASKO *et al.* 1992).

Normalmente, o plasma seminal é removido para realização do processo de congelamento, comumente permitindo 0 a 5% de seu volume original. A remoção do plasma seminal é necessária para a sobrevivência da célula espermática durante a criopreservação (AMANN; PICKETT, 1987). Resultados de pesquisas de outros autores indicam que o plasma seminal possui efeitos benéficos aos espermatozoides humanos e eqüinos criopreservados (KATILA *et al.*, 2002).

Elevados percentuais de motilidade espermática foram obtidos com sêmen eqüino congelado e descongelados em meio contendo 20% do plasma seminal do volume original comparado ao grupo controle, no qual foram removidos 100% do plasma (KATILA *et al.*, 2002). O plasma seminal pode conter componentes que protegem as membranas durante a criopreservação, contudo sua composição é bastante variável entre garanhões. Tal variação pode ser determinante na habilidade dos espermatozoides de um determinado reprodutor sobreviver ao processo da criopreservação (MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005).

2.4 Diluição com o meio extensor

Após o processo de centrifugação, aspira-se e despreza-se o sobrenadante, em seguida ressuspende-se o “pellet”, constituído de espermatozoides, no meio extensor de congelamento, na proporção de 1:1, ou próximo desta. Esta pequena diluição inicial é feita para realizar o cálculo da concentração e assim ajustar o volume para obter a concentração espermática por mililitro desejada. Uma redução de 10% da motilidade espermática pela centrifugação é considerada aceitável (MCKINNON, 1996). Tem-se utilizado concentrações finais que variam de 25 a 400 milhões espermatozoides/mL (JASKO, 1994; VIDAMENT *et al.*, 1997). Contudo os melhores resultados são observados com concentração de 100 ou 200 milhões de espermatozoides/mL (NASCIMENTO, 2006).

2.5 Crioprotetores

Independente do protocolo ou técnica de congelamento utilizado faz-se necessário o uso de crioprotetores que possuam a função de proteger as células e tecidos durante o congelamento e o descongelamento. Tem sido relatado que as propriedades requeridas para um eficiente efeito do crioprotetor são: baixo peso molecular, habilidade para atravessar as membranas das células vivas, alta solubilidade em soluções aquosas eletrolíticas e não ser altamente tóxicos (ALVARENGA *et al.* 2005).

O glicerol tem sido o crioprotetor mais empregado para a criopreservação de espermatozoides da maioria dos animais domésticos (AMANN; PICKETT, 1987), inclusive para o equino (VIDAMENT *et al.* 1997). Smith e Polge (1950) foram os primeiros pesquisadores a relatarem os efeitos crioprotetores do glicerol para sêmen de eqüinos. Contudo, o nascimento do primeiro potro proveniente de sêmen congelado foi feito pelos pesquisadores canadenses do Colégio de Veterinária de Ontário (BARKER; GANDIER, 1957).

Apesar disto, o glicerol é incriminado como um dos principais responsáveis pela baixa motilidade espermática pós-descongelamento, bem como por reduzidas taxas de fertilidade (ALVARENGA, 2002). Aliado a isto, observa-se grandes diferenças individuais e raciais, principalmente em animais da raça Mangalarga Marchador (GOMES *et al.*, 2002).

O resfriamento e reaquecimento inerentes ao processo de criopreservação, por si só causam injúrias nas células espermáticas, danos estes que são potencializados pelo glicerol (PACE; SULLIVAN, 1975). Foi relatado que o glicerol exerce efeitos negativos para a fertilidade tanto no sêmen fresco como no sêmen refrigerado, podendo a toxicidade do glicerol ser o resultado da desnaturação de proteínas, como as actinas (FAHY *et al.*, 1990).

Hammerstedt e Graham (1992) também relataram outros efeitos nocivos do glicerol nas células espermáticas, como mudanças no citoplasma, devido ao incremento na viscosidade celular pela ação intracelular do glicerol, alterando desta maneira a polimerização da tubulina, e também as associações de microtúbulos. Outros efeitos adversos como mudança no balanço bioenergético, alteração da membrana plasmática e mudanças no glicocálix também têm sido relacionadas com o glicerol. Outros autores concluem que a verdadeira toxicidade do glicerol é devido ao estresse osmótico já que o glicerol penetra as membranas celulares mais facilmente que alguns crioprotetores (GILMORE *et al.*, 1995). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas para determinar qual é a concentração mais adequada do crioprotetor ao meio diluidor sem produzir efeitos adversos aos espermatozoides. O glicerol foi inicialmente utilizado na concentração de 7-10% (SMITH; POLGE, 1950). Embora trabalhos demonstrem taxas de fertilidades similares em garanhões com sêmen congelado utilizando-se concentrações de glicerol de 2% a 7% (GRAHAM; CRABO; PACE, 1978), a concentração de glicerol mais utilizada atualmente nos meios diluidores é de 2% a 5% (VIDAMENT *et al.*, 2002). Em um trabalho conduzido pelo Nacional Stud Farm Francês, obteve-se superioridade

nos parâmetros de motilidade espermática, motilidade progressiva, vigor e integridade das membranas plasmáticas após o congelamento e descongelamento com o uso do glicerol na concentração de 2,5% (VIDAMENT, 2005).

Outros crioprotetores penetrantes têm sido estudados para o congelamento do sêmen eqüino. Ashwood-Smith (1987) classificaram os crioprotetores permeantes dentro de dois grupos: álcoois (etileno-glicol, glicerol) e amidas. Tem-se sugerido que as amidas possuem peso molecular mais baixo comparado ao glicerol e isto seria favorável para o processo da criopreservação, provavelmente por induzir menor estresse osmótico (ALVARENGA *et al.*, 2005). Testes de fertilidade têm demonstrado melhoria, significativa, para garanhões que tiveram o sêmen congelado com uso de dimetil formamida como crioprotetor, se quando comparado ao uso de glicerol (MEDEIROS *et al.*, 2003). O uso das amidas como crioprotetores penetrantes nos diluidores seminais para o sêmen eqüino leva a um incremento na motilidade espermática pós-descongelamento e melhor preservação da integridade das membranas plasmáticas que o glicerol, além disto, permite o uso de sêmen de cavalos que têm resultados de baixa congelabilidade com o glicerol como crioprotetor (ALVARENGA *et al.*, 2005).

Medeiros *et al.* (2003) demonstraram que as motilidades total e progressiva após o descongelamento melhoram significativamente quando os espermatozoides são congelados na presença de dimetil acetamida comparado com glicerol a 5%, porém, motilidades similares foram encontradas na presença de dimetil formamida e metil formamida a 5%.

Gomes *et al.* (2002) em trabalho conduzido com um ejaculado de 17 garanhões da raça Mangalarga Marchador com idade de 5 a 17 anos, utilizando um diluidor de congelamento a base de gema de ovo e leite, com variação do crioprotetor de: (1) 5% glicerol; (2) 5% dimetilformamida; (3) 5% metilformamida; (4) 3% de dimetilacetamida, realizaram análise computadorizada da motilidade total e progressiva após o congelamento/descongelamento, resultando em 16.99% - 6.31%, 44.06 - 15.94%, 37.19.19 - 16.75, 32.5 - 14.37% respectivamente para 1, 2, 3 e 4, demonstrando superioridade da dimetilformamida e metilformamida para o congelamento de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador e baixo resultado no congelamento obtido quando o glicerol foi usado como crioprotetor.

2.6 Envasamento

Muitas formas de envase de sêmen diluído já foram testadas. Inicialmente, o sêmen foi congelado em forma de "pellets". Estes eram produzidos colocando-se pequenas gotas de sêmen já diluído de 0,1 até 0,2 ml em pequenas depressões em bloco de dióxido de carbono. Os "pellets" assim formados eram armazenados em containeres que mantêm temperaturas de até -196°C (MERKT; KLUG; KRAUSE, 1975). Outros sistemas de envase também foram testados como ampolas de 0 com capacidade para 10 mL (PACE; SULLIVAN, 1975). Este último sistema de envasamento não proporcionou adequadas curvas de

congelamento pelo fato do congelamento não ocorrer de forma uniforme em toda coluna líquida devido à pequena relação de área de superfície (GRAHAM, 1996).

Contudo, com o objetivo de aumentar a relação da área de superfície, durante muito tempo, o sêmen foi envasado em tubos de plásticos de capacidade de 4 mL, os denominados macrotubos (MARTIM; KLUG; GUNZEL, 1979). Atualmente, os sistemas de envasamento mais comumente utilizados são as palhetas plásticas com capacidade de 0.5mL com o objetivo de obter um congelamento mais uniforme das amostras (VIDAMENT *et al.* 1997), embasados pelos achados de Loomis *et al.* (1983). As palhetas de 0.25mL não são amplamente utilizadas na égua devido a dose inseminante requerer um número elevado de palhetas quando utiliza-se este modelo.

2.7 Taxas de resfriamento

Para o sucesso na preservação dos espermatozóides pelo resfriamento é necessário uma série de etapas que visem à redução nos danos causados às células e que assegurem longevidade *in vitro* e *in vivo*, ou seja, taxa de diluição adequada, diluidores, substâncias protetoras, taxas lentas de resfriamento (FARSTAD, 1996) e manutenção em temperatura específica que reduza o metabolismo, minimize os danos na membrana e não desencadeie prematuramente a capacitação e reação acrossômica (LOOMIS, 1992).

O resfriamento induz mudanças na composição lipídica e na organização da bicamada. Quando a temperatura é reduzida, a movimentação lateral dos fosfolípidios se torna mais restrita, exibindo uma transição da fase fluida para gel com formação de arranjos hexagonais (WATSON, 1996).

Alterações físicas e químicas das membranas celulares, causadas pelo resfriamento, podem ser irreversíveis tais como a diminuição da fluidez e aumento na permeabilidade da membrana, danos ao acrossoma, liberação de enzimas e fosfolípidios, redução na atividade metabólica e no consumo de ATP. Todas estas conseqüências podem comprometer parcial ou totalmente a fertilidade (FARSTAD, 1996).

Segundo Amann e Pickett (1987) reduções na temperatura abaixo dos 37°C e, especialmente dos 20°C, iniciam alterações de natureza biofísica ao espermatozóide eqüino. Estes pesquisadores concluíram que, para o sucesso de um processo de preservação do sêmen em baixas temperaturas, uma série de complexas interações entre diluidor, taxas de resfriamento e temperatura de armazenamento se faz necessário.

Pesquisas têm relatado que as taxas de resfriamento podem ser divididas dentro de 3 categorias: lentas (<0,33°C/min); médias (0,33°C/min a 1,0°C/min) e rápidas (>1,0°C/min) (DOUGLAS-HAMILTON; OSOL; OSOL, 1984).

Amann e Graham (1993) relataram que, para maximizar a manutenção da capacidade fertilizante da célula espermática eqüina, deveria ser feita uma diluição em pelo menos três partes de diluidor apropriado e, então, resfriado em uma taxa de -0,05°C/min entre 18°C e 8°C.

Pickett (1993), em estudos feitos avaliando as características de motilidade do espermatozóide eqüino, concluiu que o sêmen pode ser rapidamente resfriado de 37°C a 20°C, mas deve ser resfriado em taxas menores ou iguais a 0,1°C/min, preferencialmente a -0,05°C/min de 20°C a 5°C para que haja a manutenção da fertilidade.

Fürst (2006) desenvolveu um dispositivo especial de resfriamento do sêmen com uma curva de 0.3°C/min durante 35 minutos e estabilização a 5°C, por 25 minutos em geladeira convencional antes do congelamento. Realizou a inseminação de 120 éguas da raça Mangalarga Marchador e Bretã, utilizando para isso cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador, e dois da raça Bretã, obtendo 62.5% de taxa de gestações com esse protocolo.

2.8 Congelamento

Até o momento, os protocolos de congelamento não têm estabelecido a curva ideal para o processo de congelamento e isto devido à composição do meio diluidor, adição do crioprotetor, concentração do crioprotetor e taxas de resfriamento, já que deve existir, para o sucesso no processo de congelamento, uma boa interação entre estes fatores (HEITLAND; JASKO; SQUIRES, 1996). Na maioria dos protocolos atualmente disponíveis para o congelamento é utilizada uma curva de congelamento rápida de -60°C/min, sendo obtida pela exposição das palhetas horizontalmente, 3cm acima do vapor de nitrogênio (AMANN; PICKETT, 1987).

Em estudos feitos por Cristanelli *et al.* (1985) não houve diferenças significativas nas percentagens de motilidade progressiva nos espermatozóides eqüinos congelados no vapor de nitrogênio a altura de quatro cm, quando comparados com congelamento em máquina computadorizada com curvas programadas, utilizando diferentes taxas de congelamento. As curvas em máquina computadorizada utilizadas foram de -10°C/min, da temperatura de 20°C até -15°C; e outra curva de -15°C/min de -15°C até -120°C, quando as palhetas eram mergulhadas no nitrogênio líquido.

2.9 Descongelamento

De acordo com Amann e Pickett (1987), os principais fatores a considerar no momento do descongelamento são: tipo de envase utilizado, uniformidade de descongelamento em relação à condutividade de calor, espessura da parede das palhetas e a temperatura da água do banho-maria. Estes pesquisadores concluíram que o descongelamento de amostras contidas em palhetas com capacidade para 0,5 mL, deve ser feito à temperatura de 37°C por 30 segundos levando a uma curva de aquecimento de 700°C/min.

Holt (2000) sugere que para o descongelamento de amostras de sêmen testando diferentes curvas de aquecimento é recomendável utilizar temperaturas relativamente altas de banho-maria 60°C e 70°C durante 7 segundos.

Em estudos conduzidos para avaliar diferentes tipos de envasamentos e temperaturas de descongelamento mais adequadas, foi concluído que, para o tipo de

envasamento de palhetas com capacidade para um volume de 0,5 e de 0,25 mL e macrotubos de 4 mL, a temperatura que proporcionou melhores parâmetros espermáticos como motilidade progressiva, em análises computadorizadas, foi 65°C por 6 segundos (DELL' AQUA JUNIOR; PAPA, 2001).

3 Conclusão

São necessárias mais pesquisas para aprimorar esta biotecnologia e, assim, melhorar as taxas de gestação com a inclusão de novas moléculas crioprotetoras que não comprometam a função e estrutura da célula espermática, obtendo-se melhores parâmetros espermáticos avaliados no pós-descongelamento, especialmente para animais considerados maus congeladores.

Referências

- ALVARENGA, M.A. et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.105–113, 2005.
- ALVARENGA, M. Melhoria na congelação de sêmen de garanhões e das variações raciais com o uso da Dimethyl-formamida. 2002. 88 f. Tese (Livre-docência) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2002.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J.L. (Ed.), *Equine reproduction*. Malvern: Lea & Fabiger, 1993. p. 715 - 745.
- _____; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.7, p. 145 -173, 1987.
- ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K., FULLER, B.J. *Temperature and Animal Cells*. Cambridge: Biologists, 1987, p.395 –406.
- BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal Compendium on Medical Veterinary Science*, v. 21,p.47-51,1957.
- BRINSKO, S.P. et al. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 53, p. 1641-1655, 1999.
- _____; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v. 54, p. 129–136, 2000.
- CRISTANELLI, M.J. et al. Effects of egg yolk and glycerol level in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 234, p.25–38, 1985.
- DELL' AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F.O., Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelação de sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v. 25, .n.3, p. 460-462, 2001 .
- DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.A. field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, v. 22, p. 291 - 303, 1984.
- FAHY, G.M. et. al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, v. 27, p. 247–268, 1990.
- FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 251-260, 1996.
- FÜRST, R. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- GOMES, G. M. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, v. 58, p. 277-279, 2002.
- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*, v 12, p. 131-147, 1996.
- _____; CRABO, B. G.; PACE, M. M. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *Journal of Animal Science*, v. 47, supplement 2, p. 80-119, 1978.
- GILMORE, J. A. et al. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biological Reproduction*, v. 53, p. 985 – 995, 1995.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, v.29, p.26-28, 1992.
- HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. Factors affecting motion characteristic of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*, v.28, p.47-53, 1996.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p.3–22, 2000.
- JASKO, J. D. Procedures for cooling and freezing equine semen. *Ars. Veterinaria.*, v.10, n.2, p.156-165, 1994.
- _____. et al. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 37, p.1241–1252, 1992.
- KATILA, T. et al. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. *Theriogenology*, v. 58, p. 241-244, 2002.
- LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. In: CARNEVALE, E.M. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v. 22, p. 663 – 376, 2006.
- _____. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. *Procedures of American Association of Equine Practice*, v.38, p. 629-647, 1992.
- _____. et al. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and

- packaged in straws. *Journal of Animal Science*, v. 56, p. 687 - 693, 1983.
- LOVE, C. C. et al. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, v. 58, p 221-224, 2002.
- MARTIM, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl. 27. p 47-51, 1979.
- MCKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Australian Equine Veterinarian*, v. 14, n. 4, p. 156-174, 1996.
- MEDEIROS, A.S.L. et al. Avaliação da integridade acrossomal de espermatozoides de garanhões criopreservados com crioprotetores a base de amidas e glicerol. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, 2003.
- MERKT, H.; KLUG, E.; KRAUSE, D. Results of long-term storage of stallion semen frozen by the pellet method. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 23, p. 105-106, 1975.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 63, p. 2372-2381, 2005.
- NASCIMENTO, J. Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia e epifluorescência) de espermatozoides eqüinos criopreservados. 2006. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo.
- PACE, M.; SULLIVAN, J.J. Effect of timing insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 23, p.115–121, 1975.
- PARINAUD, J. et al. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. *Human Reproduction*, v. 12, p. 243 - 246, 1997.
- PICKETT, B.W. Seminal extenders and cooled semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Ed.). *Equine reproduction*, Malvern: Lea & Fabiger, p.746-754, 1993.
- SMITH, A.U.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperature. *Nature*, v. 166, p. 668–669, 1950.
- TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen seen in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 27, p. 53-59, 1979.
- VIDAMENT, M. French field results (1985 – 2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*, v. 89, p.115-136, 2005.
- _____ et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, v. 58, p. 249–251, 2002.
- _____ et al. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, v.48, p.907-917, 1997.
- WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 3, Mariensee, 1996. *Proceedings...* Mariensee: 1996. p.135-140.

Jair Perez Osório

Veterinario e Zootecnista La Universidad de Córdoba, Monteria, Colômbia. Doutorando em Ciência Animal pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Igor Frederico Canisso

Médico Veterinário pela Universidade Federal do Paraná, Mestre em Reprodução Animal pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, Pos-graduate Student in Equine Science Aberystwyth University of Wales, Aberystwyth, UK.

e-mail: <canissoif@yahoo.com.br>

Fernando Andrade Souza*

Médico Veterinário pela Universidade Estadual do Maranhão Doutorando em Ciência Animal ambos pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Erotides Capistrano da Silva

Médica Veterinária pela Universidade Federal de Mato Grosso, Especialista em Morfofisiologia Animal pela Universidade Federal de Lavras, Especialista em Residência Médico Veterinária e Mestranda em Medicina Veterinária ambos pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Anali Linhares Lima

Médica Veterinária pela Universidade Estadual do Maranhão, Doutoranda em Ciência Animal e Pastagens pela ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo.

*** Endereço para correspondência:**

Rua Noraldino de Lima, nº 265, Apt 11, Bairro Pampulha – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
