



## Criopreservação do sêmen equino: uma revisão

*Cryopreservation of equine semen: a review*

G.C. Oliveira<sup>1</sup>, B.M.M. Oliveira, E.C.C. Celeghini, C.B. Fernandes, C.B. Mattos

Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>1</sup>Correspondência: [guilhermecain@hotmail.com](mailto:guilhermecain@hotmail.com)

### Resumo

A criopreservação de sêmen equino tem se difundido cada vez em território nacional. Os processos de congelamento e descongelamento levam a efeitos deletérios sobre o espermatozoide, diminuindo sua taxa de motilidade e vigor e, conseqüentemente, influenciando sua morfologia. Estudos vêm sendo realizados em busca do melhor crioprotetor ou associação de crioprotetores para minimizar os danos sofridos sobre os espermatozoides equinos. Nesta revisão de literatura, foram explorados aspectos fundamentais para a criopreservação do sêmen equino, com ênfase para choque térmico, composição de membrana plasmática, efeitos da congelamento de diluidores e, principalmente, de crioprotetores.

**Palavras-chave:** criopreservação, choque térmico, equino.

### Abstract

*Cryopreservation of equine semen is becoming more widespread in the country, but the process of freezing and thawing leads some deleterious effects on sperm, thereby decreasing its rate of motility and strength, that influences in the morphology of sperm. Therefore, studies are being conducted looking for the best cryoprotectant or combination of cryoprotectants to minimize the damage on sperm horses. In this literature review were explored key aspects for the cryopreservation of equine semen, highlighting the issues, thermal shock, the composition of the plasma membrane, effects of freezing extenders, mainly cryoprotectants.*

**Keywords:** cryopreservation, equine, heat-shock.

### Introdução

A inseminação artificial, biotecnia da reprodução mais importante e mais utilizada para melhoramento genético animal, teve início em 1957 com a primeira gestação equina gerada por espermatozoides criopreservados (Pickett e Amann, 1993). Essa técnica tem grande aplicação por necessitar de poucos machos selecionados para a produção de espermatozoides para a inseminação de centenas de fêmeas por ano, por diminuir a transmissão de patógenos via coito, por exigir menos do garanhão e por facilitar a reprodução pela facilidade de transporte do sêmen equino para diferentes regiões do país, sem a necessidade de transportar a égua, possibilitando melhor aproveitamento de garanhões geneticamente superiores.

Em 225 ciclos, durante três temporadas, por meio da inseminação com sêmen fresco (78,7%), Mattos e Cavalheiro (1988) obtiveram taxa de prenhez superior à obtida mediante monta natural (65,3%). Amann e Pickett. (1987), no entanto, verificaram que a inseminação com o sêmen congelado proporcionou taxa de prenhez 75% inferior às obtidas com o sêmen fresco.

Alguns estudos comprovam que a utilização de sêmen fresco ou resfriado tem taxa de fertilidade maior se comparados com o sêmen congelado. Isso é devido ao processo de criopreservação, que possui alguns efeitos deletérios sobre os espermatozoides. Para melhorar a taxa de prenhez, utiliza-se uma concentração maior de espermatozoides, que seria de 300 a 500 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides totais, ou seja, cinco a oito palhetas descongeladas por inseminação artificial, maximizando, assim, a utilização do sêmen congelado e minimizando os efeitos deletérios da criopreservação, o que cada vez mais vem aumentando os índices de fertilidade na reprodução animal (Squires et al., 1999).

Os meios utilizados para a diluição do sêmen para a criopreservação são compostos por substâncias que atuam contra os efeitos deletérios das oscilações da temperatura; em geral, utilizam-se gema de ovo, leite desnatado, açúcares, eletrólitos e glicerol em diferentes concentrações.

Para melhor proteção do espermatozoide, são adicionados aos diluidores alguns tipos de crioprotetores que diminuem os efeitos agressivos da congelamento e descongelamento, como o glicerol, que vem sendo muito utilizado devido aos resultados positivos demonstrados. Porém, sua utilização deve ser ponderada, pois pesquisas recentes demonstram toxicidade, o que reduz a taxa de fertilidade da inseminação.



Este trabalho relata a importância da criopreservação do sêmen equino, enfatizando os agentes crioprotetores.

### **Aspectos fundamentais para a criopreservação do sêmen equino**

Para que o espermatozoide fecunde o ovócito, são necessários, pelo menos, alguns atributos após o descongelamento, como metabolismo do espermatozoide para a sua produção de energia, motilidade progressiva, enzimas acrossomais íntegras, que são de extrema importância para a penetração do ovócito, e proteínas de membrana plasmática, fundamentais para a sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo feminino. (Pickett e Amann, 1993).

A fim de que a criopreservação do sêmen equino seja bem-sucedida, é essencial a interação do crioprotetor, do diluidor, da curva de resfriamento e do aquecimento no processo de criopreservação. Se for realizada de maneira correta, a criopreservação minimiza os efeitos deletérios, como o choque térmico, a formação de cristais de gelo e a desidratação celular (Jasko, 1994).

### **Choque térmico**

Consideram-se choque térmico as mudanças que ocorrem nos espermatozoides quando são rapidamente resfriados da temperatura corporal para a temperatura de zero grau (Jasko, 1994). O choque térmico pode provocar alguns danos irreversíveis aos espermatozoides, como movimentos anormais, circulares, para trás, rápida perda da motilidade, danos ao acrossoma e à membrana plasmática, o que levaria a um aumento de permeabilidade, à perda de componentes intracelulares e à redução do metabolismo (Graham, 1996). Esses danos acontecem na fase de transição e ocorrem na membrana plasmática na passagem do seu estado líquido para seu estado cristalino, ou seja, fase de gel. Devido ao resfriamento, ocorrem mudanças na forma estrutural das moléculas de fosfolípidos, as quais impossibilitam a movimentação aleatória dessas proteínas, resultando em aumento de permeabilidade da membrana e decréscimo da atividade metabólica (Amann e Pickett, 1987).

O choque térmico é sentido de forma diferente em cada espermatozoide de cada animal. Depende do grau de maturação do espermatozoide, da espécie do animal, da variação individual, da quantidade de plasma seminal, dentre outros fatores (Watson, 1981).

Algumas espécies, como o touro, com maior proporção de colesterol, ou seja, com mais fosfolípidos na membrana plasmática, são mais resistentes a mudanças bruscas nas temperaturas, se comparadas à espécie equina (Watson, 1981).

Para que ocorra um menor dano possível no espermatozoide, recomenda-se realizar o resfriamento lento do sêmen diluído até quatro graus, com queda de 0,5°C por minuto até chegar a quatro graus. Outra maneira é a adição de proteínas do leite ou gema de ovo nos diluidores de sêmen (Jasko, 1994).

### **Composição da membrana plasmática**

A membrana plasmática é composta por uma dupla camada lipídica, que contém fosfolípidos, colesterol, glicolípidos e diferentes tipos de proteínas (Ollivier e Gall, 1993). Os fosfolípidos estão dispostos de duas maneiras, sendo a mais externa hidrofílica, e a interna hidrofóbica. Suas proteínas são divididas em periféricas e integrais. As proteínas periféricas são facilmente removidas, solúveis no sêmen e na água. As proteínas integrais não são removidas com facilidade da membrana plasmática, precisando de solventes ou detergentes para serem removidas (Watson, 1981).

O transporte de moléculas para dentro da membrana plasmática ocorre através de poros ou canais formados pelas proteínas. Em regiões da membrana em que não há poros ou canais, o transporte de moléculas é pouco ou nulo. Na fase de resfriamento, pode ocorrer um desarranjo na conformação da membrana plasmática, levando a uma desorganização nas cadeias de fosfolípidos e proteínas, resultando, assim, numa passagem rápida de moléculas pela membrana, que passariam de uma forma lenta (Amann e Pickett, 1987).

A membrana plasmática é fluida à temperatura corporal. Sua fluidez é a capacidade de movimentação lateral de seus fosfolípidos. Alguns fatores podem alterar a fluidez e flexibilidade de membrana, como o resfriamento (Amann e Pickett, 1987).

### **Efeitos da congelação**

A maior dificuldade de resistência celular às mudanças de temperatura ocorre na zona intermediária, que vai de 15 graus positivos até 60 graus negativos. Esse processo ocorre duas vezes, fazendo com que a célula passe por esse estresse térmico tanto na fase de congelação quanto na de descongelação (Mazur, 1984).

Quando uma solução com crioprotetor chega à temperatura entre cinco graus negativos e 15 graus negativos, ela entra na zona de formação de cristais de gelo, levando à formação de cristais no diluidor, o que resulta em um aumento da concentração de soluto extracelular. Esta alta concentração faz a água intracelular se

mover para o meio extracelular, provocando a desidratação da célula (Mazur, 1984; Amann e Pickett, 1987).

Existem alguns tipos de curva de congelamento, entre elas a curva de congelamento lenta, em que ocorre a desidratação completa do espermatozoide, impedindo, assim, a formação de cristais de gelo intracelular, porém altas concentrações de soluto podem gerar lesões nas células. A curva de congelamento rápida evita que ocorra uma desidratação correta da célula, formando, assim, cristais de gelo intracelular, sendo prejudicial à célula (Watson, 1995).

Sempre que preconizada uma curva de congelamento, será escolhida uma curva de descongelamento subsequentemente. Caso o sêmen seja congelado por meio de uma curva de congelamento lenta, deverá ser descongelado da mesma forma, para que haja tempo de o espermatozoide se reidratar. Porém, se for utilizada uma curva de congelamento rápida, a descongelamento deverá ser rápida, evitando o fenômeno da recristalização (Leibo e Bradley, 1999).

### **Diluidores de congelamento**

Para haver uma melhor resposta e proteção dos espermatozoides, são adicionados alguns tipos de extensores e diluidores de sêmen logo após sua colheita. Esses diluidores e extensores, para melhor agirem sobre os espermatozoides, são devidamente aquecidos a uma temperatura de 37°C, similar à temperatura dos órgãos sexuais, dando um conforto térmico ao espermatozoide. A diluição é feita em proporção 1:1, quando uma parte de sêmen corresponde a uma parte de diluidor ou extensor (Oliveira et al., 2010).

Para que o extensor seja ideal, deve respeitar a osmolaridade e o pH ideal do espermatozoide, de 350 mOsmol/L e 6,7 a 6,9, respectivamente. Porém, os extensores variam de 300 a 400 mOsmol/L, e seu pH varia de 6,7 a 7,2. Esses fatores influenciam diretamente em uma maior sobrevivência do espermatozoide (Blanchard et al., 2003). Além da osmolaridade e do pH similar ao do sêmen, também é fundamental equilibrar os elementos minerais e substâncias que neutralizam produtos tóxicos, como antibióticos, e conferir uma proteção ao choque térmico (Amann e Pickett, 1987; Brinsko e Varner, 1992). Outros componentes do diluidor podem incluir EDTA, detergentes e tampão. O EDTA se liga aos íons de cálcio e, assim, impede que o cálcio extracelular penetre no espermatozoide e danifique a célula durante o choque térmico (Watson, 1981). Os detergentes solubilizam os lipídeos da gema do ovo e as lipoproteínas, intensificando as interações entre os componentes e a membrana plasmática (Pickett e Amann, 1993).

Os diluidores mais utilizados nos equinos são aqueles cuja base contém leite desnatado ou gema de ovo. Sua base é rica em lipoproteínas, geralmente presentes no leite, e tem a capacidade de estabilizar elementos proteicos da membrana do espermatozoide. Essa estabilização é fundamental nos processos de congelamento e descongelamento (Watson, 1981).

### **Crioprotetores da congelamento**

Os crioprotetores podem ser divididos em duas classes: crioprotetores penetrantes e não penetrantes. Os penetrantes são aqueles que têm a capacidade de atravessar a membrana plasmática do espermatozoide devido a seu pequeno tamanho molecular, atuando, assim, nos meios intracelular e extracelular. São eles o glicerol, o propilenoglicol, o etilenoglicol, a acetamida e outras amidas, o 1,2 propanodiol e o dimetilsulfóxido. Os não penetrantes, por sua vez, não têm a capacidade de atravessar a membrana plasmática devido ao seu maior tamanho molecular. São eles: as proteínas que podem estar presentes no leite e na gema de ovo, os açúcares, como lactose, manose, frutose, rafinose e trealose, os polímeros sintéticos, como polivinilpirrolidona e metilcelulose (Amann e Pickett, 1987).

#### *Glicerol*

O glicerol é considerado quimicamente um álcool que contém três grupos funcionais de hidroxilas, os quais podem aceitar um grupo de hidrogênio da molécula de água em seis sítios diferentes. Na espécie equina, o crioprotetor mais utilizado é o glicerol, apesar do grau de toxicidade que oferece à célula, podendo comprometer a fertilidade. Esse crioprotetor provoca estresse osmótico, mudanças na organização, na fluidez e na permeabilidade da membrana e mudanças em sua composição lipídica. Porém, estudos recentes comprovam que não foram encontrados crioprotetores mais eficientes que o glicerol na crioproteção (Amann e Pickett, 1987).

Keith et al. (2000), ao testar diversos crioprotetores, entre eles o glicerol e a dimetilformamida, observaram que os espermatozoides conservados em glicerol apresentavam maior porcentagem de motilidade total e progressiva.

Segundo McKinnon (1996), os crioprotetores penetrantes têm a capacidade de funcionar com soluto e solvente, como o glicerol, que acaba alterando a pressão osmótica tanto do espermatozoide como do diluidor. Os crioprotetores solúveis, como o glicerol, funcionam como solventes com ponto de congelamento mais baixo que o da água, o que permite a formação de canais de diluidores descongelados, nos quais se encontram os espermatozoides. O glicerol é um crioprotetor permeante e seu maior efeito favorável é extracelular, porém esse



crioprotetor penetra e reside na membrana celular e no citoplasma. Juntamente ao efeito osmótico nas células, exerce um efeito direto na membrana plasmática, ligando-se diretamente aos fosfolípidos da membrana, reduzindo, assim, sua fluidez e interferindo na sua permeabilidade. Segundo alguns autores, sua concentração pode variar 3,5 a 5% nos diluidores de sêmen equino (Cochran et al., 1984).

Métodos convencionais de congelamento em palhetas de 0,25 mL ou 0,5 mL têm utilizado quantidades de 7% de glicerol como ótima concentração para diluidores à base de gema de ovo (De Leew et al., 1993).

### *Dimetilformamida*

As amidas são formadas por três pontos de ligação ao hidrogênio, portanto três ligações a menos que o glicerol. Elas são menos viscosas e menos solúveis em água se comparadas ao glicerol, o que leva à menor permeabilidade da membrana. Essa característica é favorável no ponto de vista da criopreservação, pois diminui a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico (Ball e Vo, 2001).

De acordo com Keith (1998), as acetamidas ou formamidas adicionadas ao radical metil têm maior efeito crioprotetor para as células do que as que não têm esse radical.

A dimetilformamida vem cada vez mais se mostrando eficiente para a criopreservação de tecidos vivos, melhorando os processos de vitrificação e estabilização em água, superando o glicerol (Baudot e Boutron, 1998).

Estudos recentes relatam que a dimetilformamida protege as células espermáticas do ganhão frente aos efeitos deletérios do processo de criopreservação (Medeiros, 2003).

A prática desse diluente na criopreservação de sêmen de ganhões vem sendo empregada cada vez mais, devido aos bons resultados obtidos. Segundo Keith (1998), foram comparados alguns tipos de amidas, como formamida, metilformamida, dimetilformamida, acetamida, metilacetamida, com o glicerol, sendo utilizada na criopreservação do sêmen equino essa comparação. A metilformamida obteve resultados melhores se comparada aos outros, sendo superior em relação ao glicerol para motilidade total e motilidade no tempo zero. Após 20 minutos de descongelamento, a metilformamida obteve resultados melhores que o glicerol na motilidade total, na motilidade progressiva e na preservação da viabilidade celular determinada pelas sondas (Keith, 1998).

Segundo Alvarenga (2003), o DMSO (dimetilsulfóxido) tem sido menos eficiente se comparado com o glicerol, a dimetilformamida e o etilenoglicol nos parâmetros de motilidade total e progressiva dos espermatozoides. De acordo com Graham (2000), uma menor eficácia nos tratamentos que utilizam os crioprotetores acetamida, metilacetamida, formamida, metilformamida e dimetilformamida se comparados aos que fazem uso do glicerol, pois a motilidade após descongelamento foi inferior. Ambos os pesquisadores testaram a ação da metilformamida e da dimetilformamida em concentrações maiores, comparando-as com etilenoglicol e glicerol e obtiveram um melhor resultado com a dimetilformamida em relação aos outros tratamentos para a motilidade.

### *Etilenoglicol*

O etilenoglicol é considerado um álcool que possui quatro pares de elétrons isolados, os quais podem ligar a mais elétrons isolados. Os átomos de hidrogênio podem ligar aos quatro sítios e posteriormente doar dois desses átomos (Keith, 1998). O etilenoglicol pode realizar ligações de hidrogênio na membrana do espermatozoide (Kundu, 2000).

Mercante et al. (1995) testaram a eficácia do etilenoglicol comparada com a do glicerol como crioprotetores de espermatozoides equinos. A concentração utilizada de crioprotetor em cada tratamento foi de 5% em meio diluidor à base de EDTA-lactose-gema de ovo. Após análise microscópica de motilidade e vigor do sêmen congelado, não foram observadas grandes diferenças estatísticas entre o glicerol e o etilenoglicol, apesar de ser observada uma melhor tendência para o etilenoglicol tanto em questão de motilidade quanto de vigor.

Neves et al. (1995) avaliaram o percentual de gestações obtidas pela inseminação artificial com sêmen congelado utilizando glicerol e etilenoglicol como crioprotetores. O etilenoglicol teve um percentual de gestação maior que o glicerol, porém não houve uma diferença estatística significativa.

Arruda (2000) avaliou a substituição do glicerol pelo etilenoglicol como o agente de criopreservação de sêmen equino e concluiu que o glicerol e o etilenoglicol têm as mesmas propriedades crioprotetoras, pois não se observou uma grande diferença estatística entre ambos.

Alvarenga (2003) utilizou concentrações de etilenoglicol e concentrações de glicerol em meio diluidor EDTA-lactose-gema de ovo com diferentes concentrações de crioprotetores, a fim de avaliar a integridade da membrana espermática antes e após a criopreservação. A motilidade espermática foi maior com o tratamento que utilizou etilenoglicol a 5%, no entanto os autores concluíram que o etilenoglicol possui atividade crioprotetora similar ao glicerol.

Chenier (1998) relatou que não houve diferença significativa quando comparados os crioprotetores glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol para o congelamento do sêmen de equinos, apesar de o DMSO apresentar uma pequena vantagem pós-descongelamento dos espermatozoides equinos. Ao se comparar o



etilenoglicol com o glicerol e o DMSO, foi observado que o etilenoglicol faz com que ocorra uma diminuição na motilidade progressiva pós-descongelação dos espermatozoides equinos.

Oliveira et al. (2010) relataram que não houve diferença estatística significativa quando comparados os crioprotetores glicerol, dimetilformamida, etilenoglicol. Porém, quando associados, foi observado um bom protocolo de tratamento para criopreservação.

### Considerações finais

A criopreservação de sêmen equino vem crescendo devido à facilidade de transporte e armazenamento do material genético de garanhões por longo período de tempo. Com isso, consegue-se um melhor aproveitamento genético de animais de grandes valores econômicos e zootécnicos. Todavia, cada animal tem uma pequena variação na composição da membrana plasmática, podendo ter uma camada maior de colesterol e ácidos graxos, deixando-o mais resistente ao processo de criopreservação. Já alguns animais não têm a mesma habilidade de resistir aos danos da congelação. Por isso é de grande importância ressaltar os diferentes tipos de protocolos de crioprotetores, diluidores e curva de congelação utilizados na criopreservação, para que se adequem cada protocolo para cada indivíduo.

A fim de que ocorra a fertilização do ovócito, é extremamente necessário que ocorra a manutenção da membrana plasmática, que pode ser lesada durante o processo de criopreservação, mudando sua fluidez, permitindo a entrada de moléculas que normalmente não entrariam, levando, assim, à morte celular.

O grande sucesso dessa técnica está em conhecer bem os diferentes tipos de protocolos e saber utilizá-los para cada indivíduo de forma isolada.

### Referências

- Alvarenga MA.** The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: Workshop on Transporting Gametes and Embryos, 2003, Brewster, Mass. Proceedings... New York, NY: Havemeyer Foundation, 2003. p.74-76.
- Amann RP, Pickett BW.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.7, p.145-173, 1987.
- Arruda RP.** Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. Dissertação (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, SP, 2000.
- Ball BA, Vo A.** Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and membrane potential. *J Androl*, v.22, p.1061, 2001.
- Baudot A, Boutron P.** Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide. *Cryobiology*, v.37, p.187-199, 1998.
- Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Brinsko SP, Rigby SL.** Semen preservation. In: Manual of equine reproduction. 2.ed. Philadelphia, PA: Elsevier-Mosby, 2003. p.165-177.
- Brinsko SP, Varner DD.** Artificial insemination and preservation of semen. In: Blanchard TL, Varner DD. Stallion management. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.8, p.205-218, 1992.
- Chenier T.** Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. In: Proceedings for Annual Meeting, Society for Theriogenology, 1998, Baltimore, MD. Proceedings... St Louis, MS: Society for Theriogenology, 1998. p.52-53.
- Cochran JD, Amann RP, Froman DP.** Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, v.22, p.25-38, 1984.
- Cottorello ACP, Henry M, Ferreira MKV, Juliani GC.** Efeito da associação do etilenoglicol ao glicerol na criopreservação de sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.25, p.456-457, 2001.
- De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B, Verkleij AJ.** Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v.30, p.32-34, 1993.
- Graham JK.** Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.12, p.131-147, 1996.
- Graham JK.** Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 2000, 14, Stockholm. Proceedings... Stockholm: ICAR, 2000. p.307. Resumo.
- Jasko DP.** Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Vet*, v.10, p.156-165, 1994.
- Keith SL.** Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.62, p.1056-1065, 1998.
- Keith SL, Squires EL, Graham JK, Brinsko SP.** Evaluation of cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Colorado: CDU, 2000. Online. Disponível em: <http://www.cvmb.colostate.edu/physio/abstract/els5.html>. Acesso em: 24 ago. 2000.





- Kundu CN, Chakraborty J, Dutta P, Bhattacharyya D, Ghosh A, Majumder GC.** Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and the goat caudal epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, v.4, p.117-125, 2000.
- Leibo SP, Bradley L.** Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon C (Ed.). *The male gamet: from basic science to clinical applications*. Vienna, IL: Cache River Press, 1999. p.501-516.
- Mattos RC, Cavalheiro EP.** Monta natural e inseminação veterinária com sêmen fresco em éguas cruza árabe. In: Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 10, 1988, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: SOVERGS, 1988. p.46. Resumo.
- Mazur P.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, v.247, p.125-142, 1984.
- Mckinnon AO.** Artificial insemination of cooled, transported and frozen sêmen. *Austr Equine Vet J*, v.14, p.156-175, 1996.
- Medeiros ASL.** Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhão. 2003. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP: 2003.
- Mercante CFJ, Arruda RP, Neves Neto JR, Visintin JA, Fagundes AC.** Congelação de sêmen equino em etilenoglicol ou glicerol: motilidade, vigor e teste de termorresistência; estudos preliminares. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11, 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1995. p.290. Resumo.
- Neves Neto JR, Mercante CFJ, Arruda RP.** Fertilidade do sêmen congelado equino em etilenoglicol e glicerol. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11, 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1995. p.292. Resumo.
- Oliveira GC, Oliveira BMM, Arruda RP, Zaffalon FG, Nascimento J, Fernandes CB, Celeghini ECC.** Características espermáticas do sêmen equino congelado com diferentes crioprotetores. In: Conferência Anual da Abreveq, 9, 2010, São Paulo, SP. *Anais...* São Paulo, SP: ABRAVEQ, 2010.v.29, p.304-305.
- Ollivier M, Gall L.** The cell. In: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (Ed.). *Reproduction in mammals and man*. Paris: Elipses, 1993. p.179-196.
- Pickett BW, Amann RP.** Cryopreservation of semen. In: Mckinnon AO, Voss JL (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.769-789.
- Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE.** Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7,p.871-891,1995.
- Watson PF.** The effects of cold shock on sperm membranes. In: Clarke A, Morris GJ (Ed.). *Effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press, 1981. p.189-218.
-