



Cisteína como antioxidante para a criopreservação de sêmen de garanhões considerado de baixa congelabilidade

Cysteine as an antioxidant to frozen semen of "bad freezer" stallions

A. Francisco Júnior¹, R.A. de Oliveira², F.J.G. de Oliveira², B.D. Oliveira Filho¹,
M.L. Gambarini^{1,3}

¹Laboratório de Reprodução Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

²Laboratório de Reprodução Animal (ReproUnB), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

³Correspondência: profmarialuciareproducao@gmail.com

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de cisteína (CIS), como agente antioxidante, no diluente utilizado para criopreservação de espermatozoides equinos com histórico de sêmen com baixa congelabilidade. Três amostras seminais de sete garanhões foram obtidas por meio de vagina artificial, diluídas em meio comercial (Botusêmen) e distribuídas em dois tratamentos: controle e CIS (2,5 mM de cisteína) e criopreservadas. Após o descongelamento, as avaliações *in vitro* foram: cinética espermática computadorizada e avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal por meio de sondas fluorescentes. Verificou-se que no grupo CIS o percentual de motilidade total e progressiva ($23,95 \pm 3,33$; $4,66 \pm 0,84$), respectivamente, foi superior em relação às amostras do grupo controle ($11,38 \pm 2,35$; $2,04 \pm 0,36$), ($P < 0,01$). Não houve diferença com relação à integridade das membranas plasmática ($12,5 \pm 2,6 \times 15,1 \pm 2,6$) e acrossomal ($24,2 \pm 3,6 \times 25,4 \pm 3,85$), ($P > 0,05$), quando se comparou grupo controle e cisteína, respectivamente. Levando-se em consideração que a motilidade apresenta alta correlação com a fertilidade, os resultados sugerem que a adição de cisteína na concentração de 2,5 mM ao meio diluente antes do congelamento de sêmen incrementa a qualidade dos espermatozoides criopreservados de animais considerados de baixa congelabilidade.

Palavras-chave: antioxidantes, congelabilidade, equino, Mangalarga Marchador, sêmen.

Abstract

The aim of this experiment was to evaluate the effect of in vitro addition of cysteine (CIS) as antioxidant used for frozen semen of "bad freezer" stallions. Three semen samples from seven stallions were obtained by artificial vagina, diluted in commercial extender (Botusêmen) and split in two treatments: control and CIS (2.5 mM of cysteine) and cryopreserved. After post-thaw, the analyzed parameters were: computerized analysis of sperm movement characteristics and acrosomal and plasma membrane integrity by fluorescent probes. Total and progressive motility were higher ($P < 0.01$) in CIS group (23.95 ± 3.33 ; 4.66 ± 0.84) when compared with control group (11.38 ± 2.35 ; 2.04 ± 0.36), respectively. Regarding plasma and acrosomal membrane integrity there was no difference ($P > 0.05$) ($12.5 \pm 2.6 \times 15.1 \pm 2.6$ and $24.2 \pm 3.6 \times 25.4 \pm 3.85$, respectively) between the control and cysteine group. It is known that the motility is highly correlated with fertility so these results suggest that the addition of 2.5 mM of cysteine in the frozen extender medium before cryopreservation increases the seminal quality of "bad freezer" stallions.

Keywords: antioxidants, equine, freezability, Mangalarga Marchador, semen.

Introdução

Apesar do uso crescente do sêmen criopreservado na equinocultura mundial, as taxas de concepção ainda são baixas (entre 25 e 40%) e isso dificulta a sua utilização em larga escala. É notório também que o fator raça possui enorme contribuição na resistência dos espermatozoides na técnica de criopreservação. A raça Mangalarga Marchador apresenta resultados insatisfatórios na criopreservação de sêmen quando comparada às raças de salto ou à raça Quarto de Milha (Candeias et al., 2012).

Como um dos fatores responsáveis por esse baixo aproveitamento, pode-se citar a alta vulnerabilidade do espermatozoide equino aos efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROS) (Ball et al., 2000). As EROS, em baixas concentrações, participam ativamente da fisiologia dos espermatozoides (Kankofer et al., 2005), entretanto, em altas concentrações, podem provocar danos à membrana plasmática e à capacidade fecundante do espermatozoide (Heckenbichler et al., 2011).

Os antioxidantes previnem ou combatem os danos gerados aos espermatozoides pelas EROS, diminuindo a vulnerabilidade deles (Bansal e Bilaspuri, 2010).



Nesse sentido, estudos comprovam a eficiência da adição de antioxidantes, entre eles a cisteína e a glutatona, aos diluentes de congelamento e refrigeração, melhorando, com isso, a viabilidade do espermatozoide equino após o descongelamento do sêmen (Oliveira et al., 2013; Oliveira et al., 2014; Oliveira et al., 2015a; Oliveira et al., 2015b).

Um dos antioxidantes incorporados ao sêmen de algumas espécies é a cisteína, precursora da síntese de glutatona. A cisteína é um antioxidante não enzimático, que previne a peroxidação lipídica, com a habilidade de penetrar as membranas celulares (Bilodeau et al., 2001).

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito *in vitro* da adição de 2,5 mM de cisteína em um diluente comercial de criopreservação de sêmen, utilizando-se garanhões previamente selecionados como possuidores de sêmen de baixa de congelabilidade. Essa concentração foi escolhida com base no trabalho de Oliveira et al. (2013), que, embora tenham utilizado a glutatona em diferentes concentrações, obtiveram melhores resultados de motilidade e integridade de membrana plasmática com a utilização de 2,5mM.

Material e Métodos

Foram utilizados sete garanhões da raça Mangalarga Marchador, que apresentavam sêmen fresco com motilidade superior a 60% e vigor 4, mas que, quando tinham o sêmen criopreservado, não ultrapassavam os 30% de motilidade pós-descongelamento. Os animais tinham entre cinco e 10 anos de idade e eram criados em regime semiextensivo. A alimentação consistia em sal mineral e água *ad libitum*, 4kg de concentrado com 12% de PB/dia e Adropogon como volumoso.

Foi realizado o esgotamento prévio das reservas espermáticas extragonadaís, com coletas em dias alternados, por sete dias. Após o esgotamento, foram realizadas três coletas, em dias alternados, de cada garanhão, totalizando 21 ejaculados criopreservados.

Adição do antioxidante e criopreservação do sêmen

O sêmen foi diluído na proporção de 1:1 em meio à base de leite em pó desnatado¹ e centrifugado a 600 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de espermatozoides resultante foi ressuspenso com o diluente de criopreservação à base de gema de ovo, glicerol e metilformamida², em dois grupos: diluente sem antioxidante (controle) e diluente com 2,5 mM de cisteína³ (CIS). Após a diluição, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL com concentrações ajustadas para 100x10⁶ espermatozoides/mL.

As palhetas foram distribuídas em uma plataforma-suporte e estabilizadas a 5°C, em refrigerador comercial, por 20 minutos (-0,3°C/min). Para o congelamento, a plataforma foi exposta ao vapor de nitrogênio líquido, sendo as palhetas posicionadas horizontalmente a 6cm acima do nível de nitrogênio líquido, por 20 minutos. Imediatamente após, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e estocadas em botijão criogênico a -196°C, para posterior avaliação.

Análises laboratoriais do sêmen

As amostras foram descongeladas a 37°C por 30 segundos. Avaliou-se a cinética espermática computadorizada e a integridade das membranas plasmática e acrossomal.

Para avaliação da cinética espermática, 2 µL de sêmen descongelado foram colocados na lâmina de leitura (Makler® counting chamber, Selfi-medical instruments, Califórnia, EUA), sendo a amostra avaliada no aparelho modelo Ivos-Ultimate 12 da *Hamilton Thorne Biosciences*, previamente ajustado para análise de sêmen equino. Três campos foram selecionados para leitura e análise. As variáveis mensuradas foram as seguintes: motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade de trajeto (µm/s; VAP), velocidade retilínea (µm/s; VSL), velocidade curvilínea (µm/s; VCL), amplitude lateral de cabeça (µm; ALH), frequência de batimentos (Hz; BCF), linearidade (%; LIN) e retilinearidade (%; STR).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática, foram utilizadas as sondas fluorescentes iodeto de propídeo (IP) e diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA), conforme técnica descrita por Harrison e Vickers (1990). Foram avaliadas 200 células em microscopia de epifluorescência em aumento de 1000x.

Para integridade da membrana acrossomal, foi utilizada a sonda fluorescente isotiocianato de fluoresceína conjugada com a aglutinina do amendoim (*Arachis hypogea*) (FITC-PNA) e o iodeto de propídeo (IP), como descrito por Klinc e Rath (2007). Foram avaliadas 200 células em microscopia de epifluorescência

¹Botusêmen – BotuPharma - Botucatu/SP

²Botucrío – BothPharma – Botucatu/SP

³L-Cysteine - C7352 – Sigma-Aldrich Co – EUA



alternada, com o contraste de fase no aumento de 1000x.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, e a análise de crítica e consistência dos dados foi realizada utilizando-se o procedimento UNIVARIATE (SAS) para determinar se os erros experimentais das variáveis possuíam distribuição normal de probabilidade e homogeneidade de variância. Os resultados foram submetidos à análise de variância, e as diferenças entre médias estudadas pelo teste t usando-se o pacote computacional Winstat.

Resultados

Os resultados referentes à qualidade do sêmen fresco estão expostos na Tab. 1.

Tabela 1. Avaliação da cinética espermática computadorizada (CASA): motilidade total (MT - %), motilidade progressiva (MP - %), velocidade de trajeto (VAP - $\mu\text{m/s}$), velocidade retilínea (VSL - $\mu\text{m/s}$), integridade das membranas plasmática (MI - %) e acrossomal (ISRA - %) do sêmen fresco.

	MT	MP	VAP	VSL	MI	ISRA
Sêmen fresco	67,14 \pm 5,24	16,67 \pm 8,69	50,21 \pm 5,30	35,65 \pm 4,74	72,31 \pm 6,65	68,67 \pm 5,79

A Tab. 2 apresenta os resultados relacionados às variáveis de cinética espermática pós-descongelamento.

Tabela 2. Cinética espermática pós-descongelamento de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador (n = 7) criopreservado em meio contendo 2,5 mM de cisteína e controle.

Variável	Tratamentos		
	Controle	Cisteína	P
Motilidade total	11,38 \pm 2,35 ^a	23,95 \pm 3,33 ^b	0,003
Motilidade progressiva	2,04 \pm 0,36 ^a	4,66 \pm 0,84 ^b	0,006
VAP ($\mu\text{m/s}$)	40,71 \pm 1,51	40,8 \pm 1,05	0,958
VSL ($\mu\text{m/s}$)	35 \pm 1,51	33,47 \pm 0,95	0,594
VCL (%)	74,14 \pm 1,67	76,55 \pm 0,99	0,22
ALH (%)	3,47 \pm 0,42	3,62 \pm 0,43	0,812
BCF (%)	41,66 \pm 1,12	40,28 \pm 0,98	0,636
STR (%)	86,95 \pm 1,02 ^a	82,28 \pm 1,02 ^b	0,002
LIN (%)	49,85 \pm 1,32 ^a	45,19 \pm 1,17 ^b	0,01

VAP-velocidade média da trajetória; VSL-velocidade linear progressiva; VCL-velocidade curvilínea; ALH-amplitude deslocamento de cabeça; BCF-frequência de batimento flagelar cruzado; STR-retilinearidade; LIN-linearidade. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença (P < 0,05).

Na Tab. 3, estão expostos os resultados relacionados à integridade das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides após o descongelamento.

Tabela 3. Resultados das análises pós-descongelamento referentes à integridade das membranas plasmática e acrossomal de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador (n = 7) criopreservado em meio contendo 2,5 mM de cisteína e controle.

Variável	Tratamentos		
	Controle	Cisteína	P
MPI	12,5 \pm 2,6	15,1 \pm 2,6	0,99
ISRA	24,2 \pm 3,60	25,4 \pm 3,85	0,82
ICRA	0,8 \pm 0,2 ^a	4,7 \pm 1,6 ^b	0,02
LSRA	51,8 \pm 2,8	52,4 \pm 3,6	0,88
LCRA	23,2 \pm 3,5	17,5 \pm 2,6	0,19

MPI - membrana plasmática íntegra; ISRA - íntegro sem reação acrossomal; ICRA - íntegro com reação acrossomal; LSRA - lesado sem reação acrossomal; LCRA - lesado com reação acrossomal. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença (P < 0,05).

As motilidades progressiva e total foram significativamente maiores para CIS (P < 0,01), mas as variáveis relacionadas à linearidade (STR e LIN) foram superiores para as amostras controle (P < 0,05). Os resultados relativos à velocidade espermática (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF) dos espermatozoides após a criopreservação não foram alterados pela adição do antioxidante.

Com relação à integridade da membrana plasmática, não houve diferença entre controle e CIS.



Verificou-se diferença apenas entre o número de espermatozoides íntegros com reação acrossomal, o qual foi superior para CIS ($P < 0,05$).

Discussão

O sêmen de garanhões pode ser classificado, de acordo com os resultados de congelabilidade, em bons ou ruins em relação à congelabilidade do sêmen (Cocchia et al., 2011). Ball (2000) afirmou que 25 a 40% dos garanhões não são aprovados para criopreservação ou transporte de sêmen refrigerado devido à baixa sobrevivência espermática após armazenamento.

Como uma das causas apontadas para essa diminuição na viabilidade espermática, podem-se citar as EROS, que são geradas pelo metabolismo do oxigênio (Ball, 2000). Durante a criopreservação do sêmen do garanhão, ocorre um aumento na produção de EROS, tornando o espermatozoide um alvo fácil aos efeitos do estresse oxidativo (Baumber e Ball, 2001). Outro fator que ocorre na criopreservação é a retirada de grande parte do plasma seminal (Baumber e Ball, 2001), assim retiram-se quase por completo as enzimas escaneadoras que combatem as EROS.

Uma alternativa para melhorar a viabilidade do espermatozoide no processo após a retirada do plasma seminal, principal fonte de proteção contra as EROS, seria a recomendação da adição de antioxidantes ao meio de congelamento para auxiliar na proteção contra os efeitos das EROS (Bustamante-Filho et al., 2006; Oliveira et al., 2013; 2014), evitando ou minimizando a peroxidação lipídica na membrana celular (Sicherle et al., 2011) e outras séries de eventos que culminarão na perda de função e morte espermática (Kankofer et al., 2005).

A cisteína é um antioxidante não enzimático e precursor da biossíntese de glutatona, aumentando os níveis de glutatona reduzida (Bilodeau et al., 2001). A glutatona reduzida é capaz de agir diretamente nas EROS (Luberda, 2005) e é um cofator para glutatona peroxidase, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e do hidroperóxido, protegendo a célula do dano oxidativo. Com base nessa evidência, avaliou-se no experimento a ação da cisteína na viabilidade de espermatozoides equinos considerados de baixa congelabilidade, já que Oliveira et al. (2015a), mesmo trabalhando com sêmen refrigerado de garanhões de qualidade superior, obtiveram maiores resultados de motilidade e viabilidade espermática incorporando a cisteína ao diluente de refrigeração.

Os resultados, apresentados na Tab. 2, demonstram que a cisteína melhorou a motilidade progressiva ($4,66 \pm 0,84 \times 2,04 \pm 0,36$) e a motilidade total ($23,95 \pm 3,33 \times 11,38 \pm 2,35$), respectivamente, para o sêmen criopreservado com cisteína quando comparado ao controle, o que pode sugerir a influência protetora da cisteína na integridade funcional do axonema e das mitocôndrias, possibilitando, com isso, o aumento na motilidade do sêmen descongelado do grupo CIS. Oliveira et al. (2013), quando adicionaram glutatona em diferentes concentrações (2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10 mM) ao meio de congelamento, concluíram que a concentração de 2,5 mM havia melhorado a motilidade total e mostrado incremento na motilidade progressiva. Esses resultados reforçam os aqui apresentados, visto que a cisteína é um precursor da glutatona (Bansal e Bilaspuri, 2011). No entanto, para espermatozoides bovinos (Tuncer et al., 2010) e caninos (Neagu et al., 2011) a cisteína, nas concentrações de 5 mM e 10 mM, não alterou a motilidade espermática.

Embora a cisteína tenha melhorado as motilidades total e progressiva, os valores estão abaixo do que o preconizado pelo CBRA (2013), de motilidade superior a 30% pós-descongelamento, demonstrando que os sêmens dos garanhões utilizados no experimento são considerados de baixa congelabilidade. Gomes et al. (2002), quando utilizaram 15 garanhões da raça Mangalarga Marchador em um experimento que comparava dois diluentes de congelamento, obtiveram como motilidade progressiva 8,8% x 23,26% e como motilidade total 21,46 x 49%.

Com relação à integridade da membrana plasmática do espermatozoide, apresentada na Tab. 3, geralmente são observadas quedas esperadas nos valores após a criopreservação. Esse fato ocorre devido aos danos sofridos pela membrana plasmática em decorrência da formação de cristais de gelo e de mudanças intracelulares, que acontecem em virtude da desidratação, levando à morte celular (Amann e Pickett, 1987). Não houve diferença em relação à integridade da membrana acrossomal entre os grupos para íntegros sem reação acrossomal. Já Oliveira et al. (2013), Tuncer et al. (2010) e Neagu et al. (2011) observaram resultados de superioridade para integridade acrossomal quando incorporaram antioxidantes ao diluente de criopreservação.

Correlações fortemente positivas entre motilidade progressiva e parâmetros de velocidade indicam que o espermatozoide com boa velocidade linear progressiva percorre distâncias maiores em um curto período de tempo (Kathiravan et al., 2008). As variáveis VCL, VSL e a motilidade total dos espermatozoides de amostras de sêmen descongeladas estão positivamente correlacionadas com fertilidade (Verstegen et al., 2002). Neste trabalho, verificou-se que a adição da cisteína na concentração de 2,5 mM ao meio de congelamento não influenciou os resultados para os parâmetros VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR e LIN. Isso indica que os antioxidantes não atuaram na proteção dessas características contra as EROS ou que não houve produção significativa de EROS para desafiar as amostras do sêmen. Tuncer et al. (2010) observaram que os parâmetros VCL e VSL mantiveram-se preservados após a adição do antioxidante ao meio de congelamento, e Oliveira et al. (2013) conseguiram aumento de ambos os parâmetros ao adicionarem glutatona na concentração de 10 mM.



Conclusão

Embora não se tenha atingido a motilidade mínima pós-descongelamento preconizada pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, a adição de 2,5 mM de cisteína é uma alternativa para incrementar a qualidade pós-descongelamento do sêmen de garanhões considerado de baixa congelabilidade.

Agradecimentos

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial à Dr^a. Margot Alves Nunes Dode, e à Embrapa Centro de Tecnologia do Zebu Leiteiro, em especial ao Dr. Carlos Frederico Martins.

Referências

- 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.
- Ball BA, Gravance CG, Medina V, Baumber J, Liu IK.** Catalase activity in equine semen. *Am J Vet Res.*, v.61, p.1026-1030, 2000.
- Ball BA.** The effects of oxidative stress on equine sperm function, semen storage and stallion fertility. *J Equine Vet Sci.*, v.20, p.95-96, 2000.
- Bansal AK, Bilaspuri GS.** Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int.* v.2011, p.1-7, 2011.
- Baumber J, Ball BA.** Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. *Am J Vet Res.*, v.66, p.1415-1419, 2001.
- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirad MA.** Thiols prevent H₂O₂ mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v.56, p.275-286, 2001.
- Bustamante-Filho IC, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Mattos RC, Dutra-Filho CS, Jobim MIM.** Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. *Anim Reprod Sci.*, v.94, p.70-73, 2006.
- Candeias ML, Alvarenga MA, Carmo MT, Ferreira HN, Maior MRS, Torres Filho RA, Rodrigues ALR, Brandão FZ.** Semen cryopreservation protocols of Mangalarga Marchador stallions. *Rev Bras Zootec.*, v.41, p.1989-1995, 2012.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.** Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal: Manual de Orientação. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA. 2013. 104 pp.
- Cocchia N, Pasolini MP, Mancini R, Petrazzuolo O, Cristofaro I, Rosapane I, Sica A, Tortora G, Lorizio R, Paraggio G, Mancini A.** Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.75, p.1201-1210, 2011.
- Gomes GM, Papa FO, Macedo LP, Leão KM, Machado MS, Alvarenga MA.** Melhoria dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento com o meio MP-50 para sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.187-189, 2002.
- Harrison RAP, Vickers SE.** Use of fluorescent probes to assess membrana integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil.*, v.88, p.343-352, 1990.
- Heckenbichler S, Deichsel K, Peters P, Aurich C.** Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. *Theriogenology*, v. 75, p.849-856, 2011.
- Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C.** Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.63, p.1354-1365, 2005.
- Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin MJ, Veerapandian C.** Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.104-109, 2008.
- Klinc P, Rath D.** Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reprod Domest Anim.*, v.42, p.63-67, 2007.
- Luberda Z.** The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod. Biol*, v.5, p.5-17, 2005.
- Neagu VR, García BM, Rodríguez AM, Ferrusola CO, Bolaños G, Fernández LG, Tapia JÁ, Peña FJ.** Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. *Theriogenology*, v.75, p.10-16, 2011.
- Oliveira RA, Wolf CA, Viu MAO, Gambarini ML.** Addition of Glutathione to an Extender for Frozen Equine Semen. *J Equine Vet Sci*, v.33, p.1148-1152, 2013.
- Oliveira RA, Wolf CA, Piersanti RL, Viu MAO, Gambarini ML.** Glutathione for the freezing of cooled equine semen, using different protocols. *Anim. Reprod.*, v.11, p.104-109, 2014.



Oliveira RA, Wolf CA, Viu MAO, Gambarini ML. Cooling of equine semen at 16°C for 36h with the addition of cysteine. *Pferdeheilkunde*, v.31, p.27-32, 2015a.

Oliveira RA, Viu MAO, Gambarini ML. Cooling of equine semen at 16°C for 36 hours with addition of different glutathione concentrations. *Semina: Ciências Agrárias*, v.36, p.3699-3704, 2015b.

Sicherle CC, Maia MS, Bicudo SD, Rodella L, Azevedo HC. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or trolox. *Small Ruminant Res*, v.95, p.144-149, 2011.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
