

ÍNDICE DE PRENHEZ COM SÊMEN CONGELADO DE GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA USANDO GLICEROL OU DIMETILFORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES

RODRIGO ARRUDA OLIVEIRA¹, MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN², CARLOS ANTONIO MONDINO
SILVA³

¹Professor Doutor da Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. rodrigoarruda@unb.br

²Professora Doutora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

³Professor Doutor da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

RESUMO

O índice de prenhez utilizando sêmen criopreservado de garanhões é variável e, além disso, algumas raças apresentam baixa congelabilidade. Foram inseminadas 104 éguas, divididas em dois experimentos, para avaliar a fertilidade do sêmen congelado de garanhões da raça Criola (n=5), com 5% de dimetilformamida (DMF) ou 5% de glicerol (GLI), como crioprotetores. No Experimento I, as inseminações foram conduzidas pré-ovulação com sêmen fresco e criopreservado com DMF. No Experimento II, as éguas foram inseminadas pós-ovulação com sêmen fresco, DMF e GLI. As inseminações com sêmen congelado foram realizadas no ápice do corno uterino e as éguas do grupo controle foram inseminadas no corpo do útero com sêmen fresco. Para a avaliação dos índices de prenhez dos grupos, utilizou-se um ciclo estral/animal. O diagnóstico de gestação foi realizado por meio de ultrassonografia transretal no 15^o

dia pós-ovulação. A motilidade média pós-descongelamento foi de 40% e 20%, respectivamente, para o sêmen congelado com DMF e GLI (P<0,05). Todos os garanhões tiveram motilidade superior no pós-descongelamento quando se utilizou a DMF. No Experimento I, o índice de prenhez foi de 12% (5/42) e 62% (20/32), respectivamente, para DMF e sêmen fresco (P<0,0001). No Experimento II, o índice de prenhez foi de 70% (7/10; P<0,05) para o sêmen fresco, 40% para o congelado com DMF (4/10; P<0,05) e 10% com GLI (1/10). A inseminação com sêmen congelado realizada com controle folicular mais frequente apresentou os melhores resultados. A baixa motilidade dos espermatozoides pós-descongelamento foi atribuída ao GLI utilizado no Experimento II. A DMF pode ser utilizada como uma alternativa ao congelamento do sêmen de garanhões da raça Criola.

PALAVRAS-CHAVE: Criopreservação; crioprotetores; equino; espermatozoide; inseminação artificial.

PREGNANCY RATES USING FROZEN SEMEN OF CRIOLLO STALLIONS WITH GLYCEROL OR DIMETHYLFORMAMID AS CRYOPROTECTANTS

ABSTRACT

Pregnancy rates using stallions's frozen semen are variable; moreover, some breeds present low freezability. One hundred and four (104) mares were inseminated and separated into two experiments to evaluate fertility of frozen semen's of Criollo stallions (n=5), with 5% of dimethylformamide (DMF) or 5% of glycerol (GLY) as cryoprotectants. In Experiment I, the inseminations were made during pre-ovulation with fresh and frozen semen with DMF. In Experiment II, the mares were inseminated

during post-ovulation with fresh semen, DMF and GL. The inseminations with frozen semen were performed deep in the uterine horn *ipsilateralis* to the dominant follicle. Control mares were inseminated with fresh semen in the uterus. Only one estrus period per mare was used to evaluate the pregnancy rates of the groups. Pregnancy diagnosis through ultrasonography was performed on the 15th day post-ovulation. The mean post-thawing motility was 40% and 20%, respectively, for frozen semen with

DMF and GLY ($P<0.05$). All stallions had higher post-thawing motility when using DMF. In Experiment I, pregnancy rates were 12% (5/42) and 62% (20/32), respectively for DMF and fresh semen ($P<0.0001$). In Experiment II, pregnancy rates were 40% (4/10), 10% (1/10) and 70% (7/10), respectively for DMF, GLY

($P<0.05$) and fresh semen ($P<0.0001$). Insemination with frozen semen performed with more frequent follicular control showed the best results. The low sperm motility after thawing was attributed to the GLY used in experiment II. The DMF can be used alternatively to Criollos Stallion's semen freezing.

KEYWORDS: Artificial insemination; cryopreservation; cryoprotectant; equine; spermatozoa.

INTRODUÇÃO

O armazenamento de sêmen por longo tempo recebeu avanços significativos em meados do século passado, mediante o uso do glicerol como crioprotetor (POLGE et al., 1949). O congelamento de sêmen, importante em programas de melhoramento animal, viabiliza a preservação de material genético e auxilia a transpor barreiras relacionadas à infertilidade masculina. Com exceção da espécie bovina, baixas taxas de prenhez têm sido obtidas com sêmen congelado, já que a viabilidade e a fertilidade dos espermatozoides são reduzidas em consequência de lesões que ocorrem durante o processo de congelamento (HOLT, 2000; MILLER, 2008).

O índice de prenhez por ciclo, com sêmen equino congelado é variável e oscila entre 25 e 40%. Adicionalmente, sabe-se que o sêmen de alguns garanhões apresenta baixa viabilidade após o descongelamento (HOFFMANN et al., 2011).

A primeira prenhez obtida com sêmen equino congelado foi relatada há cinco décadas (BARKER & GANDIER, 1957). A partir desse importante marco científico, várias técnicas foram testadas para a criopreservação espermática utilizando-se diferentes forças e diluentes de centrifugação, curvas de refrigeração, diluentes de congelamento, crioprotetores e suas concentrações, bem como protocolos de descongelamento (MARTIN et al., 1979; SAMPER & MORRIS, 1998; SQUIRES et al., 2004; VIDAMENT, 2005; SIEME et al., 2008; RODRÍGUEZ et al., 2011).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado no congelamento do sêmen de garanhões (SIEME et al., 2008), apesar de poder ter efeitos tóxicos sobre os espermatozoides, assim como efeito contraceptivo na égua, reduzindo a fertilidade do sêmen equino quando adicionado aos diluentes (BEDFORD et al., 1995, GLAZAR et al., 2009), em altas concentrações (VIDAMENT, 2005). O espermatozoide, entretanto, não consegue

sobreviver ao congelamento sem um crioprotetor. Nos últimos anos, buscaram-se crioprotetores menos tóxicos ao espermatozoide do garanhão que o glicerol. Entre esses podem ser citados o etilenoglicol, dimetilsulfóxido e a dimetilformamida (SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005; GLAZAR et al., 2009; HOFFMAN et al., 2011; RODRÍGUEZ et al., 2012), que pertencem ao grupo das amidas, as quais possuem menores viscosidade e peso molecular quando comparadas ao glicerol, conseqüentemente, uma maior permeabilidade através da membrana (SQUIRES et al., 2004), o que diminui a possibilidade de danos celulares pelo estresse osmótico (BALL & VO, 2001).

Objetivou-se avaliar *in vivo* a viabilidade do sêmen de garanhões da raça Crioula, submetidos à criopreservação, utilizando-se glicerol ou dimetilformamida, sobre o índice de prenhez de éguas submetidas a inseminação artificial antes e após a ovulação.

MATERIAL E MÉTODOS

Nas estações reprodutivas de 2005 e 2006 (outubro a novembro), nos municípios de Uruguaiana (latitude 29°45'17''S e longitude 57°05'18''W) e Barra do Quaraí/RS (latitude 30°11'59''S e longitude 57°31'12''W), cinco garanhões da raça Crioula (entre 6 e 9 anos) foram utilizados para colheita e congelamento do sêmen, utilizando-se dois crioprotetores penetrantes: o glicerol (GLI), que é um crioprotetor alcoólico, e a dimetilformamida (DMF), que é uma amida (SILVA & GUERRA, 2011). Éguas mestiças da raça Crioula ($n=104$) com idade entre 5 e 15 anos, peso entre 350 a 460 Kg e trato reprodutivo clinicamente normal, foram utilizadas para a inseminação artificial (IA) após seleção por palpação e ultrassonografia transretal. As éguas e os garanhões foram alocados em piquetes com pastagem nativa, recebendo suplementação mineral.

Antes das colheitas para criopreservação, foi realizado o esgotamento das reservas espermáticas extragonadais, com colheitas em dias alternados por sete dias. Todos os animais foram submetidos à avaliação andrológica, atendendo aos padrões do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Foram realizadas cinco colheitas de sêmen, em dias alternados, de cada garanhão, totalizando 25 ejaculados criopreservados.

Imediatamente após a colheita de sêmen, foram analisados o volume, aspecto (cor e densidade), odor, concentração e morfologia espermática. Todos os ejaculados utilizados apresentaram média de 40 mL, de coloração gris e aspecto soroso. A motilidade total e o vigor espermático foram avaliados em microscópio óptico, sendo utilizados apenas os ejaculados com motilidade total $\geq 60\%$ e vigor ≥ 4 .

A avaliação da morfologia espermática foi realizada pela técnica de câmara úmida, onde o sêmen foi diluído em formol salina tamponado, previamente aquecido a temperatura do sêmen (37°C), na proporção de 1:20 (sêmen:formol salina). Uma gota de sêmen foi depositada entre lâmina e lamínula, procedendo-se à contagem de 200 células de cada lâmina, avaliando-se o percentual de espermatozoides morfológicamente anormais, classificando em defeitos maiores e menores (CBRA, 1998).

A colheita de sêmen foi feita com vagina artificial modelo *Hannover*. Um filtro de náilon foi acoplado ao copo coletor para obtenção do sêmen livre da fração gel. O ejaculado foi dividido em duas alíquotas, sendo uma diluída em meio à base de leite em pó desnatado, glicose e bicarbonato de sódio¹ (KENNEY et al., 1975) e destinada à IA das éguas do grupo-controle (sêmen fresco) e a outra submetida à criopreservação.

O sêmen destinado à criopreservação foi diluído na proporção de 1:1 com EDTA-Glicose (MARTIN et al., 1979) e centrifugado a 600 g por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido em meio à base de gema de ovo e aminoácidos² (PALMER, 1984). Essa solução foi subdividida em duas alíquotas de igual volume, acrescidas de 5% de dimetilformamida (DMF) ou 5% de glicerol (GLI). O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL, com concentração ajustada para 200×10^6

espermatozoides/mL, utilizando-se a câmara de Neubauer (CBRA, 1998). As palhetas foram lacradas, distribuídas em uma plataforma-suporte e estabilizadas a 5°C , em refrigerador comercial, por 1 h. Para o congelamento, a plataforma foi exposta ao vapor de nitrogênio líquido, com as palhetas posicionadas horizontalmente a 6 cm acima do nível de nitrogênio líquido, por 15 minutos. Logo em seguida, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido, acondicionadas nas raques e estocadas em botijão criogênico a -196°C .

No Experimento I, foram inseminadas 74 éguas, sendo que em 42 utilizou-se o sêmen congelado com 5% de DMF e em 32, sêmen fresco (controle). Todas as éguas foram inseminadas com os diferentes ejaculados dos cinco garanhões. No Experimento II, foram inseminadas 30 éguas, sendo que 10 foram inseminadas com sêmen fresco (controle), 10 com sêmen congelado com 5% de DMF e 10 com 5% de GLI. Todas as éguas foram inseminadas com os diferentes ejaculados dos cinco garanhões.

Nos dois experimentos, o trato reprodutivo foi examinado após o início do cio por palpação e ultrassonografia transretais em dias alternados, até a detecção de folículos $\geq 30\text{mm}$ de diâmetro. A partir desse momento, o exame foi realizado diariamente para que a inseminação artificial fosse realizada próxima da ovulação. As éguas dos grupos do sêmen congelado que apresentavam um folículo $\geq 30\text{ mm}$ de diâmetro e edema uterino 3 (1 a 3), no dia do controle folicular, receberam 2.500 UI de hCG³ pela via intravenosa. No Experimento I, as inseminações foram realizadas 24 h após a indução da ovulação. No Experimento II, 24 h após a indução da ovulação, as éguas foram examinadas a cada 6 h e inseminadas após a detecção da ovulação. As fêmeas do grupo controle não receberam hCG e foram inseminadas com sêmen fresco a cada 48 h, até a detecção da ovulação. Todas as éguas ovularam entre 36 e 48 h após a indução da ovulação.

As inseminações com sêmen congelado foram efetuadas com pipeta flexível⁴ de 65 cm de comprimento, guiada por via transretal, posicionada no ápice do corno uterino *ipsilateral* ao folículo pré-ovulatório, com 200×10^6 espermatozoides totais. Nas éguas do grupo controle, as inseminações foram realizadas com pipeta de inseminação rígida para equinos⁵ e o

¹ Equidil – Embryolab/UFSM – Santa Maria/RS

² FR4 – Nutricell Nutrientes Celulares – Campinas/SP

³ Vetecor 5000 UI – Hertape Calier Saúde Animal S.A. – Juatuba/MG

⁴ Minitub do Brasil Ltda – Porto Alegre/RS

⁵ Provar Produtos Veterinários – São Paulo/SP

sêmen foi depositado no corpo do útero, na mesma concentração do sêmen congelado.

Para avaliação *in vitro* do sêmen, realizou-se o descongelamento de uma palheta a 37°C por 30 segundos e a deposição de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas. Com auxílio de um microscópio ótico, estimou-se o vigor espermático e a motilidade total e retirada de amostra para morfologia espermática. A avaliação *in vivo* do sêmen foi efetuada pelo índice de prenhez, obtido através da ultrassonografia no 15º dia pós-ovulação. Esse exame foi repetido após duas semanas, para confirmação da prenhez.

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (2000). Para as análises de motilidade pós-descongelamento, foi utilizado o teste não paramétrico U-TEST (*Mann-Whitney*). Os resultados da inseminação artificial foram submetidos ao estudo de dispersão de frequência com o uso do Teste Exato de Fisher, por meio do procedimento FREQ.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual médio de motilidade total na avaliação pós-descongelamento foi de 40% com a DMF e 20% com o GLI. A motilidade pós-descongelamento foi superior ($P < 0,05$) para todos os garanhões, quando se utilizou a dimetilformamida, indicando, provavelmente, um menor dano à célula espermática (HOFFMAN et al., 2011). Resultados semelhantes foram encontrados por MEDEIROS et al. (2002), que, ao avaliarem diferentes crioprotetores para a criopreservação do ejaculado de 20 garanhões de diferentes raças, observaram 27% de células móveis pós-descongelamento com o glicerol e 52% com dimetilformamida ($P < 0,05$). Em 55 garanhões de diferentes raças, usando como crioprotetores 5% de glicerol, ou 5% de dimetilformamida, ALVARENGA et al. (2005) verificaram motilidade progressiva superior com a dimetilformamida. Os autores citam que a frequência de garanhões com motilidade pós-descongelamento superior a 40% foi de 38% (21/55) para o sêmen congelado com o glicerol e 72% (40/55) para a dimetilformamida.

Não foram verificadas alterações na

morfologia espermática, com 80,57%; 79,80% e 79,5% de espermatozoides normais, para o sêmen fresco e criopreservado com 5% de DMF e 5% de GLI, respectivamente ($P > 0,05$). Fato constatado novamente para os defeitos maiores, 7,81%; 8,51% e 9,93% para grupo controle, DMF e GLI, respectivamente ($P > 0,05$).

Dentre as amidas mais pesquisadas, a DMF é um crioprotetor de menor peso molecular que o GLI e que deve penetrar através da membrana plasmática mais rapidamente (SQUIRES, 2005; GLAZAR et al., 2009; HOFFMAN et al., 2011), o que leva a uma proteção mais eficaz da célula espermática, como foi observado no presente experimento, com motilidade pós-descongelamento e índice de prenhez superiores quando se utilizou a DMF. Contudo, autores como VIDAMENT et al. (2002) relataram que a combinação dos crioprotetores DMF e GLI é mais efetiva que o seu uso isoladamente, o que é observado nos diluentes comerciais nacionais. SQUIRES et al. (2004) demonstraram que a metilformamida, dimetilformamida e o etilenoglicol foram tão eficazes quanto o glicerol na proteção ao espermatozoide equino. MEDEIROS et al. (2002) e GOMES et al. (2002) constataram que a dimetilformamida e a metilformamida melhoraram a congelabilidade do sêmen equino.

No presente trabalho, as inseminações com sêmen congelado foram realizadas no ápice do corno uterino com auxílio de pipeta flexível, metodologia similar à preconizada por BUCHANAN et al. (2000), já que o número de espermatozoides encontrados na tuba uterina após inseminação no corpo do útero com sêmen congelado é bem inferior àquela efetuada próximo à junção útero-tubárica. A pipeta flexível atingiu o sítio de deposição do sêmen em todas as inseminações, sendo que a adequada aplicação depende da experiência do técnico. Devido a isso, apenas um técnico conduziu todas as inseminações.

No Experimento I, foram obtidas 12% (5/42) de gestações para o sêmen congelado com dimetilformamida e 62% (20/32; $P < 0,0001$) no grupo de éguas inseminadas com sêmen fresco (Tabela 1).

Tabela 1 – Índice de prenhez ao 15^o dia após inseminação artificial de éguas mestiças Crioulas sob diferentes manejos do sêmen fresco (controle) ou congelado com 5% de dimetilformamida ou com 5% de glicerol de cinco garanhões da raça Crioula

	Índice de prenhez à inseminação artificial (%)			Valor de P
	Sêmen fresco	5% Dimetilformamida	5% Glicerol	
Experimento I (n=74)	62% (20/32) ^a	12% (5/42) ^b	-	<0,0001
Experimento II (n=30)	70% (7/10) ^a	40% (4/10) ^a	10% (1/10) ^b	<0,05

Letras diferentes na linha indicam diferenças (Teste Exato de Fisher)

No Experimento II, das 30 éguas inseminadas (Tabela 1), foram obtidas 40% (4/10) de gestações com a DMF, 10% (1/10) com o GLI e 70% (7/10) no grupo controle ($P < 0,0001$). O maior índice de prenhez com DMF no Experimento II pode ser explicado devido a IA mais próxima da ovulação, com as inseminações ocorrendo no máximo 6h pós-ovulação. VIDAMENT et al. (2009) obtiveram taxa de prenhez superior com a dimetilformamida (11%) quando comparada ao glicerol (0%; $P < 0,05$), resultados corroborados no Experimento II.

Índices de prenhez similares (46% e 50%) foram relatados por VIDAMENT et al. (2002) para éguas inseminadas a cada 24 h, com 400×10^6 espermatozoides, congelados com GLI e DMF (2%), respectivamente, mesmo com concentrações de crioprotetores inferiores às utilizadas no presente trabalho. MEDEIROS et al. (2003), ao inseminar 30 éguas até 6h pós-ovulação com 800×10^6 de espermatozoides totais (quatro vezes mais que a dose utilizada nos Experimentos I e II) e motilidade total pós-descongelamento de 48% e 18%, obtiveram 40% (6/15) e 0% (0/15) de éguas gestantes para os diluentes contendo DMF e GLI, respectivamente. Protocolos de criopreservação de sêmen de diferentes países, métodos de congelamento e manejos para inseminação com sêmen congelado foram comparados por SIEME et al. (2008), que concluíram não haver um padrão, demonstrado por inúmeras diferenças no processamento do sêmen para criopreservação.

O intervalo entre os exames para o controle do desenvolvimento folicular, efetuado a cada 24h, pode ter sido o principal fator a influenciar o desempenho das inseminações artificiais com sêmen congelado no Experimento I, ao contrário do verificado por VIDAMENT et al. (2002), embora esses autores tenham trabalhado com o dobro do número de espermatozoides na dose inseminante. Devido à longevidade do ócito equino ser de aproximadamente 8 a 10 horas (HUNTER, 1990), quando as inseminações foram realizadas próximo à ovulação, como ocorreu no Experimento II, o índice de prenhez foi superior.

A diferença dos resultados obtidos quanto

aos crioprotetores neste experimento, para as variáveis motilidade pós-descongelamento e índice de prenhez foram semelhantes aos achados de GOMES et al. (2002) e MEDEIROS et al. (2003), respectivamente, com equinos da raça Mangalarga Marchador, em que a maior parte dos garanhões apresentou baixa congelabilidade com o uso do glicerol como crioprotetor.

No Experimento II, a melhora da motilidade espermática pós-descongelamento com a DMF refletiu-se em melhora da fertilidade, resultado também encontrado por MEDEIROS et al. (2003). Uma das hipóteses para os resultados alcançados está relacionada à maior ação das amidas na célula espermática, que devido ao seu menor peso molecular ter maior permeabilidade à membrana plasmática, causando menor dano celular quando comparado ao glicerol; entretanto, o mecanismo de ação ainda não foi determinado (HOFFMAN et al., 2011). BALL & VO (2001) observaram que os espermatozoides de garanhões são consideravelmente sensíveis aos danos osmóticos causados pelo GLI.

SQUIRES (2005) enfatiza que é improvável que a adição de uma única substância ao meio de congelamento possa melhorar drasticamente a motilidade e a fertilidade pós-descongelamento. Contudo, parece razoável supor que a adição de antioxidantes, aminoácidos e, talvez, o uso de crioprotetores intracelulares alternativos, como as amidas, possam melhorar a congelabilidade do sêmen de alguns garanhões.

A comparação entre trabalhos é extremamente difícil, pois, com raras exceções, encontram-se trabalhos na literatura com a mesma metodologia de congelamento ou de inseminação. A variação entre raças, concentrações de crioprotetores e composição dos diluentes dificulta a comparação com outros trabalhos de diferentes países.

CONCLUSÃO

A utilização da dimetilformamida para criopreservação do sêmen de garanhões da raça Crioula resultou em motilidade pós descongelamento

superior e em índices de prenhez maiores, quando comparada com a utilização do glicerol, em protocolos de inseminação 6h pós-inseminação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio do Sr. Fernando Faria Correa e Jorge Martins Bastos, assim como o Médico Veterinário Fernando Rebés Velo Filho, por cederem garanhões, éguas, instalações, materiais e equipamentos, assim como pelo apoio logístico e técnico para o desenvolvimento do trabalho.

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**, v.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**, v.22, p.1061-1069, 2001.
- BARKER, A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.21, p.47-51, 1957.
- BEDFORD, S.J.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.43, p.955-967, 1995.
- BUCHANAN, B.R.; SEIDEL Jr., G.E.; McCUE, P.M.; SCHENK, J.L.; HERICKHOFF, L.A.; SQUIRES, E.L. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1333-1344, 2000.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**: manual de orientação. 2. ed. Belo Horizonte, MG, 1998. 49 p.
- GLAZAR, A.I.; MULLEN, S.F.; LIU, J.; BENSON, J.D.; CRITSER, J.K.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, v.59, p.201-206, 2009.
- 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 the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.
- HOFFMANN, H.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. **Animal Reproduction Science**, v.125, p.112-118, 2011.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.
- HUNTER, R.H.F. Gamete lifespans in the mare's genital tract. **Equine Veterinary Journal**, v.22, p.378-379, 1990.
- KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary finding. In: ANNUAL AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS CONVENTION, 21., 1975, San Antonio. **Anais...** Lexington: American of Equine Practitioners, 1975. p.327-336.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl.,v.27, p.47-51, 1979.
- MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.273-276, 2002.
- MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A.; ALVARENGA, F.C.L.; PAPA, F.O. Avaliação da integridade acrossomal de espermatozoides de garanhões criopreservados com crioprotetores a base de amidas e glicerol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.353-354, 2003.
- MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. **Theriogenology**, v.70, p.463-468, 2008.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666, 1949.
- RODRÍGUEZ, A.M.; FERRUSOLA, C.O.; GARCÍA, B.M.; MORRELL, J.M.; MARTÍNEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Freezing stallion semen with the new Cáceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability. **Animal Reproduction Science**, v.127, p.78-83, 2011.
- RODRÍGUEZ, A.M.; SILVA, C.B.; MÁCIAS-GARCÍA, B.; BOLAÑOS, J.M.G.; TAPIA, J.A.; APARICIO, I.M. Dimethylformamide improves the in vitro characteristics of thawed stallion spermatozoa reducing sublethal damage. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.995-1002, 2012.
- SAMPER, J.C.; MORRIS, C.A. Current methodology for stallion semen cryopreservation: an international survey. **Theriogenology**, v.49, p.895-904, 1998.
- SAS INSTITUTE INC – **Statistical Analysis System – SAS**. User's Guide. Versão 8.0, 4.ed. North Caroline, 2000. 295p.
- SIEME, H.; HARRISON, R.A.P.; PETRUNKINA, A.M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Animal Reproduction**

Science, v.107, p.276-292, 2008.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1056-1065, 2004.

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

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P.

Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethylformamide. **Theriogenology**, v.58, p.249-251, 2002.

VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.115-136, 2005.

VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; MARTIN, F.X.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.22-35, 2009.

Protocolado em: 13 jun. 2012. Aceito em: 12 ago. 2013.