

EFEITO DE DIFERENTES DILUENTES NA MANUTENÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN EQUINO EM DOIS SISTEMAS DE REFRIGERAÇÃO PASSIVA

MARCEL CAVALCANTI FARRÁS,¹ BRUNO RIBEIRO AVANZI,² CELY MARINI MELO,³
JOSÉ ANTÔNIO DELL'AQUA⁴ E FREDERICO OZANAM PAPA⁵

1. Médico veterinário UNESP/FMVZ

2. Médico veterinário UNESP/FMVZ

3. Mestre, bolsista da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

4. Pós-doutorando FMVZ/UNESP

5. Professor doutor da FMVZ/UNESP

RESUMO

A utilização da biotecnologia de sêmen equino refrigerado e transportado tem apresentado um crescimento significativo na equídeocultura mundial, no tocante às inúmeras vantagens e inovações que a técnica tem proporcionado. O presente experimento teve como objetivo avaliar diferentes meios de refrigeração (Botu-Semen[®], Botu-Turbo[®] e INRA 96[®]) em dois sistemas de transporte de sêmen refrigerado (Botu-Box[®] e Botutainer[®]). Foram utilizados três ejaculados de quatro garanhões de diferentes raças, submetidos à análise computadorizada da motilidade to-

tal e progressiva, bem como da integridade da membrana plasmática, pela técnica de epifluorescência, nos momentos 0, 6, 12 e 24 horas após a colheita. De acordo com os resultados obtidos para os parâmetros espermáticos, não se observaram diferenças significativas entre os sistemas de refrigeração e os meios testados, concluindo-se que tanto os sistemas de refrigeração como os diluentes foram eficazes na manutenção da motilidade e viabilidade espermática, apresentando-se como alternativas à biotecnologia de transporte de sêmen equino refrigerado.

PALAVRAS-CHAVES: Diluente, equino, refrigeração de sêmen, sistema de transporte.

ABSTRACT

EFFECT OF DIFFERENT EXTENDERS ON SPERM VIABILITY OF EQUINE SEMEN COOLED IN TWO DIFFERENT CONTAINERS

The use of equine cooled transported semen is increasing significantly in the whole world; this is in consequence of the advantages and improvement of the cooling semen technology. The aim of the present study was to compare three commercial extenders for cooling equine semen (Botusemen[®], Botu-Turbo[®] e INRA 96[®]) using two Brazilian commercial containers (Botu-Box[®] e Botutainer[®]) for cooling and storage. Three ejaculates from four stallions from different breeds were used. The samples were evaluated at 0, 6, 12 and 24 hours using CASA for

estimate the total and progressive motility and the plasma membrane integrity assessed using fluorescent probes. According to the results, there was no difference on sperm parameters ($P>0.05$) when comparing both the cooling/storage containers and the extenders used. Thus, is possible to conclude that the extenders and the containers were efficient on maintaining the motility and viability of semen cooled/stored during 24 hours, being a new proposal for equine cooled semen technology.

KEY WORDS: Container, cooled semen, equine, extender.

INTRODUÇÃO

A tecnologia de refrigeração do sêmen eqüino tem sido estudada pelo interesse na manutenção do potencial fertilizante do sêmen eqüino durante um período prolongado (BATELLIER et al., 2001), dando maior flexibilidade ao proprietário do garanhão para colher e enviar o sêmen em momento oportuno (PICKETT, 1992). O diluidor mundialmente utilizado para a refrigeração é composto por leite em pó desnatado (KENNEY et al., 1975).

A utilização do sêmen refrigerado apresenta vantagens, como a redução com os gastos inerentes ao transporte e hospedagem de animais, a diminuição do estresse pelo transporte destes, bem como os riscos com acidentes e aquisição de doenças resultantes da exposição a patógenos de um novo ambiente (BRINSKO & VARNER, 1992).

CARVALHO et al. (2005) desenvolveram um estudo que avaliou a eficácia de diversos diluentes, com ou sem a adição do aminoácido taurina, sobre a viabilidade espermática do sêmen eqüino, a intervalos de 24 horas, durante 96 horas. Os resultados laboratoriais demonstraram que o diluente à base de glicina leite desnatado, acrescido do aminoácido taurina, apresentou resultados superiores dos parâmetros espermáticos e da fertilidade, quando comparado ao diluente à base de leite desnatado-glicose.

O sêmen eqüino geralmente é transportado em dispositivos de refrigeração passiva como o Equitainer[®], que resfria a amostra de sêmen a uma taxa inicial de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984). De acordo com KAYSER et al. (1992), o sêmen eqüino pode ser refrigerado rapidamente de 37 a 20°C , respeitando o intervalo entre 20 a 5°C , com queda da temperatura menor que $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. De acordo com KATILA (1997), o sêmen eqüino pode ser refrigerado rapidamente de 35 a 19°C , mas à medida que atinge temperaturas entre 9 e 8°C o espermatozóide eqüino é muito sensível ao choque frio, devendo a taxa de refrigeração ser diminuída para $-0,05^{\circ}\text{C}$ por minuto.

Com relação ao período de armazenamento, se a inseminação ocorrer até doze horas após a

colheita, o sêmen pode ser armazenado a 20°C ou a 5°C . Entretanto, para estocagem por tempo superior a doze horas, o sêmen deve ser refrigerado lentamente até 5°C . O armazenamento entre 4 e 5°C é melhor para a manutenção da viabilidade das células espermáticas que a temperaturas mais baixas, entre 0 ou 2°C (SQUIRES et al., 1999).

MACHADO et al. (2002) desenvolveram um novo sistema de refrigeração passiva composto por duas caixas de isopor – uma interna medindo $15 \times 11 \text{cm}$ e a externa $25 \times 16 \text{cm}$. Como fonte de gelo os autores compararam o gelo reciclável gelatinoso e o gelo derivado de polímero - Ice Foam[®]. Como controle foi utilizado o sistema de refrigeração disponível comercialmente nos Estados Unidos – Equine Express[®]. Os autores comprovaram que o dispositivo com gelo Ice Foam[®] realizou uma curva de refrigeração de $-0,02^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sendo eficaz na manutenção da temperatura (16°C por período superior a 24 horas). Outro fator relevante foi a manutenção da motilidade e viabilidade espermáticas durante o período avaliado, mostrando-se superior ao sistema Equine Express[®]. Com isso, demonstrou-se que esse sistema é uma alternativa economicamente viável para o transporte de sêmen eqüino refrigerado, em relação aos sistemas importados.

O presente experimento teve como objetivo avaliar diferentes meios de refrigeração (Botusemen[®]; Botu-Turbo[®] e INRA 96[®]) em dois sistemas de transporte de sêmen refrigerado comercializados no Brasil (Botu-box[®] e Botutainer[®]).

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se três ejaculados de quatro garanhões com idade entre 5 e 20 anos, de diferentes raças – Quarto de Milha, Westfallen, Árabe e Hannoverano –, pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Eqüina (CERBEQ), do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu, SP. Os ejaculados foram colhidos com vagina artificial (Biotech Botucatu / ME Ltda. – Botucatu, SP, Brasil) e, em seguida, filtrados. Os parâmetros espermáticos de motilidade total e progressiva foram obtidos através da análise computadorizada

(HTM-IVOS-10) e a integridade da membrana plasmática avaliada pela técnica de epifluorescência (ZÚCCARI, 1998). Para a análise computadorizada da motilidade, depositaram-se 10 μ L de sêmen em câmara de Makler, pré-aquecida a 37°C, considerando-se a média de cinco campos por amostra. A concentração espermática foi estimada através da contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se uma taxa de diluição de 1:20 (sêmen: água destilada e deionizada).

Após a análise inicial, diluíram-se os ejaculados e obteve-se uma concentração de 50x10⁶ espermatozoides/mL, em três meios: Botu-Semen[®]; Botu-Turbo[®] e INRA 96[®]. Transferiram-se três alíquotas de 1mL de cada meio testado para tubos de microcentrífuga-minicentrífuga (microcentrífuga é descrito pelo próprio fabricante dos tubos) de 1,5mL e separadas em bolsas plásticas, de acordo com os momentos de avaliação, objetivando preservar a temperatura por ocasião da abertura dos dispositivos de refrigeração. Foram utilizados dois sistemas comerciais de refrigeração passiva Botutainer[®] e Botu-Box[®] (Biotech Botucatu / ME Ltda. – Botucatu, SP, Brasil). O sistema Botutainer[®], de acordo com o fabricante, mantém a temperatura em torno de 5°C, durante 24 horas; já o sistema Botu-Box[®] mantém a temperatura de 15°C, durante o mesmo período. De acordo com as especificações do fabricante, para que a curva de refrigeração seja adequada, é necessário que o volume final de sêmen seja equivalente a 100mL. Assim, bolsas plásticas com água destilada contendo 91mL foram inseridas em ambos os sistemas e as amostras refrigeradas durante seis, doze e 24 horas. Após cada período de refrigeração, mantiveram-se as amostras em banho seco a 37°C, durante dez minutos, previamente à análise computadorizada da motilidade e da integridade da membrana plasmática.

As curvas de refrigeração foram determinadas com o auxílio de um termômetro digital (INCOTERM[®], Porto Alegre, RS, Brasil), sendo aferidas a temperatura ambiente e a dos sistemas de refrigeração, a intervalos de sessenta minutos, durante 24 horas.

Procedeu-se à comparação dos dados de motilidade total, motilidade progressiva e inte-

gridade da membrana plasmática, nos três meios e nos diferentes momentos, após refrigeração nos dois sistemas, pela análise de variância para três fatores (Three Way ANOVA). A comparação entre os dois sistemas de refrigeração nos diferentes momentos foi realizada pelo teste-t pareado, uma vez que os dados passaram pelo teste de normalidade de Kolmogorof-Smirnoff. Aplicaram-se os testes em nível de significância de 5% (SAS, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos resultados verificou-se que a motilidade total, motilidade progressiva e a integridade da membrana plasmática, durante os períodos de seis, doze e 24 horas, em ambos os sistemas de refrigeração e nos três diluentes de refrigeração testados, não diferiram significativamente (Tabela 1). As curvas de refrigeração dos sistemas de transporte mensuradas no presente trabalho estão demonstradas na Figura 1. Não houve interação entre as variáveis ganhão, sistemas de refrigeração e meios diluidores, nos diferentes momentos.

Sabe-se que a motilidade espermática e a capacidade fecundante não possuem uma correlação absoluta, tornando a avaliação da motilidade menos precisa do que a fertilidade das amostras de sêmen para se estimar a viabilidade espermática (CARVALHO & PAPA, 2003). Porém, JASKO et al. (1992) encontraram, através da análise computadorizada, uma correlação entre algumas características de movimento, como motilidade total, motilidade progressiva e velocidade média (VAP) com fertilidade. Dessa forma, o uso da análise computadorizada conferiu maior acuidade às avaliações, evitando as imprecisões e influências associadas à análise subjetiva.

Uma variedade de diluentes com a combinação de diversos componentes (açúcares, eletrólitos, tampões, gema de ovo, leite, antioxidantes, etc.) tem sido desenvolvida com o intuito de melhorar a qualidade de sêmen equino refrigerado, mantendo as qualidades do movimento e a integridade das membranas espermáticas, melhorando com isso a fertilidade (PADILLA & FOOTE,

1991; BATELLIER et al., 1997; BATELLIER et al., 2001; RIGBY et al., 2001; CARVALHO et al., 2005; MACEDO et al., 2005; AVANZI et al., 2006; PAGL et al., 2006).

TABELA 1. Valores médios (\pm desvio-padrão) da motilidade total, motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática do sêmen equino, frente a três diluentes, mantido em dois sistemas de refrigeração, por 24 horas ($p > 0,05$)

Diluentes*	Sêmen	Botubox®			Botutainer®		
		Motilidade total (%)			Motilidade total (%)		
	Fresco	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
BS	85,92 \pm 4,87	82,08 \pm 5,79	82,33 \pm 5,47	82,25 \pm 6,19	83,00 \pm 6,32	84,08 \pm 5,75	81,83 \pm 6,82
BT	85,92 \pm 4,87	80,43 \pm 7,54	80,75 \pm 5,31	79,83 \pm 7,17	82,75 \pm 5,97	82,83 \pm 5,89	81,25 \pm 5,31
INRA 96®	85,92 \pm 4,87	79,67 \pm 5,99	80,08 \pm 5,11	77,25 \pm 6,22	79,75 \pm 5,33	80,08 \pm 6,39	77,92 \pm 5,93
		Motilidade progressiva (%)			Motilidade progressiva (%)		
		6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
BS	36,83 \pm 6,77	36,75 \pm 5,38	38,67 \pm 12,90	37,25 \pm 8,73	34,58 \pm 8,43	35,83 \pm 8,69	36,42 \pm 13,51
BT	36,83 \pm 6,77	35,42 \pm 10,84	35,92 \pm 6,32	37,50 \pm 9,37	37,50 \pm 9,13	35,67 \pm 11,02	39,92 \pm 11,03
INRA 96®	36,83 \pm 6,77	29,08 \pm 10,43	35,92 \pm 10,26	30,50 \pm 9,65	32,33 \pm 10,90	29,58 \pm 9,04	32,25 \pm 10,16
		Integridade da membrana plasmática (%)			Integridade da membrana plasmática (%)		
		6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
BS	68,92 \pm 5,91	68,75 \pm 10,63	69,83 \pm 5,61	65,17 \pm 10,03	65,92 \pm 14,27	67,08 \pm 8,89	63,58 \pm 10,71
BT	68,92 \pm 5,91	65,17 \pm 12,73	62,33 \pm 10,64	61,33 \pm 12,30	67,67 \pm 8,58	68,50 \pm 7,18	62,58 \pm 16,25
INRA 96®	68,92 \pm 5,91	64,17 \pm 10,89	64,58 \pm 8,85	60,67 \pm 14,99	64,42 \pm 11,00	64,00 \pm 9,23	60,33 \pm 15,39

De acordo com alguns autores (BATELLIER et al., 1997; MAGISTRINI et al., 1992; BATELLIER et al., 2001), a utilização de diluentes contendo leite é mais adequada quando as amostras de sêmen equino serão armazenadas em torno de 4°C. Já na refrigeração a 15°C, as amostras de sêmen são favorecidas quando se utiliza um diluente sem leite (MAGISTRINI et al., 1992; BATELLIER et al., 2001). No entanto, o presente estudo comparou diluentes à base de leite desnatado (Botu-Semen® e Botu-Turbo®) e outro contendo apenas frações purificadas do leite (INRA 96®), sendo possível observar que todos os diluentes podem ser utilizados sem prejuízos para a motilidade e viabilidade espermáticas, tanto a temperaturas em torno de 5°C como de 15°C.

Estudo recente de PAGL et al. (2006) comparou o diluente quimicamente definido Equi-Pro® (Minitüb, Tiefenbach, Germany), composto por caseinatos e proteínas do leite, com o diluente Kenney produzido pelo mesmo fabricante. Os

autores não observaram diferença entre os diluentes após 24 horas de refrigeração. Estes achados corroboram com os dados obtidos no presente estudo, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os diluentes contendo leite desnatado e o INRA 96®, o qual é composto de proteínas do leite.

O diluente Botu-Turbo, segundo especificações do fabricante, possui na sua composição substâncias responsáveis pela ativação da motilidade espermática e deve ser utilizado em ganhões de baixa motilidade. No presente estudo não foram constatadas diferenças nos parâmetros dos diluentes testados, o que pode estar relacionado à utilização de ganhões com alto padrão de motilidade. Há, assim, a necessidade de desenvolvimento de pesquisas com animais de padrões inferiores, para constatar a influência de tais substâncias estimulantes da motilidade.

Durante o experimento, as temperaturas ambientais variaram entre 20 e 25°C e os siste-

mas testados apresentaram desempenho semelhante. AVANZI et al. (2006) compararam os sistemas de refrigeração passiva, disponíveis no mercado – Equitainer[®], Botutainer[®], Max-Semen[®] e Botu-Box[®] – e também não observaram diferenças entre eles quando foram mantidos a uma temperatura ambiente de 24°C. Entretanto, os autores relatam que apenas os sistemas Equitainer[®] e Botutainer[®] foram eficazes na manutenção da viabilidade espermática quando expostos

à temperatura de 40°C durante 24 horas. MALMGREN (1998) comparou o sistema americano Equitainer[®] e o sueco Salsbro Box[®], concluindo que ambos mantiveram a temperatura interna inferior a 10°C após 24 horas de estocagem à temperatura ambiente de 20°C, resultado semelhante ao obtido com o uso do sistema Botutainer[®], o qual também manteve a temperatura inferior a 10°C, mesmo quando a temperatura ambiente variou entre 20 e 25°C (Figura 1).

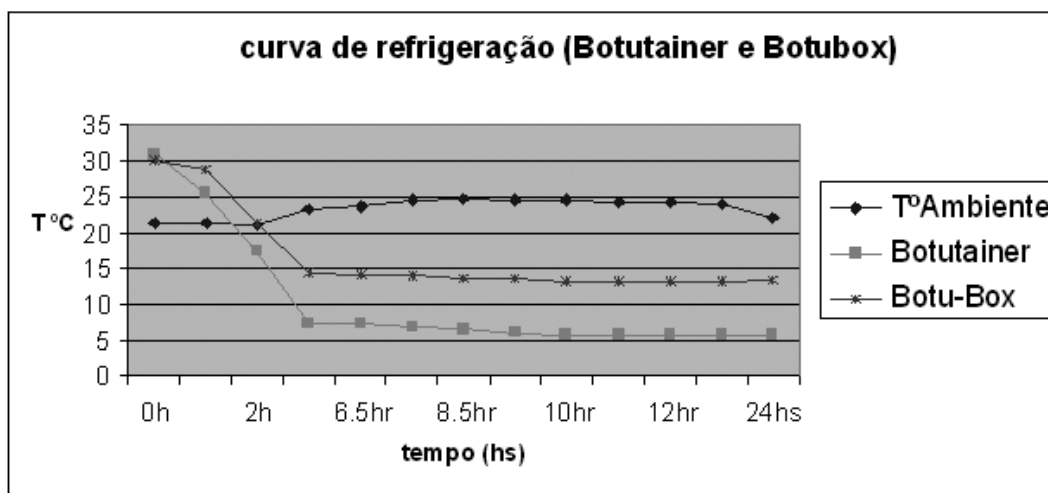


FIGURA 1. Curva de refrigeração dos sistemas de transporte do sêmen equino, mantidos à temperatura ambiente durante 24 horas

Conforme descrito pelo fabricante e confirmado através do presente estudo, o sistema Botutainer[®] realizou uma curva semelhante à sugerida por KATILA (1997), sendo de $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durante os primeiros trinta minutos, e então de $-0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$, evitando, assim, a exposição dos espermatozoides ao choque frio. Como o sistema Botu-Box[®] atinge uma temperatura mínima de refrigeração de 15°C , pode-se evitar a fase de transição dos fosfolípidos da membrana plasmática, quando passam do estado fluido para o gel. Trata-se de modificação que pode ocasionar lesões na membrana. Portanto, o ideal é a refrigeração e transporte de sêmen no período de até doze horas, conforme sugerido por SQUIRES et al. (1999).

Sistemas de refrigeração passiva que conservam a temperatura em torno de 5°C , por períodos acima de 24 horas, como o Equitainer[®]

e Botutainer[®], conferem uma maior segurança durante o transporte, especialmente em casos em que o recebimento do sêmen no haras ultrapassa a margem de tempo de refrigeração do equipamento.

Com base nos resultados obtidos conclui-se que os sistemas de transporte Botutainer[®] e Botu-Box[®], bem como os diluentes Botu-Semen[®], Botu-Turbo[®] e INRA 96[®] foram eficazes na manutenção da motilidade e viabilidade espermáticas durante refrigeração do sêmen equino por período de 24 horas. Esses resultados demonstram que tanto os sistemas como os diluentes podem ser considerados novas opções de equipamentos e meios diluidores para serem utilizados na biotecnologia de sêmen refrigerado equino. Como são produzidos no Brasil, tem-se facilidade na sua aquisição, a custos baixos, se comparados aos importados.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pelo suporte financeiro para a realização do presente estudo, bem como pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

- AVANZI, B.R.; PAPA, F.O.; FARRÁS, M.C.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA JR., J.A.; MEDEIROS, A.S.L.; ARAÚJO, G.H.M. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 152-154, 2006.
- BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, 391-410, 1997.
- BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p.181-190, 2001.
- BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial isemination. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.790-797.
- CARVALHO, G.A.; PAPA, F.O. Estudo de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermiática utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 332-334, 2003.
- CARVALHO, G.A.; ZAHN, F.S.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O. Effects of different extenders on sperm parameters and fertility of equine cooled semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p.275-277, 2005.
- DOUGLAS-HAMILTON D.H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of the fertility of transported semen. **Theriogenology**, v. 22, p. 291-304, 1984.
- JASKO, J.; LITTLE, T.V.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, p. 979-985, 1992.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, v. 10, n. 2, p. 156-165, 1994.
- KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p.1217-1227, 1997.
- KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, E.L.; JASKO, D.J.; PICKETT, B.W. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p .601-614, 1992.
- KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination technique for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 21., 1975. **Proceedings...** 1975. p. 327-336.
- MACEDO, L.P.; PAPA, F.O.; GOMES, G.M.; MELO, C.M.; OLIVEIRA, J.V.; DELL'AQUA JR, J.A. Effect of antibiotics on viability and fertility of equine semen cooled to 5°C. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 277-280, 2005.
- MACHADO, M.S.; LEÃO, K.M.; GOMES, G.M.; MACEDO, L.P.; ALVARENGA, M.A. Efeitos de diferentes sistemas de transporte sobre a qualidade do sêmen refrigerado eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p.194-196, 2002.
- MAGISTRINI, M.; COUTY, I.; PALMER, E. Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 88 (Suppl.), p.97-110, 1992.
- MALMGREN, L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. **Theriogenology**, v. 50, p. 833-839, 1998.
- MELO, C.M.; ZAHN, F.S.; MARTIN, I.; ORLANDI, C.; DELL'AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 4, p.171-175, 2007.
- NAGAO, J.F.; GOMES, R.G.; MARTINS, M.I.M. Viabilidade de espermatozóides eqüinos recuperados da cauda do epidídimo e submetidos à refrigeração. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 984, 2007.
- PADILLA, A.W.; FOOTE, R.H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 8, p. 3308-3313, 1991.
- PAGL, R.; AURICH, J.E.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim

- milk-base extender for storage equine semen at 5°C. **Theriogenology**, v. 66, p.1115-1122, 2006.
- PICKETT, B.W. Seminal extenders and cooled semen. In: MCKINNON, A.O; VOSS, J.L. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.746-789.
- RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; PERES, K. R.; ARRUDA, R.P. Influência da centrifugação na integridade das membranas plasmática e acrossomal e no potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides eqüinos resfriados a 5°C por até 72 horas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p.1011, 2007.
- RIGBY, S.L.; BRINSKO, S.P.; COCHRAN, M.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p.171-180, 2001.
- SAS. Institute Inc. **SAS/STAT user's guide**. Version 6. v. 2, 4. ed. Cary: SAS Institute, 1989. 846 p.
- SQUIRES, E.L.; BRUBAKER, J.K.; McCUE, P.M.; PICKETT, B.W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. **Theriogenology**, v. 28, p.709-718, 1998.
- SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K; McCUE, P.M; BRUEMMER, J.E. **Cooled and frozen stallion semen**: animal reproduction and biotechnology laboratory. Colorado: Colorado State University, 1999. (Bulletin n. 9).
- ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998. 121 f. Tese (Doutoramento) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

Protocolado em: 2 dez. 2006. Aceito em: 10 mar. 2008.