

Scientific Electronic Archives

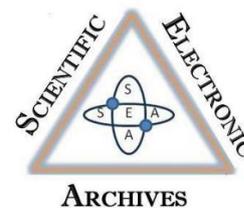
Issue ID: Sci. Elec. Arch. 8:3 (2015)

October 2015

Article link:

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=200>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



ISSN 2316-9281

Principais Avanços das Biotecnologias Usadas na Inseminação Artificial de Equinos: Uma Revisão

Major Advances in Biotechnology Used on Artificial Insemination of Horses: A Review

C. P. T. Carvalho, R. Lançoni ; G. C. Santos, R. C. A. Berber

Universidade Federal de Mato Grosso – *Campus Sinop*

Author for correspondence: patriciacarvalho2008@gmail.com

Resumo. A indústria equina tem cada vez mais ganhado destaque nas práticas esportivas como na geração de renda. O crescente interesse em equinos resultou no surgimento de biotecnologias que fornecem a solução para grande parte dos problemas reprodutivos. Diversas biotecnologias vêm sendo usadas na IA, entre elas a sexagem de espermatozoides pela citometria de fluxo, transferência de embriões (TE) associada ao sêmen sexado e o uso de sondas fluorescentes para observação de integridade de membrana plasmática, acrossomo e mitocôndrias do espermatozoide. O objetivo da revisão foi abordar algumas biotecnologias de impacto utilizadas na reprodução equina. Essas tecnologias têm contribuído no incremento do potencial genético de animais de interesse zootécnico, na preservação de material genético e bem como superar problemas de fertilidade.

Palavras-chave: Equino, biotecnologias, reprodução, sêmen.

Abstract. The equine industry is increasingly gaining prominence in sports and in generating income. The growing interest in horses resulted in the emergence of biotechnologies that provide the solution for most reproductive problems. Several biotechnology have been used in AI, including the sperm sexing by flow cytometry, embryo transfer (ET) associated with sexed semen and the use of fluorescent probes for observation of plasma membrane integrity, acrosome and sperm mitochondria. The purpose of the review was to address some impact of biotechnologies used in equine reproduction. These technologies have contributed in increasing the genetic potential of animals of zootechnical interest, the preservation of genetic material and as well as overcome fertility problems.

Keywords: Equine, biotechnology, reproduction, semen.

Introdução

A inseminação artificial (IA) é uma das biotécnicas da reprodução mais importantes e utilizadas visando o melhoramento genético (Ax et al., 2000). Dadas as vantagens proporcionadas pela inseminação artificial, esta talvez seja a biotecnologia com maior impacto na produção equina, pois um reprodutor pode deixar um grande número de descendentes ao longo de sua vida reprodutiva (Arruda, 2000).

De acordo com dados apresentados pela CNA (2006), a indústria equina mundial exerce importante papel como fonte geradora de renda e empregos. No Brasil, o rebanho efetivo é de cerca de 8,5 milhões de equinos e 1,2 milhões de muare e jumentos. Esse segmento agropecuário é responsável pela geração de 600 mil empregos

diretos e 3,2 milhões de empregos indiretos. A IA em equinos vêm sendo cada vez mais praticada em todo o mundo, e a forma mais utilizada é através do sêmen resfriado e congelado (LOOMIS, 2006).

O Brasil é o segundo país no mundo que usa a biotecnologia de sêmen congelado, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (EUA) (PAPA et al., 2005). Na Europa, cavalos são em grande parte para trabalho agrícola, mas tem se tornado cada vez mais importante para os esportes e recreação. Esta medida é acompanhada por uma demanda por cavalos de esporte moderno. Raças que não conseguem se adaptar a essas necessidades, são substituídos por cavalos de esporte ou de raças destinadas especificamente em fins recreativos (Aurich e Aurich, 2006).

O objetivo da revisão foi abordar algumas biotecnologias de impacto utilizadas na reprodução equina.

Citometria de fluxo

Na década de 80, pesquisadores do Departamento de Agricultura (USDA) desenvolveram a tecnologia do sêmen sexado (Johnson et al., 1987; Johnson et al., 1989). A comercialização de sêmen sexado nos EUA iniciou no ano de 2003, pela Empresa Sexing Technologies de Novasota, Texas. A Sexing Technologies possui atualmente laboratórios em todos os principais centros de IA nos EUA e no Canadá, com operações adicionais no Brasil e na Holanda (Garner, 2006).

A escolha do sexo dos animais está voltada principalmente para benefícios comerciais que são proporcionado. Nos equinos existe um interesse pela fêmea, estando ligada diretamente a prática esportiva do polo (Paranace, 2013). O uso da AI em equinos com sêmen sexado pelo método de citometria de fluxo proporciona eficiência de aproximadamente 90% (Samper, 2007).

O uso do sêmen sexado com baixas doses de espermatozoides permitiria a utilização de garanhões com baixa qualidade seminal, sêmen congelado, podendo até reduzir a incidência de endometrites pós parto (Lindsey, 2001). O baixo número de espermatozoides sexados disponíveis é o maior fator limitante para competir com a IA convencional. As melhores taxas de gestação resultante de inseminação com baixas doses (20×10^6) de espermatozoides sexados em cavalos foram obtidos com a inseminação histeroscópica (Lindsey et al., 2005).

O citômetro de fluxo SX MoFlo (Dako-Cytomation Inc., Fort Collins, CO, EUA), equipado com um laser de argônio UV (comprimento de onda de 351 a 150 mW), foi modificado especialmente para triagem de espermatozoides (Johnson e Welch, 1999). Garner et al., (1983) afirmou que o processo de separação dos cromossomos X e Y é feito pela porcentagem de DNA (Ácido Desoxirribonucléico) que cada um apresenta, sendo que X apresenta cerca de 3,8% mais DNA do que Y. O tratamento dos espermatozoides é feito pelo Hoechst 33342 que só se liga a membrana intacta de DNA (Mattioli et al., 1996, Arruda, 2000), quando exposto ao laser o cromossomo X brilha mais do que o Y pela sua maior quantidade de DNA.

Os espermatozoides passam em fila única pela placa com laser separador, existe uma carga elétrica positiva ou negativa, a qual vai separar de acordo com a intensidade de fluorescência que o espermatozoide vai emitir, os espermatozoides são impulsionadas por meio do sistema em velocidades de aceleração de 90 km/h (Garner, 2006).

O uso do sêmen sexado poderia aumentar os ganhos genéticos e ter importantes implicações para a produção comercial dos produtos de qualidade (Espinosa-Cervantes e Córdova-Izquierdo, 2012). A sexagem pela

citometria de fluxo não causa danos a membrana plasmática, nem ao menos reação acrossomal, sendo semelhante ao sêmen convencional o número de espermatozoides sem reação acrossomal e membrana plasmática íntegra (Tanno, 2009).

Sondas fluorescentes na avaliação espermática

O uso de sondas fluorescentes isoladas ou associadas a outras sondas permite a análise da integridade dos diversos componentes celulares, devido fazer marcações específicas e fazer a e a detecção de partes estruturais e funcionais (Arruda, 2000; Caleghini, 2005; Arruda, 2007). Dessa forma, a funcionalidade de organelas dos espermatozoides ou seus compartimentos têm sido monitorados por procedimentos específicos de coloração pelas sondas fluorescentes. (Arruda e Caleghini, 2003).

Os espermatozoides possuem vários compartimentos dentro da membrana plasmática e da membrana mitocondrial. Essas membranas devem permanecer intactas e funcionais para permitir a competência celular, sendo essenciais à proteção, ao funcionamento celular e ao processo de fertilização (Arruda e Celeghini, 2003).

As inúmeras funções da membrana citoplasmática estão relacionadas ao metabolismo celular e manutenção da motilidade, capacitação, reação acrossomal, interações entre o espermatozoide e epitélio do trato genital da fêmea e interação com oócito (Peña et al., 2005).

De acordo com Peterson et al., (1974), uma das primeiras sondas usadas para a marcação da membrana plasmática em espermatozoides foi o iodeto de propídio (PI) no sêmen humano. O PI atravessa a membrana plasmática lesada, ligando-se, porém, ao DNA do núcleo da célula emitindo fluorescência em vermelho (Garner et al., 1999; Arruda et al., 2005). Já a sonda Hoescht 33342 atravessa a membrana intacta e se ao liga DNA nucleico, emitindo fluorescência azul.

O acrossomo é uma estrutura de dupla parede, situada na cabeça do espermatozoide (Garner e Hafez, 2004). Nele estão contidas as enzimas acrossomais que são cruciais para que ocorra a fertilização (Silva e Gadella, 2006).

As sonda mais usada para alterações em acrossomo, é a aglutinina do *Pisium sativum* (PSA) (Cross et al., 1986). Sendo encontrado em ervilhas, possuindo afinidades nas terminações α - D glucose e a resíduos de glicoproteínas α - D manose (Mendonza et al., 1992). Quando o FITC-PSA (lectina fluorescinada conjugada com aglutinina da *Pisum Sativum*) é usado para a avaliação do acrossomo, os espermatozoides que possuem integridade acrossomal não são corados, por esta sonda não entrar em membrana acrossomal íntegra (Graham, 2001). Por outro lado, em células que apresentam, acrossomas danificados, o FITC-PSA entra em contato com o conteúdo acrossomal e se ligando e corando esta região (Graham, 2001) em verde amarelado fluorescente (Arruda et al., 2007; Celeghini et al., 2007).

As disfunções desta organela são responsáveis por uma grande variedade de problemas no funcionamento da mitocôndria podem ser um fator relacionado à infertilidade. A energia necessária para motilidade espermática é promovida pelas mitocôndrias localizadas na peça intermediária (Gravance et al., 2000). Estas produzem energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) que é quebrada em moléculas de adenosina trifosfatase, liberando a energia necessária para a movimentação da cauda (Barth e Oko, 1989). Assim, qualquer mudança na função mitocondrial pode ser refletida na alteração da motilidade espermática (Gravance et al., 2000).

A mitocôndria é uma organela presente em todos os tipos celulares, no caso dos espermatozoides, em que estão presentes na peça intermediária de forma helicoidal (Alberts et al., 1999). As mitocôndrias são as principais células produtoras de energia oxidativa através da produção de ATP via cadeia de transporte de elétrons (Connell et al., 2002). O ATP é o suplemento energético para os batimentos flagelares, a hiper-ativação e a penetração do espermatozoide no oócito. Portanto, é indispensável que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (Connell et al., 2002). Dentre os corantes que coram atividade mitocondrial, destaca-se a Rodamina 123, corando mitocôndrias funcionais (Graham et al., 1990). O corante a membrana permeante JC-1 (Iodeto de 5',6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocinina) é utilizado em estudos de apoptose mitocondrial para monitorizar a saúde. O corante JC-1 pode ser utilizado como um indicador do potencial de membrana mitocondrial em uma variedade de tipos de células (Reers et al., 1991).

Semên congelado

O sêmen congelado possui baixas taxas de fertilidade quando comparado ao sêmen fresco e refrigerado (Vidament, 2005). A diminuição da taxa de fertilidade observada após o processo de congelamento e descongelamento está relacionada, principalmente, aos danos causados ao funcionamento e às estruturas das membranas dos espermatozoides (Parks e Graham, 1992).

Entretanto, a dificuldade de se obter uma avaliação de forma precisa da fertilidade do sêmen equino é um fator limitante para o desenvolvimento de novas tecnologias de criopreservação do espermatozoide (Allen, 2005).

A criopreservação do sêmen é uma dessas técnicas, que apresentam diversas vantagens que facilitam a produção. Sendo uma técnica aumenta a disponibilidade de espermatozoide de diversos ganhões, facilitando os trabalhos de reprodução assistida. Outras vantagens é a otimização do uso de ganhões com comprovada superioridade genética, com a possibilidade do armazenamento de sêmen, mesmo fora da estação de monta e a quebra das barreiras

geográficas, que torna possível a remessa de sêmen para qualquer parte do mundo (Barreto et al., 2008).

A ocorrência de choque térmico induz a danos irreversíveis ao espermatozoide, sendo comum apresentarem padrões anormais de movimento, lesões de acrossomo, perda rápida de motilidade, danos na membrana plasmática e redução da sua atividade, metabólica, são danos causados durante processos de refrigeração feito de forma inadequada, e vai ocorrer quando a membrana plasmática do espermatozoide passa por transições de fases de estado líquido para estado de gel (Graham, 1996).

O sêmen é refrigerado na temperatura de 37 °C antes do processo de congelamento com o objetivo de reduzir os danos causados aos espermatozoides durante os processos de congelamento (Squires et al., 1999). Quando ocorre o processo de congelamento lento, a água que esta extracelular vai congelar, o que leva à desidratação celular. Por outro lado, quando a célula é congelada rapidamente, não há perda de água, promovendo com isso, a formação de cristais de gelo intracelular (Mazur, 1985). Com isso vai ocorrer dificuldades na penetração de crioprotetores no meio (Graham, 1996; Medeiros, 2002).

É preciso fazer curvas de congelamento adequadas com o objetivo de reduzir a formação de cristais de gelo. Esse cuidado em relação as curvas é importante porque o espermatozoide atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (Squires et al., 1999).

Sob a temperatura de 5°C, a água intra e extracelular permanece super refrigerada e não cristaliza. No entanto, quando atinge as temperaturas de -5 e -10°C começam a se formar cristais, neste momento, a curva de congelamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular, e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico (Medeiros, 2002). A perda de água e a desidratação celular são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de formar cristais de gelo dentro da célula (Squires et al., 1999).

De acordo com Graham (1996) diluidores utilizados na criopreservação do espermatozoide equino contêm em sua fórmula básica lipídeos ou lipoproteínas que protegem a célula contra as injúrias causadas pelo choque térmico. A maioria destes diluidores usam o glicerol, ou associação com um ou mais açúcares como crioprotetores. Outros componentes podem ser incluídos, tais como EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), detergentes, tampões para pH e antibióticos. O EDTA se liga aos íons de cálcio, impedindo a entrada do mesmo para o interior da célula, visto que o excesso de cálcio intracelular causa lesões das membranas espermáticas durante a etapa de resfriamento. A ciclodextrina tem sido relacionada com a melhor viabilidade espermática em diversas espécies (Oliveira, 2014).

O uso de vídeo endoscopia para visualização do trato reprodutivo de égua (Bracher e Allen, 1992), foi descrita como rápida e atraumática, e proporciona a deposição de baixo número de espermatozoides diretamente na junção útero tubárica (Morris et al. 2000).

O endoscópio é guiado para o lado do corno uterino com folículo pré-ovulatório. Durante a passagem do endoscópio no útero deve-se ter cuidado para manter a orientação, e a localização deve se confirmar pelo reto fim do procedimento (Aurich e Aurich, 2006). A vantagem desta técnica está em poder utilizar pequenas doses de sêmen (Card, 2010).

Transferência de embriões

A transferência de embriões (TE) em equinos é uma técnica recente, a qual permite que éguas de grande valor genético tenham mais de um potro por ano (Squires, 2003). Especialmente em equinos, a TE pode contribuir decisivamente para a multiplicação de reservas genéticas superiores, para a preservação de raças exóticas ou em extinção e para a formação de rebanhos a partir de um número reduzido de animais superiores (Arruda et al., 2001).

No Brasil a TE é realizada desde dos anos 80, e hoje ocupa lugar de destaque na utilização desta técnica mundo junto a Argentina e Estados Unidos (Carmo, 2003), realizando em torno de 3.500 transferências por ano, de acordo com dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões – IETS (Carneiro, 2005).

As principais candidatas à transferência de embriões são éguas mais velhas, que não tenham condições de manter uma gestação, e éguas de competição, quer seja em corridas, polo ou outros esportes. Os embriões geralmente são coletados através da lavagem do útero da égua doadora entre os dias 7 e 8 pós ovulação (Squires et al., 2003).

Segundo Carnevale (2000), o equipamento para coleta do embrião mais amplamente utilizado pelos pesquisadores de embriões equinos é a pipeta de inseminação artificial. A avaliação das receptoras, anteriormente ao ato da transferência, é de suma importância, sendo uma de selecionar a égua mais adequada para receber o embrião. Tal seleção fundamenta-se nas concentrações plasmáticas de progesterona, naquele momento, contribuindo assim, para que estas apresentem as melhores condições reprodutivas. Então, por palpação deve-se observar a cérvix firme e fechada, aumento de tônus uterino. Além disso, não pode haver nenhuma evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico. Administrando progesterona em receptoras equinas no período de D0 (dia da ovulação) a D5, possibilitaram a ovulação destas receptoras no D2, obtendo taxa de prenhez estatisticamente similar as éguas consideradas excelentes à para ovulação no D5.

Para seleção da égua doadora deve ser considerado o seu histórico reprodutivo, a fertilidade, o valor potencial do potro resultante, e o

número de gestações desejadas. (Vanderwall e Woods, 2007). A US transretal é um procedimento não invasivo recomendado no momento da seleção das receptoras, bem como no ato da transferência, cujo objetivo é avaliar as características uterinas e ovarianas, especialmente o corpo lúteo (Meira, 2007).

A sincronização do estro e da ovulação permite que éguas sejam cobertas ou inseminadas artificialmente em um período pré-determinado. A principal aplicação da sincronização do estro e da ovulação em éguas e na transferência de embriões, quando a ovulação da égua receptora deve ocorrer um dia antes a dois dias após a ovulação da égua doadora (Squires, 1993). Os estros e ovulações entre doadoras e receptoras, podem ser sincronizados. A utilização da prostaglandina é usada na sincronização do cio (Meira, 2007).

A melhor forma para a indução da ovulação é através da detecção do desenvolvimento e tamanho do folículo através da ultrassom transretal, induzindo-se a ovulação quando o folículo atinge em torno de 35 mm (Palmer, 1993). Os tratamentos podem ser associados hCG ou GnRH, objetivando-se um melhor índice de sincronização das ovulações entre doadoras e receptoras (Meira, 2007).

Os melhores resultados prenhez utilizando sêmen sexado de garanhões associados a transferência de embriões obteve eficiência de gestação de 39% (Panarace et al., 2013).

Discussão

A inseminação com baixa dose de espermatozoides podem permanecer restritas para alguns garanhões e também a programas de melhoramento genético (Aurich e Aurich, 2006).

A menor fertilidade ligada aos espermatozoides sexados pelo método de citometria de fluxo foi um dos fatores que atrasaram a comercialização de sêmen sexado equino em comparação com o bovino (Morris, 2005). Esta baixa eficácia pode ser atribuída as baixas taxas de sexagem, a exigência de inseminar com altas doses, e baixa resolução entre cromossomos X e Y. A inseminação histeroscópica pode ser feita com baixas doses, e apresenta bons resultados (Lindsey, 2001; Morris, 2005).

Para que a inseminação artificial possa apresentar melhores resultados na espécie equina, é necessário conhecer aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados para analisar a viabilidade dos espermatozoides submetidos ao processo de congelamento e descongelamento, e avaliar os danos causados ao espermatozoide que podem levar a redução de fertilidade (Arruda, 2001). O uso de diluentes à base de leite desnatado durante a incubação tem sido apontado como causa de problemas durante o processo de sexagem (Morris, 2005). A utilização do leite desnatado pode interferir na excitação do laser na passagem da luz pelos detectores da amostra corada com Hoechst 33342

(Johnson, 1999). É preciso a realização de mais estudos para desenvolvimento de técnicas de congelamento de espermatozoides sexados (Lindsey, 2001). No entanto Lindsey (2000), obteve melhores resultados de prenhez com inseminação histeroscópica do que a inseminação uterina profunda guiada por ultrassom.

O desenvolvimento dos métodos de coloração empregando corantes supravitais e fluorescentes aumentaram a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides. Os corantes supravitais não são eficientes em análise de sêmen congelado, devido existir interferência causada pelo glicerol no processo de coloração (Garner et al., 1999).

Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino como as sondas fluorescentes vêm sendo utilizados isoladamente ou em combinação para determinar a integridade e a viabilidade celular (Caleghini, 2005; Arruda, 2007). As sondas possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo diagnóstico mais fácil e correto de acordo com as características físicas observados no microscópio de epifluorescência ou citometria de fluxo (Caleghini, 2005)

Considerações finais

O uso de técnicas como semen sexado, sondas fluorescentes são técnicas caras, e mais limitada ao ambiente de pesquisa. É preciso ter biotécnicas eficientes para avaliação espermática com custo acessível, associado a um bom planejamento de reprodução.

Referências

ALBERTS, B. **Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula. 3 ed.** Porto Alegre: Artes Médicas, 1294p.; 1999.

ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive Technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animal**, v.40, p.310-329, 2005.

ARRUDA RP. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).** 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ARRUDA R.P., VISINTIN J.A., FLEURY J.J., GARCIA A.R., MADUREIRA E.H., CELEGHINI E.C.C. & NEVES NETO J.R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião equinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**38:233-239, 2001.

ARRUDA, R. P. de; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, suplemento, v. 31, p. 230-231, 2003.

ARRUDA RP, CELEGHINI ECC, SOUZA LWO, NASCIMENTO J, ANDRADE AFC, RAPHAEL CF, GARCIA AR. Importance of semen quality in fixed-tim artificial insemination and embryo transfer programs. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p.145-150, 2005.

ARRUDA, R.P. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do semen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, p.8-16, 2007.

AURICH J., AURICH. C. Developments in european horse breeding and consequence for veterinarians in equine reproduction. **Reproduction Domestic Animals**, v. 41, n. 4, p. 275-279, 2006.

AX .R.L, SPROTT L.R, HARRIS M.D, FORREST D.W, YOUNG J., ZHANG .H.M, OYARZO .J.N, BELLIN .M.E. Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. **J Anim Sci**, v.78, p.795-798, 2000.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa.** Ed. Ames, Iowa; Iowa State University, p.285, 1989.

BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; CAIADO, J. R. C.; SOUZA, G. V.; SHIMOYA, A. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n. 12, p. 2115-2119, 2008.

BRACHER, V. AND ALLEN, W.R. Videoendoscopic examination of the mare's uterus. I. Findings in normal fertile mares. **Equine vet. J.** 24, 274-278, 1992.

CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; BIANCONI, L. L.; RODRIGUES, P. H. M.; ARRUDA, R. P. Efeitos da criopreservação e do diluidor sobre o sêmen bovino quanto às membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33; Porto Alegre: UFRGS, p. 327, 2005

CELEGHINI ECC, ARRUDA RP, ANDRADE AFC, NASCIMENTO J, RAPHAEL CF. **Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma , acrossomal and mitochondrial membranes. Reproduction of Domestic Animals**, v.42, p.479-488, 2007.

- CARD, C. **Low Dose Insemination Techniques in Mares.** In: **Proceedings of the Pre-Congress of the 16th Italian Association of Equine Veterinarians Congress – SIVE.** Carrara, Italy – p. 3-11, 2010.
- CARNEIRO, G.F. **Transferência de embriões em equinos.** In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiania. Anais, 2005.
- CROSS NL, MORALES P, OVERSTREET JW, HANSON FW. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Res.** 15, 213–226, 1986.
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA. **Estudo do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil.** Brasília: CNA, 2006.
- CONNELL, M. O.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction** v.17, p. 704-709, 2002.
- ESPINOSA-CERVANTES R. & A. CÓRDOVA-IZQUIERDO. Sexing sperm of domestic animals. **Trop Anim Health Prod.** 45:1–8, 2012.
- GARNER, D.L.; GLENDHILL, B.L.; PINKEL, D.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA, M.A. et al. Quantification of the X-and-Y-chromosome-bearing sperm of domestic animals by flow cytometry. **Biol. Reprod.** V28, 1983.
- GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in the Domestic**, v. 34; p.399-404, 1999.
- GARNER D. L., HAFEZ E. S. E. **Espermatozoides e Plasma Seminal.** In: HAFEZ E. S. E., HAFEZ B. Reprodução Animal. São Paulo: Manole. 7. ed. p. 99-106, 2004.
- GARNER, D.L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v.65, p.943-957, 2006.
- GRAHAM, J.K; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43; p.55-64, 1990.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, n.1, p.131-147, 1996
- GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, p. 239-247, 2001.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**; v.53, n.9, p.1691-1703, 2000.
- GRAVANCE, C.G. et al. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, Hoboken, v.15, p.5-10, 2001
- JOHNSON, L.A., FLOOK, J.P., LOOK, M.V., PINKEL, D. Flow sorting of X and Y chromosome bearing spermatozoa into two populations. **Gamete Res.** 16, 1–9, 1987.
- JOHNSON, L.A., FLOOK, J.P. AND HAWK, J.W. (1989) Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y bearing sperm separated by DNA and cell sorting. **Biol. Reprod.** 41, 199-203, 1989.
- JOHNSON, L.A., WELCH, G.R. Sex pre-selection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. **Theriogenology** 52, 1323–1341, 1999.
- LINDSEY, A.C., MORRIS, L.H.A., ALLEN, W.R., SCHENK, J.L., GRAHAM, J.K., BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. In: **5th International symposium on equine embryo transfer.** Finland. Proceedings... Finland, p.13, 2000.
- LINDSEY, A.C., BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, v.68, p.279-89, 2001.
- LINDSEY A.C., VARNER, D.D., SEIDEL, G.E. JR, BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18 h at either 5 degrees C or 15 degrees C prior to flow-cytometric sorting. **Anim Reprod Sci** 85, 125–130, 2005.
- LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. **Veterinary Clinics North American Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 663-676, 2006.
- MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; LUCIDI, P.; SEREN, E. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. **Theriogenology**, v. 45, p. 373-381, 1996.
- MAZUR, P. Freezing of living cells mechanisms and implication. **American Journal of Physiology**, v.247; p.125-142, 1984.
- MEDEIROS, A.S.L., BOMES, G.M., CARMO, M.T., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology** 58, 273–276, 2002.

- MELO, C. M. **Efeito da criopreservação por 24 horas em diferentes sistemas de refrigeração sobre a viabilidade e fertilidade de sêmen congelado equino.** (Mestrado) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, 104p.; 2005.
- MEIRA, C. **Endocrinologia da Reprodução, Dinâmica Folicular, Superovulação e Transferência de Embriões na Espécie Equina.** (Área da Reprodução) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2007.
- MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS, J.; TESARIK, J. **Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using Pisum sativum agglutinin.** Journal of Reproduction and Fertility, v. 95, p. 755-763, 1992.
- MORRIS, L.H.A., HUNTER, R.H.F. AND ALLEN, W.R. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **J. Reprod. Fertil.** 118, 95-100, 2000.
- MORRIS, L.H.A. Challenges facing sex preselection of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p.147–157, 2005.
- OLIVEIRA. R.R.; RATES.D.M., PUGLIESI.G.; KERL.P.G.;ARRUDA.R.P.; MORAES. E.A.; CARVALHO. G.R. Use of Cholesterol-Loaded Cyclodextrin in Donkey Semen Cryopreservation Improves Sperm Viability but Results in Low Fertility in Mares. **Reprod Dom Anim** ;49, 845–850, 2014.
- PALMER, E. **Induction of ovulation.** In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Equine Reproduction. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 344-347, 1993.
- PARANACE, M., PELLEGRINI, R.O., BASUALDO, M.O., BELÉ, M., URSINO,D.A.CISTERNA, R.,DESIMONE, G., RODRÍGUEZ, E., MEDINA, M.J. First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large-scale embryo transfer program. **Theriogenology**, 2013.
- PARKS.E. J, GRAHAM.J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.
- PAPA, F. O. et al. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 19-27, 2005.
- PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; WALGREN, M.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology.** v.28, p.107–114, 2005.
- PETERSON, R.N.; SILVERSTEIN, K.; FREUND, M. A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. **Journal of Reproduction and fertility**; v. 41, p. 485-488, 1974.
- RRERS, M; SMITH, T.W; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine a quantitative fluorescent of membrane potencial. **Biochemiistry**, v. 30, p.4480-4486, 1991.
- SAMPER, J. C. **Techniques for artificial insemination.** In: YOUNGQUIST, R. S.; THREFFALL, W. R. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, p. 37-42, 2007.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, Stoneham, v.65, p.958-978, 2006.
- SQUIRES .E.L., CARNEVALE .E.M., MCCUE .P.M., BRUEMMER ..JE. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**;59:151-170, 2003.
- 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 State University, Bulletin , 1999.
- SQUIRES, E.L. **Embryo transfer.** In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction.** Philadelphia: Lea & Febiger, p. 357-367, 1993.
- TANNO.P.H. **Estudo das alterações morfo-funcionais de espermatozoides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo.** 100f, 2009. Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução.
- VANDERWALL D.K. & WOODS G.L. **Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses,** In: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Eds) Current Therapy in Large Animal Theriogenology, p.211-219, 2007.
- VIDAMENT, M. **French field results on factors affecting fertility of frozen stallion semen.** Anim. Reprod. Sci. 89, 115–136, 2005.