



**Centro Universitário de Brasília - UniCEUB**  
**Programa de Iniciação Científica**

LUCAS COSTA DE FARIA  
JOÃO LUCAS DE SOUSA ATAIDES

AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS CONGELADOS E  
DESCONGELADOS SUBMETIDOS A CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAÇÃO

Brasília  
2020



LUCAS COSTA DE FARIA  
JOÃO LUCAS DE SOUSA ATAIDES

AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS CONGELADOS E  
DESCONGELADOS SUBMETIDOS A CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAÇÃO

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica  
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e  
Pesquisa

Orientação: Francisco José Gonçalves de Oliveira

Brasília  
2020

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade que nos foi dada e a Ele toda a honra e glória. Ao professor Francisco José Gonçalves de Oliveira, gostaria de expressar minha gratidão por ter acreditado em nosso projeto desde o início, sem ele nada disso seria possível, por isso agradeço pela paciência, humildade e por sua amizade. A João Lucas de Sousa Ataides, deixo meu mais sincero obrigado, por ser meu amigo, companheiro e por ter embarcado nessa jornada ao meu lado e por isso sou muito grato.

A meus pais Larianne Ferreira Costa de Faria e Carlos Henrique de Faria por serem meus maiores apoiadores e incentivadores. A Raianny Pires Lobo por ter sido minha melhor amiga e meu principal porto seguro nos momentos de maior dificuldade e por ter auxiliado a me manter no caminho. A Fabio Zacheu Conti e Márcia Peters Sabino pela amizade e suporte essencial durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço também a Cléia Ferreira Sousa, Adenilson Alves de Ataides e Raíssa Chadud Teixeira de Moraes Melo, por todo o suporte dado durante o desenvolvimento da pesquisa.

Deixo aqui também meu agradecimento a Otávio Augusto Costa de Faria e Letícia Prates Martins pela ajuda no momento mais crítico do trabalho. Agradeço a todos que nos auxiliaram de forma direta ou indireta.

*“O homem não é nada além daquilo que a educação faz dele”*  
Pierre Lévy

## **AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS CONGELADOS E DESCONGELADOS SUBMETIDOS A CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAÇÃO**

**Lucas Costa de Faria - UniCEUB, PIC Institucional, aluno bolsista**

*lucas.cfaria@sempreceub.com*

**João Lucas de Sousa Ataides - UniCEUB, PIC Institucional, aluno voluntário**

*joao.lucasa@sempreceub.com*

**Francisco José Gonçalves de Oliveira - UniCEUB, professor orientador**

*francisco.jose@ceub.edu.br*

### **RESUMO**

A indústria do cavalo movimentada, no Brasil, aproximadamente R\$16 bilhões de reais por ano e gera 610 mil empregos diretos e indiretos. A demanda direcionada aos sistemas de criação viabilizou o desenvolvimento de biotécnicas que permitissem um maior e melhor potencial produtivo e reprodutivo de várias espécies. Entretanto, o sêmen equino congelado e descongelado apresenta, relativamente, baixas taxas de fertilidade. Isso ocorre devido aos danos causados pela criopreservação dos gametas masculinos que fazem com que ocorra redução da longevidade espermática. Nesse contexto, técnicas foram criadas com o objetivo de amenizar esses danos, tal como a separação do líquido seminal. A centrifugação e filtração aumentam a concentração por meio da retirada do líquido seminal, porém, podem causar danos à sua viabilidade. Sendo assim, objetivou-se com esse estudo avaliar os procedimentos de filtração e centrifugação dos espermatozoides congelados e descongelados, avaliando a longevidade das células pela observação das alterações dos aspectos físicos durante a incubação por até 90 minutos. Foram utilizadas partidas do esperma congelado de 10 equinos que foram divididas em 3 grupos: controle (CT), Centrifuga e Sperm Filter. O grupo controle não foi submetido a nenhum processo de separação mas apenas às análises de motilidade, vigor e contagem de células com membrana íntegra, nos cinco diferentes tempos (T0= 0 minuto, T20= 20 minutos, T40= 40 minutos, T60= 60 minutos e T90= 90 minutos) do Teste de Termorresistência (TTR). O grupo Centrifuga foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 600 gravitacionais, ressuspenso em meio crioprotetor com glicerol e analisado durante os cinco diferentes tempos do TTR. O grupo Sperm Filter foi submetido à filtração através da membrana hidrofílica sintética e ressuspenso em meio crioprotetor com glicerol e analisado nos diferentes tempos do TTR. Nos 3 grupos foram analisados a motilidade total, vigor espermático e contagem de células com membrana íntegra. A análise dos dados foi feita utilizando ANOVA com teste de Tukey para motilidade e contagem de células com membrana íntegra e Kruskal-Wallis para o vigor. Os resultados indicaram que a filtração espermática com auxílio da membrana hidrofílica sintética tendeu a conservar melhor a motilidade espermática nos dois primeiros momentos (T0: P= 0,082; T20: P= 0,088). Contudo, nas seguintes avaliações, percebeu-se uma variação na motilidade dos grupos (T40: 21,5 ± 6,402; T60= 16,33 ± 5,188; T90= 12,00 ± 4,719) e não diferiu entre eles (P>0,05). Observou-se também que, com sêmen congelado, o grupo Centrifuga selecionou espermatozoides mais íntegros no primeiro momento (T0), em comparação com o grupo Sperm Filter. Contudo, mais estudos devem ser feitos com o

objetivo de elucidar por quais motivos o grupo Centrífuga foi mais eficaz aos demais grupos com relação aos demais grupos, no primeiro momento depois de descongelados.

**Palavras-Chaves: Criopreservação. Centrifugação. Sperm Filter. Sêmen equino.**

## **LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

**Tabela 1:** Classificação do vigor da motilidade espermática

**Tabela 2:** Avaliação da motilidade total dos espermatozoides (Média  $\pm$  Erro Padrão) dos grupos Controle (CT), Centrífuga e Sperm Filter, durante cinco tempos distintos (T0, T20, T40, T60 e T90)

**Tabela 3:** Avaliação da integridade de membrana (Média  $\pm$  Erro Padrão), através do corante Eosina-Nigrosina, nos grupos Controle (CT), Centrífuga e Sperm Filter, durante cinco tempos diferentes (T0, T20, T40, T60 e T90)

**Figura 1:** Passos e 'design' esquemático para o uso do Sperm Filter para remoção do plasma seminal

**Figura 2:** Teste de Eosina-Negrosina

## SUMÁRIO

**RESUMO**

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

**INTRODUÇÃO**

**1**

**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

**3**

2.1 O espermatozoide e o plasma seminal

3

2.2 Separação plasmática

4

2.2.1 Centrifugação

4

2.2.2 Filtração espermática

5

2.3 Criopreservação

6

2.4 Avaliação espermática

8

2.4.1 Aspectos macroscópicos

8

2.4.2 Aspectos microscópicos

8

2.4.3 Teste de Termorresistência (TTR)

10

**METODOLOGIA**

**10**

3.1 Grupo Controle

10

3.2 Grupo Centrífuga

10

3.3 Grupo 'Sperm Filter'

10

3.4 Teste de Termorresistência

11

3.5 Análise estatística

11

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**11**

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

**13**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**15**

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria do cavalo movimenta, no Brasil, aproximadamente R\$16 bilhões por ano e gera 610 mil empregos, diretos e indiretos, colocando o país entre os principais mercados de equideocultura do mundo (AIDAR, 2013; SANTOS; BRANDI; GAMEIRO, 2018).

A alta demanda direcionada aos sistemas de criação equina viabilizou a criação de técnicas que permitissem um maior e melhor aproveitamento do potencial reprodutivo e produtivo de várias espécies (BRANDÃO, 2008). Um dos artifícios desenvolvidos com o objetivo de otimizar e facilitar a produção foi a criopreservação (AIDAR, 2013).

O congelamento de sêmen apresenta inúmeras vantagens, tais como a melhora do uso de garanhões com superioridade genética comprovada e a diminuição das barreiras geográficas, tornando possível o envio de remessas da partida para qualquer lugar do mundo (BARRETO et al., 2008).

Porém, os índices de fertilidade obtidos com espermatozoides congelados de equinos são baixos quando comparados ao de bovinos. Esse menor índice constitui um dos maiores obstáculos à difusão dessa biotecnologia (KLOPPE et al., 1988; FURST et al., 2004). A redução da fertilidade que ocorre posteriormente ao congelamento e descongelamento de espermatozoides está relacionada aos danos sofridos pelas células, que são afetadas principalmente em aspectos como motilidade e vigor, e nas estruturas das membranas plasmáticas (PARKS e GRAHAM, 1992).

Ramires Neto et al. (2016) relatam em seu trabalho que vários fatores interferem na resistência e na qualidade do congelamento do espermatozoide equino. Destacam-se, principalmente, a genética do animal e os fatores ligados à membrana do espermatozoide e ao líquido seminal que fazem com que o gameta fique suscetível às lesões provocadas pelo congelamento.

Apesar de conter um alto número de substâncias responsáveis pela proteção dos espermatozoides, o líquido seminal também é apontado como uma das principais causas da queda da viabilidade dos espermatozoides congelados (RAPHAEL, 2007). Nele estão contidas várias macromoléculas proteicas que se aderem à membrana celular e que podem desestabilizá-la e, por isso, é necessário fazer a retirada do líquido seminal, visando ao

aumento da longevidade do sêmen (ALVARENGA et al., 2017).

Uma técnica que possibilita a separação do líquido seminal, podendo auxiliar na melhoria dos parâmetros do espermatozoide, é a utilização do Sperm Filter<sup>®</sup>, ou filtro espermático (Ceafepe Tecnologia Veterinária Ind., Sorocaba, São Paulo, Brasil), cuja função, segundo Braga (2019), é retirar apenas o líquido seminal, deixando os espermatozoides sobre esse filtro. A centrifugação com ressuspensão do *pellet* espermático (aglomerado de espermatozoides gerado pela centrifugação) em diluente à base de leite liofilizado e desnatado com proporção de 1:1 é outro processo bastante difundido para a separação do líquido seminal (ALVARENGA et al., 2017). Essa técnica deve respeitar a duração e a força adequadas de 600g (gravitacionais) por 10 minutos, com o objetivo de se reduzir as lesões às células espermáticas (Dell'aqua Jr. et al, 2001).

Essas técnicas de separação plasmática visam a preservar as características espermáticas, motilidade e vigor, e são consideradas extremamente úteis para animais com sêmen de qualidade baixa e que necessitam da separação do líquido seminal (ALVARENGA et al., 2010).

Outro processo utilizado com o objetivo de se reduzir as lesões causadas pela diminuição abrupta de temperatura nos processos de resfriamento e criopreservação é a adição de diluidores. Os diluidores crioprotetores são substâncias que, quando adicionadas às células, depois da retirada do líquido seminal, auxiliam na proteção dos espermatozoides no congelamento, protegendo-os contra o desenvolvimento de cristais de gelo intra e extracelulares, além de outros danos estruturais (OLIVEIRA, G. C. et al., 2013). Um dos crioprotetores mais utilizados é o glicerol que, apesar de seus efeitos tóxicos, é eficaz na defesa contra as lesões do congelamento (OLIVEIRA, F. J. G. et al, 2017).

Vários trabalhos vêm sendo feitos com o objetivo de se alcançar uma maior longevidade espermática do espermatozoide congelado e descongelado. (BATELLIER et al., 2001). Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a filtração e centrifugação na seleção dos espermatozoides congelados e descongelados, analisando a longevidade das células pela observação das alterações dos aspectos físicos durante a incubação por até 90 minutos.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 O espermatozoide e o líquido seminal

O sêmen é constituído por duas diferentes partes: o líquido seminal e os espermatozoides (WITE, 1988). O espermatozoide é resultado da espermatogênese, processo de divisões celulares que acontece nos túbulos seminíferos dos testículos. Essa célula é formada por três regiões recobertas por uma membrana fosfolipídica: a) a cabeça, local onde o material genético é guardado; b) a porção intermediária, local onde ocorre o condicionamento das mitocôndrias, induzindo a geração de energia; c) e o flagelo, estrutura que está relacionada com a motilidade espermática (SILVA, 2018).

O líquido ou plasma seminal é produzido, em conjunto, pelo epidídimo, glândulas acessórias e rede testis. Trata-se de um meio que é liberado durante a ejaculação em frações distintas através das contrações uretrais, e sua função é viabilizar ionicamente e energeticamente as células espermáticas (MILLER et al, 1990; KARESKOSI; KATILA, 2008). Nesse plasma existem substâncias que protegem e estimulam os espermatozoides; entretanto, por causa da sua constituição variável, a qualidade espermática pode ser incrementada ou agravada, possuindo, então, uma alta relevância na criopreservação (JASKO et al., 1992; SQUIRES et. al., 1999; ALMEIDA, 2006).

Grande parte dessas substâncias do líquido seminal são proteínas oriundas do epidídimo e estão associadas com a reestruturação da membrana celular, podendo promover a exposição ou a omissão de receptores essenciais para a viabilidade dos espermatozoides (GUASTI et al., 2012). Presume-se que essas remodelações de membrana permitem que as células espermáticas se mantenham viáveis dentro do oviduto (EKHALSI-HUNDRIESER et al., 2005).

As interações entre as proteínas e as membranas dos espermatozoides são classificadas como interações fortes ou fracas. As interações fortes possuem uma grande ligação com a preservação do líquido seminal dentro do trato genital feminino e com a fertilização do ovócito. Já as interações fracas são responsáveis pela entrada dos espermatozoides em um processo de quiescência (MARENGO, 2008).

Além da constituição do líquido seminal, a diminuição da temperatura também é capaz de provocar alterações deletérias à capacidade fertilizante do espermatozoide, tais

como o aumento na permeabilidade de membrana, a redução da fluidez, danos ao acrossoma, a liberação de enzimas e de fosfolípidos e a redução da atividade metabólica de ATPs (OSÓRIO, 2008).

## **2.2 Separação plasmática**

Estudos demonstraram que algumas proteínas existentes no líquido seminal, quando ligadas ao espermatozoide, podem promover a fragilização da membrana da célula (BRINSKO et al., 2000). A retirada do plasma no pré-congelamento pode auxiliar na criopreservação reduzindo o número de lesões espermáticas e ajudando na preservação da viabilidade dos espermatozoides (ALVARENGA et al., 2017; RAMIRES NETO et al., 2012).

Amann e Pickett (1987) descreveram que a retirada do líquido seminal seria um processo essencial para a preservação da longevidade das células criopreservadas. A criopreservação, segundo Watson (1995), induz um processo prematuro de capacitação espermática, provavelmente por uma diminuição de lipídios durante o congelamento e descongelamento do sêmen. Essa capacitação precoce impede que ocorram as reações acrossomais, inviabilizando a fertilização do ovócito (MORTIMER et al., 1998).

Entretanto, a necessidade da retirada total deste plasma para o congelamento ainda é bastante discutida. Segundo Katila et al. (2002), essa retirada provoca diminuição da motilidade total, sendo dessa forma, deletéria à criopreservação. No mesmo sentido, Aurich et al. (1996) indicaram que sêmens que tiveram motilidade baixa ( $\leq 20\%$ ) depois de descongelados apresentaram melhores resultados quando congelados com o líquido seminal.

### **2.2.1 Centrifugação**

Durante a criopreservação, o ejaculado precisa ser diluído e centrifugado com o intuito de se retirar uma grande parcela do líquido seminal (ASHWOOD-SMITH, 1987), alcançar elevados índices de células espermáticas recuperadas com o mínimo de danos possíveis (MACPHERSON et al, 2001), além de promover o acúmulo de espermatozoides para a posterior diluição em meios crioprotetores (CASTELO, 2010). No entanto, essa técnica pode apresentar efeitos deletérios às células espermáticas dependendo da temperatura, da

intensidade e duração de centrifugação, e do volume de plasma sobrenadante deixado sobre os espermatozoides (RAPHAEL, 2007).

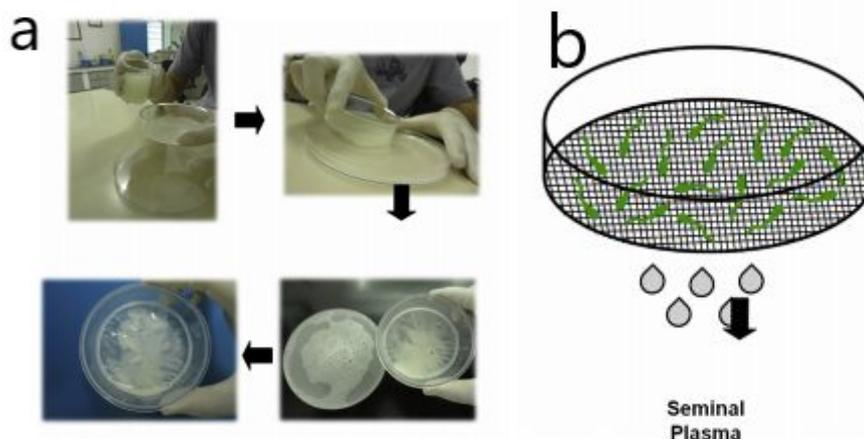
A duração e a intensidade de centrifugação são capazes afetar tanto a integridade da membrana e do acrossomo do espermatozoide quanto o seu potencial cinético, interferindo, dessa forma, na relação entre o espermatozoide e o oócito, e na fecundação e produção embrionária (MACHADO, 2009; RIQUE, 2017). Outro problema relacionado à redução da qualidade espermática provocada pela centrifugação diz respeito à aspiração de aproximadamente 25% de espermatozoides viáveis que ocorre durante a separação do sobrenadante (CAMPANHOLI, 2016; KATKOV; MAZUR, 1998).

Alguns autores analisaram as consequências da centrifugação sobre o espermatozoide. Dell'aqua Jr. et al (2001) executaram testes utilizando três diferentes forças (600g, 800g e 1000g) e tempos de centrifugação (3 min, 5 min e 10 min), com o propósito de avaliar seus efeitos sobre as células com membrana íntegra e a motilidade total. O estudo concluiu que, devido às lesões apresentadas pelas células após o processo, 600g (gravitacionais) por 10 minutos seria o melhor protocolo para se reduzir as lesões causadas ao espermatozoide. Jasko et al. (1991) descreveram que a centrifugação associada à retirada total do líquido seminal e ressuspensão em diluidor à base de leite provocam aumento na motilidade espermática. Diluentes à base de leite, segundo Pagl et al. (2006), possuem uma atividade antioxidante anulando, assim, os efeitos deletérios da centrifugação.

### 2.2.2 Filtração espermática

Outra forma de se executar a separação do líquido seminal é pelo processo de filtração espermática, a partir do uso de equipamentos como o Sperm Filter® (Ceafepe Tecnologia Veterinária Ind., Sorocaba, São Paulo, Brasil). Esse equipamento permite a passagem do plasma, mantendo os espermatozoides sobre o filtro (ALVARENGA et al., 2010). O filtro espermático é formado a partir de uma membrana hidrofílica sintética (figura 1) com a presença de poros de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , por onde o plasma será filtrado (RAMIRES NETO et al., 2013).

**Figura 1:** Passos e 'design' esquemático para o uso do Sperm Filter para remoção do plasma seminal



FONTE: ALVARENGA, et al., 2016 (MODIFICADO)

O filtro espermático não causa lesões aos espermatozoides, mantendo viabilidade celular, além de ser uma técnica usada para animais com sêmen de qualidade baixa que necessita passar por essa separação (ALVARENGA et al., 2010; BRAGA, 2018). Ramires Neto et al. (2013) concluíram que o filtro espermático é tão eficaz quanto a centrifuga, além de possuir vantagens como maior praticidade e uma taxa menor de perda espermática.

Felicio et al. (2019) concluíram que houve melhora na performance dos espermatozoides depois da filtração. Por outro lado, Davolli et al. (2012), quando compararam a viabilidade dos espermatozoides após a centrifugação e da filtração, afirmaram que não há diferença de motilidade total, funcionalidade e integridade de membrana, além de demonstrarem que também não houve diferença significativa na recuperação espermática, não afetando a criopreservação.

### 2.3 Criopreservação

A criopreservação do esperma equino apresenta uma importância muito grande para o melhoramento genético, a manutenção da linhagem de um animal, o encurtamento das barreiras geográficas e a maximização do uso de bons reprodutores (FÜRST et al, 2005). Esse procedimento é dividido em: diluição, separação plasmática, resfriamento, congelamento e descongelamento. Porém, durante algumas etapas da criopreservação, como no processo de refrigeração, diluição e congelamento, as células espermáticas podem ser danificadas (ALMEIDA, 2006).

Durante a etapa de congelamento, os espermatozoides são submetidos a temperaturas abaixo de 0°C e há a formação de cristais de gelo extracelulares e intracelulares (OLIVEIRA, R. A., 2013). O líquido seminal é parcialmente composto por água, que é o principal solvente biológico atuando no transporte de substâncias e, por isso, atravessando livremente as membranas celulares. Durante o congelamento, devido a essa alta permeabilidade da água, existe a formação de cristais de gelo no interior da célula, danificando o espermatozoide (MAZUR, 1984).

Ainda durante a etapa de diminuição da temperatura, ocorre redução metabólica, diminuição de gastos energéticos e queda na produção de catabólitos tóxicos, deixando o espermatozoide em um estado de quiescência (OLIVEIRA, R. A., 2013). Por outro lado, o congelamento pode provocar parada, redução ou até mesmo a aceleração de algumas atividades bioquímicas da célula espermática, podendo danificar ou causar a morte celular (WATSON, 2000). Com o intuito de se reduzir os danos causados pela queda de temperatura, faz-se necessária a adição de substâncias crioprotetoras, auxiliando, dessa maneira, a manutenção do metabolismo dos espermatozoides.

Os crioprotetores são classificados quanto à sua capacidade de penetração na membrana espermática, e são divididos em: invasivos e não invasivos. Os invasivos, ou penetrantes, como o glicerol, possuem um baixo peso molecular e, por isso, apresentam ação intra e extracelular; por outro lado, os crioprotetores não invasivos, também chamados de não penetrantes, são produzidos a partir de substâncias com alto peso molecular, atuando apenas na porção externa da membrana espermática. Proteínas do leite, gema de ovo, lactose, frutose, trealose, polímeros sintéticos como a polivinilpirrolidona, são alguns exemplos de crioprotetores não penetrantes (OLIVEIRA, G. C. et al., 2013; AMANN; PICKETT, 1987).

O glicerol, que é um crioprotetor permeável e portanto atua no interior do citoplasma celular, apresenta mecanismo de ação relacionado à inibição da formação de cristais de gelo no interior ou em locais próximos às células, impedindo que o gelo afete o funcionamento celular (OLIVEIRA, F. J. G. et al., 2017). Os crioprotetores solúveis como o glicerol funcionam como solventes que reduzirão o ponto de congelamento da água permitindo a formação de canais nos quais se alojarão as células espermáticas, evitando, assim, a formação dos cristais de gelo intracitoplasmáticos e na membrana celular (OLIVEIRA, G. C. et al., 2013).

Muitas formas foram propostas como meio de promover uma melhoria no congelamento a partir da redução dos danos sobre as células espermáticas. Juliani e Henry (2008) descreveram em seu trabalho que o mecanismo de associação de crioprotetores, como, por exemplo, a junção de meios à base de leite ou gema com o glicerol, não promove melhora na qualidade dos espermatozoides.

Porém, os mecanismos aplicados para incrementar a proteção dos espermatozoides não se limitam apenas à adição de crioprotetores com o objetivo de se evitar a formação de cristais de gelo no momento do congelamento, mas também incluem sua adição durante a refrigeração, pois eles conferem maior estabilidade de membrana durante esta etapa. (OLIVEIRA, G. C. et al., 2010; AIDAR, 2013).

## **2.4 Avaliação espermática**

### **2.4.1 Aspectos macroscópicos**

Os aspectos macroscópicos, como volume e cor, são imediatamente avaliados após a coleta o sêmen do garanhão (SILVA et al., 2019.) O gel, oriundo do líquido seminal e presente no ejaculado, é filtrado juntamente a qualquer sujeira que possa prejudicar a viabilidade dos espermatozoides. Outros critérios a serem avaliados é o volume ejaculado, que é expresso em mililitros (mL) e varia de animal para animal, e a cor do ejaculado que se encontra, normalmente, em tonalidade branca (FÜRST et al., 2005; SILVA et al., 2019).

### **2.4.2 Aspectos microscópicos**

O microscópio óptico é utilizado como ferramenta necessária para a avaliação das características microscópicas relacionadas às células espermáticas (SILVA et al., 2019). Essas avaliações laboratoriais, segundo Aidar (2013), têm como objetivo analisar a capacidade fecundante da célula espermática, sendo observados os seguintes critérios: vigor (1-5), motilidade espermática (%), concentração espermática ( $10^6$ /mL), patologia espermática e a contagem de células com membrana íntegra.

A análise de motilidade, apesar de não avaliar nenhuma característica que vai influir na capacidade do espermatozoide em fecundar um oócito, é extremamente importante para caracterizar a viabilidade espermática (GRAHAM, 2001; ZÚCCARI, 1998). Já o vigor, critério que representa a intensidade de movimento dos flagelos dos espermatozoides, é classificado, segundo Queiroz (2003), em uma escala evolutiva de 0 a 5, conforme a tabela 1.

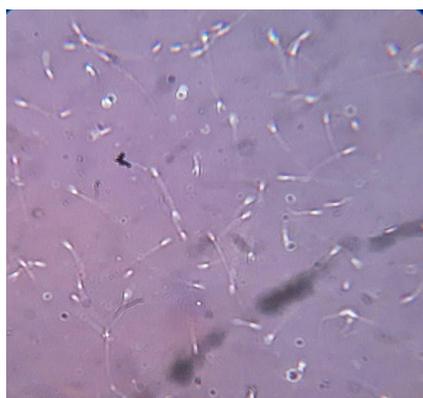
**Tabela 1:** Classificação do vigor da motilidade espermática

Escore	
5	Progressivo retilínio e muito rápido
4	Progressivo retilínio e rápido
3	Intermediário
2	Lento
1	Extremamente oscilatório
0	Sem movimento

FONTE: SILVA, et al., 2019 (Modificado)

O teste de contagem de células com membrana íntegra é essencial para a avaliação da qualidade espermática e deve ser feito em um esfregaço com Eosina-Negrosina (figura 2). Nessa avaliação, são observadas 200 células com o apoio do microscópio óptico (CBRA, 2013). A eosina é um corante que não penetra as células com membrana intacta, corando de rosa apenas os espermatozoides com a membrana lesionada. A nigrosina é um corante importante para que haja o contraste escuro na lâmina, facilitando a diferenciação de células lesadas e íntegras (AIDAR, 2013).

**Figura 2:** Teste de Eosina-Negrosina



FONTE: ARQUIVO PESSOAL DA PESQUISA

### **2.4.3 Teste de Termorresistência (TTR)**

O TTR é uma avaliação que mimetiza a permanência dos espermatozoides no trato genital da fêmea durante o cio (ARRUDA et al., 1992), devendo ser feito a partir da incubação do sêmen a 37°C por um intervalo de tempo específico. Durante o período de incubação a motilidade, o vigor espermático e a integridade de membrana são analisados em intervalos pré determinados. Assim, é possível avaliar o efeito da temperatura na longevidade do espermatozoide (AIDAR, 2013; JONDET, 1980; PICKETT et al., 1961; PINTO et al., 1978).

## **3. METODOLOGIA**

O estudo foi realizado no laboratório de reprodução da Estábulo serviços veterinários LTDA. Foram utilizados os sêmens congelados de 10 garanhões, contendo, em cada partida, o mínimo de  $100 \times 10^6$  espermatozoides com 30% de motilidade total e vigor 3; o material foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos, segundo proposto pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). Após descongelamento foi utilizado o teste de Termorresistência (TTR) para avaliar a qualidade dos espermatozoides.

### **3.1 Grupo Controle**

No grupo controle, o sêmen descongelado, sem aplicação de técnicas de separação, foi incubado à temperatura fisiológica (37°C) para o exame de TTR, sendo analisado quanto à Motilidade Total, Vigor e Integridade de Membrana em quatro momentos distintos.

### **3.2 Grupo Centrífuga**

No grupo centrífuga, o sêmen descongelado foi centrifugado por 10 minutos a 600 vezes a força gravitacional. Em seguida, foram realizadas as análises do TTR.

### **3.3 Grupo 'Sperm Filter'**

No grupo Sperm Filter, o sêmen descongelado foi submetido à filtração através do filtro espermático, o Sperm Filter (Sperm filter<sup>®</sup>, Botupharma, Brasil). Ele também foi ressuspenso mantendo a concentração espermática inicial. Para isso, utilizou-se a mesma

solução crioprotetora (Botucrio<sup>®</sup>) com glicerol. Os mesmos parâmetros de avaliação dos outros grupos foram utilizados para analisar a amostra, imediatamente após a ressuspensão.

### 3.4 Teste de Termorresistência

O Teste de Termorresistência consistiu de avaliações (motilidade, vigor e integridade de membrana) do sêmen incubado a 37°C em quatro intervalos de tempo distintos: 0 minutos ( $t_0$ ), 20 minutos ( $t_{20}$ ), 40 minutos ( $t_{40}$ ), 60 minutos ( $t_{60}$ ) e 90 minutos ( $t_{90}$ ).

### 3.5 Análise estatística

Para a análise estatística 2 diferentes testes foram realizados. Foi utilizado ANOVA (Análise de Variância) com Teste de Tukey para as características de contagem de células com membrana íntegra e motilidade total. Já para a análise de vigor, optou-se pela utilização do teste de Kruskal-Wallis (ALMEIDA, 2006; JULIANI E HENRY, 2008).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, o emprego da centrífuga para a separação do espermatozoide pós-descongelamento, não diferiu dos demais grupos ( $P > 0,05$ ), quando avaliados a motilidade, vigor e integridade de membrana nos diferentes períodos de incubação. Esses dados corroboram os resultados obtidos por Felicio et al. (2019) que, por sua vez, não observaram diferenças significativas na qualidade espermática após os processos de separação, utilizando diferentes métodos.

Notou-se também que, apesar de não ter havido diferenças significativas entre os tratamentos, foi possível observar (Tabela 2) que a motilidade dos espermatozoides submetidos à filtração tendeu a ser mais preservada, principalmente, quando as amostras foram avaliadas no início da incubação ( $T_0$ :  $P = 0,082$ ;  $T_{20}$ :  $P = 0,088$ ). Essa tendência poderia ter sido elucidada caso houvesse um número amostral superior ou uma maior repetibilidade de análises, que desencadearia diferenças significativas entre os parâmetros analisados nos primeiros momentos da incubação. Contudo, não foram observadas melhorias significativas na qualidade espermática quando as amostras foram avaliadas após 40 minutos de incubação.

**Tabela 2** - Avaliação da motilidade total dos espermatozoides (Média  $\pm$  Erro Padrão) dos grupos Controle (CT), Centrífuga e Sperm Filter, durante cinco tempos distintos (T0, T20, T40, T60 e T90)

	MOTILIDADE TOTAL (%)				
	T0	T20	T40	T60	T90
CT	56 $\pm$ 5,207	42,5 $\pm$ 6,292	30 $\pm$ 7,888	19,5 $\pm$ 7,089	12 $\pm$ 6,289
Centrífuga	66 $\pm$ 5,207	59,5 $\pm$ 5,188	41 $\pm$ 8,26	21,5 $\pm$ 8,234	14 $\pm$ 5,617
Sperm Filter	47* $\pm$ 7,311	40* $\pm$ 7,149	23,5 $\pm$ 6,103	11,5 $\pm$ 3,948	3 $\pm$ 1,106

\*Valores que apresentaram tendência a uma diferença significativa

FONTE: ARQUIVO PESSOAL DE PESQUISA

Além disso, foi observada uma melhora na seleção dos espermatozoides no primeiro momento depois do descongelamento (T0), com a centrifugação (Tabela 3). Entretanto, nas avaliações posteriores (T40, T60 e T90) não se observou nenhuma diferença significativa. Esses valores não estão em concordância com os resultados obtidos por Ramires Neto et al. (2012) e Alvarenga et al. (2012), que constataram que a filtração espermática, em esperma equino fresco e refrigerado, foi eficaz devido à redução dos danos mecânicos à célula espermática e à manutenção da sua viabilidade.

**Tabela 3** - Contagem de células com membrana íntegra (Média  $\pm$  Erro Padrão), através do corante Eosina-Nigrosina, nos grupos Controle (CT), Centrífuga e Sperm Filter, durante cinco tempos diferentes (T0, T20, T40, T60 e T90)

	INTEGRIDADE DE MEMBRANA (%)				
	T0	T20	T40	T60	T90
CT	29,67 <sup>AB</sup> $\pm$ 2,376	27,67 $\pm$ 5,524	19,67 $\pm$ 4,991	16,67 $\pm$ 3,667	14,83 $\pm$ 3,772
Centrífuga	34,33 <sup>A</sup> $\pm$ 4,863	25,5 $\pm$ 5,937	12,33 $\pm$ 6,031	20,25 $\pm$ 6,356	15,58 $\pm$ 7,239
Sperm Filter	16,67 <sup>B</sup> $\pm$ 4,978	25,33 $\pm$ 6,697	21,5 $\pm$ 6,402	16,33 $\pm$ 5,188	12 $\pm$ 4,719

\*B indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o grupo Centrífuga e Sperm Filter

FONTE: ARQUIVO PESSOAL DA PESQUISA

A centrifugação espermática é o método mais comum para se selecionar espermatozoides e promover a separação do líquido seminal (FELICIO et al., 2019). Entretanto, a intensidade e o tempo de centrifugação podem causar uma redução da motilidade em até 30%, além de afetarem o vigor e a contagem de células espermáticas com membrana íntegra (RAPHAEL, 2007). Adaptações no protocolo da intensidade e duração da centrifugação, para 600 gravitacionais por 10 minutos (DELL'AQUA JR. et al., 2001),

indicaram redução aos danos celulares. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito das diferentes técnicas de separação plasmática sobre o espermatozoide.

Métodos para a retirada do líquido seminal por meio da centrifugação, com posterior ressuspensão em meio à base de leite, foram responsáveis por um incremento nas taxas de motilidade (JASKO et al., 1991). Além disso, foi observado que a retirada total do líquido seminal poderia influenciar negativamente nos parâmetros seminais, como a motilidade (JASKO et al., 1992). Em contrapartida, a retirada do plasma seminal demonstrou melhoria para ganhões com baixos índices de congelamento (BRINKSO; CROCKETT; SQUIRES, 2000).

Outra forma para promover a separação do líquido seminal é a utilização de um filtro espermático. Esse filtro é constituído por uma membrana sintética com poros de aproximadamente  $2\mu\text{m}$ , cuja função é permitir a passagem apenas do líquido seminal e reter os espermatozoides sobre o filtro (ALVARENGA et al., 2010; RAMIRES NETO et al. 2013). Por não causar danos mecânicos à célula espermática, o Sperm Filter® diminui os prejuízos ao espermatozoide, o que repercute no aumento da qualidade espermática após descongelado (ALVARENGA et al., 2010; FELICIO et al., 2019).

Uma hipótese para a centrifugação ter apresentado resultados superiores ao Sperm Filter na avaliação de integridade de membrana no T0 (Tabela 3), é a possível peroxidação lipídica causada pela exposição das células ao oxigênio durante o processamento. A peroxidação lipídica tem início na presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, quando em contato com o ácido decosa-hexanóico presente na membrana celular do espermatozoide, causam danos à membrana dos gametas masculinos (SANTOS et al., 2019).

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos com respeito à longevidade espermática do sêmen descongelado não indicam diferenças significativas entre o tratamento centrífuga e os demais grupos estudados. No entanto, o baixo número amostral pode ter influenciado na inexistência dessa diferença, algo que poderia ter sido solucionado com, por exemplo, uma maior repetibilidade dos dados. Por outro lado, os dados apontam para a possibilidade da utilização da centrífuga para produzir uma melhora na seleção dos espermatozoides. Essa possibilidade, no entanto, está em desacordo com a literatura, que relata que a filtração tende a conservar de forma mais eficaz a motilidade total e, por não causar danos mecânicos ao espermatozoide, preserva melhor a membrana celular da célula imediatamente após a

separação.

A discordância entre os resultados deste trabalho e pesquisas anteriores deve ser investigada por outros estudos, com o objetivo de elucidar as razões pelas quais o método da centrífuga se mostrou superior aos outros com relação à contagem de células com membrana íntegra dos espermatozoides, no primeiro momento depois do descongelamento. Além disso, estudos futuros devem buscar a confirmação de que a filtração é a melhor opção para se obter uma maior longevidade espermática. Deve-se avaliar também o quanto os processos de filtração e centrifugação do sêmen congelado interferem na fertilidade dos espermatozoides, averiguando se são aplicáveis na reprodução assistida a campo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDAR, N. B. **Criopreservação de Sêmen Equino**. Monografia apresentada à Banca examinadora da Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- ALVARENGA, M. A. *et al.* Advances In Stallion Semen Cryopreservation. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, [s. l.], 2016.
- ALVARENGA, M. A. *et al.* Methods of Concentrating Stallion Semen. **Elsevier**, [s. l.], v. 32, ed. 8, p. 424 - 429, 2012
- ALVARENGA, M.A., et al. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.38, p.319-333, 2010.
- ALVARENGA, M.A., et al. Técnicas para o incremento da qualidade do sêmen de garanhões **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.81-85, 2017
- ALMEIDA, J. L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen eqüino**. 2006. 16p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J Equine Vet Sci**, v.7, p.145-173, 1987.
- ARRUDA, R. P.; BARNABE, V. H.; ALENCAR, M. M.; BARNABE, R. C. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Braz. J. vrt Res. anun. Sei.**, São Paulo, v.29, n.1, p.131-7, 1992.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K.; FULLER, B.J. **Temperature and Animal Cells**. Cambridge: Biologists, p.395-406, 1987.
- AURICH, J. E. *et al.* Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, [s. l.], v. 46, p. 791 - 797, 1996.
- BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; CAIADO, J. R. C.; SOUZA, G. V.; SHIMOYA, A. Efeito das 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. 21152119, 2008.
- BETELLIER, et al. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p. 181190, 2001.
- BRAGA, J. G. S. **Efeitos da filtração ou centrifugação em espermatozoides de asininos submetidos à criopreservação em diluidor comercial Botucio**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) - Universidade Federal da Paraíba, [S. l.], 2019.
- BRANDÃO, A. C. **Efeitos do laser diodo sobre as características de motilidade, integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de**

**espermatozoides.** Tese apresentada ao programa de pós graduação em reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008.

BRINSKO, S. P.; CROCKETTM, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**, p.54, v.129-136, 2000.

CAMPANHOLI, S. P. **Efeito da centrifugação e filtragem de sêmen bovino sobre a criopreservação espermática.** 2016. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), [S. I.], 2016.

CASTELO, T. S. **Efeito dos processos de centrifugação, diluição e descongelamento sobre a qualidade do sêmen de catetos (Tayassu tajacu, Linnaeus, 1758).** In: CASTELO, T. S. **Efeito dos processos de centrifugação, diluição e descongelamento sobre a qualidade do sêmen de catetos (Tayassu tajacu, Linnaeus, 1758).** 2010. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, [S. I.], 2010.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal.** 2a ed., p.49, 1998.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 3.ed., 104 p., 2013.

DAVOLLI, G. M.; CAMOZZATO, G. C.; FIGUEIREDO, M. M.; BASTOS, H. B. A.; CAZALES, N.; MATTOS, R. C. Effect of different sperm concentration methods on sperm quality and recovery rate. **Journal of Equine Veterinary Science**, Maryland Heights, v. 32, p. 482-483, 2012

DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; ZAHN, F. S. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. **Animal reproduction Science**, V. 68, p. 324-35, 2001

EKHLASI-HUNDRIESER, M.; GOHR, K.; WAGNER, A.; TSOLOVA, M.; PETRUNKINA, A.; TÖPFER-PETERSEN, E. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in pig. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 3, p. 536-45, 2005b.

FELICIO, L. C. S. *et al.* Equine semen cryopreservation: comparison between centrifugation and filtration. **Pferdeheilkunde**, [s. I.], p. 437 - 441, 2019.

FURST, R., et al. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa**, Belo Horizonte, 2005.

GRAHAM J. Assessment of sperm quality. In: International Symposium on Stallion Reproduction, 3, 2001, Fort Collins. Proceedings... Fort Collins: ISSR, 2001. p.23. **Resumo.**

GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A; PAPA, F. O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Vet. e Zootec**, Botucatu, SP, p. 169 - 180, 2012.

JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristic of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 35, p. 1059-1067, 1991.

JASKO, D. J.; HATHAWAY, J. A.; SCHALTENBRAND, V. L.; SIMPER, W. D.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, p.1241-1252, 1992

JONDET, R. **Contribution a l'amelioration de la technologie du sperme de taureau**. Rennes, 1980. 166 f Thèse (Docteur)- UER de Sciences Biologiques, Université de Rennes.

JULIANI, G. C.; HENRY, M. Efeito do glicérol, etilenoglicol, acetamida e leite desnatado na criopreservação de espermatozoides eqüinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 1103 - 1109, 2008.

KARESKOSKI, M; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Anim Reprod Sci**. 2008;

KATILA, T. *et al.* Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, [s. l.], v. 58, ed. 2, p. 241 - 244, 2002.

KATKOV, I. I.; MAZUR, P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield and cell associations of mouse spermatozoa. **J Androl.**, v. 19, p. 232–241, 1998.

KLOPPE, L. H. *et al.* Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa. **Theriogenology**, [s. l.], v. 29, ed. 2, p. 429 - 439, 1998.

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p.1289–1297, 2009.

MACPHERSON, M.L.; SIMMEN, R.C.M.; SIMMEN, F.A.; HERNANDEZ, J.; SHEERIN, B.R.; VARNER, D.D.; LOOMIS, P.; CADARIO, M.E.; MILLER, C.D.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.; BLANCHARD, T.L. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 equine seminal plasma: Association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, v.67, p.648-654, 2001.

MARENGO, S. R. Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. **Animal Reproduction Science**, p.52 -63, 2008

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American Journal of Physiology**, v.247, p.125-142, 1984.

MILLER, D.J; *et al.* Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biol Reprod**,v.42, p.899-915, 1990

MORTIMER, S. T.; SWAN, M. A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, p. 2139-46, 1998.

OLIVEIRA, G. C.; et al. Características espermáticas do sêmen equino congelado com diferentes crioprotetores. In: Conferência Anual da Abraveq, 9, 2010, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo, SP: ABRAVEQ, v.29, p.304-305., 2010

OLIVEIRA, G. C.; et al. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, jan./mar. 2013

OLIVEIRA, R.A. Criopreservação de sêmen equino, um desafio a ser vencido. **PUBVET**, Londrina, V. 7, N. 26, Ed. 249, Art. 1647, Suplemento 2, 2013.

OLIVEIRA, F. J. G., et al. Efeito da adição de glicerol em diferentes etapas do resfriamento na congelabilidade do sêmen equino. **Revista de medicina veterinária** - ISSN 1679-7353 Ano XIV - Número 29, 2017

OSÓRIO, J. P. *et al.* Princípios do Congelamento de Sêmen do Garanhão. **Ciên. Biol. Saúde**, [s. l.], n. 2, ed. 10, p. 15 - 22, 2008.

PAGL, R. *et al.* Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milkbased extender for storage of equine semen at 5 °C. **Theriogenology**, [s. l.], v. 66, ed. 5, p. 1115 - 1122, 2006.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation produces on sperm membranes. **Theriogenology**, [s. l.], v. 38, p. 209 - 222, 1992.

PICKETT, B. W.; MARTIG, R. C.; COWAN, W. A. Preservation of bovine spermatozoa at -79 and 198°C. **J. Dairy. Sci.**, v.44, p.2089-96, 1961

PINTO, P. A.; SANTOS, A. E.; VALE FILHO, V. R., *et al.* Tecnologia de sêmen-teste de termorresistência de sêmen bovino, utilizando-se animais *Bos taurus* e *Bos indicus*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE VETERINÁRIOS DE LÍNGUA PORTUGUESA, 1., 1978, São Paulo, **Anais...** São Paulo, 1978, p. 77.

QUEIROZ, V. S. **Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozóides.** In: QUEIROZ, V. S. Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozóides. 2003. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, [S. l.], 2003.

RAMIRES NETO, C., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Plasma membrane lipid profile from resistant and sensitive spermatozoa of mangalarga marchador stallions after cooling at 5°C. **J Equine Vet Sci**, v.43, p.S76-S77, 2016

RAMIRES NETO, C. *et al.* Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 33, p. 40-43, 2012.

RAMIRES NETO, C. *et al.* New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, [s. l.], v. 79, ed. 1, p. 1120-1123, 2013.

RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide equino refrigerado** Dissertação (mestrado), Universidade de São Paulo, 2007

RIQUE, A. S. **Efeito da centrifugação e açúcares na criopreservação de espermatozoides caprinos**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) - Universidade Federal da Paraíba, [S. l.], 2017.

SANTOS, B. E. S.; BRANDI, R. A.; GAMEIRO, A. H. Estudo do mercado e produção do cavalo brasileiro de hipismo no estado de São Paulo. **Pubvet**, [s. l.], v. 12, ed. 2, p. 1 - 11, 2018.

SANTOS, M. A. *et al.* Uso de peroxidação lipídica na avaliação da ação de antioxidante em sêmen criopreservado. **Pubvet**, [s. l.], v. 13, ed. 8, p. 1 - 7, 2019.

SILVA, R. O. F. **Avaliação dos parâmetros do sêmen equino pré e pós-congelamento após separação dos espermatozoides com a utilização de lâ de vidro** Dissertação (mestrado), UFSM-RS, 2018

SILVA, V. O.; MORELLI, K. G.; COUTINHO, G. T. R. M. Princípios básicos da manipulação, análise e envio do sêmen equino. **Pubvet**, [s. l.], v. 13, ed. 10, p. 1 - 9, 2019.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Principles of cryopreservation. in: cooled and frozen stallion semen. **Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**. Colorado State University. pp.9, 1999.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility Development**, v. 7(4), p. 871-89, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

WITE, R. G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal In: Hafez ESE. **Reprodução animal**. 4a ed. São Paulo: Manole; p.212-28, 1988.

ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 1998.