

Artículo de revisión

ESTRATÉGIAS PARA MELHORAR A QUALIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN DE REPRODUTORES EQUINOS

Strategies to improve the quality and fertility of stallion semen

M. A. Alvarenga; C. Ramires Neto; F. Ozanam Papa

*Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia - UNESP, Botucatu, SP Brasil*

Email: malvarenga@fmvz.unesp.br

RESUMO

Na espécie equina, a seleção dos reprodutores não é baseada nas características reprodutivas dos animais além do que muitos sementais tem idade avançada, conseqüentemente muitos indivíduos são sub-férteis ou inférteis. Diversas técnicas vem sendo desenvolvidas com a finalidade de aumentar a qualidade e fertilidade do sêmen fresco, refrigerado e congelado de garanhões. O objetivo do presente artigo é descrever as principais técnicas que vem sendo utilizadas em andrologia equina para fins de melhoria da qualidade e fertilidade do sêmen de reprodutores equinos.

Palavras-chave: *Equine, sêmen, fertilidade*

SUMMARY

In the horse industry stallion selection is not based on fertility also several males are old in age, consequently the percentage of stallions with low fertility is high. Several techniques have been developed aiming to improve the quality and fertility of fresh, cooled and frozen stallion semen. The goal of the present paper was to review the most important techniques that were recently developed to increase de quality and fertility of stallion semen.

Key Words: *Equine, semen, fertility*

INTRODUÇÃO

Na espécie equina a seleção dos reprodutores não é realizada baseada nas características reprodutivas, mas através de fatores fenotípicos, como a conformação e a performance atlética associado a este fato muitos reprodutores com idade avançada (> 18 anos) permanecem em atividade reprodutiva. Existindo conseqüentemente a necessidade de se utilizar estratégias para aumentar a qualidade do sêmen e fertilidade destes animais (Brinsko *et al.* 2007). Acredita-se que muitos fatores podem interferir na qualidade e resistência a criopreservação do sêmen de garanhões, destacando-se principalmente os fatores genéticos e relacionados à composição da membrana plasmática espermática e do plasma seminal. Algumas raças apresentam maior susceptibilidade à lesões espermáticas decorrentes dos processos de criopreservação. Estudo realizado por Alvarenga *et al.* (1996) demonstrou que garanhões das raças germânicas de hipismo e cavalos da raça Quarto de milha possuem melhores parâmetros espermáticos após a congelação do sêmen que os de outras raças especialmente da raça Brasileira Mangalarga Marchador e cavalos de origem ibérica. Uma dos fatores relacionados a resistência ao processo de criopreservação é a composição da membrana plasmática dos espermatozoides, que está diretamente relacionada com a sua fluidez e integridade desta membrana. Durante a criopreservação espermática podem ocorrer rupturas da membrana plasmática e ocasionando em perda da viabilidade destes espermatozoides (White, 1993), sendo os fosfolípidos e colesterol, que compõem esta membrana importantes para a manutenção de sua integridade estrutural e fluidez (Parks & Ehrenwald, 1990). Sabe-se que a composição dos ácidos graxos e a proporção dos lípidios que compõem a membrana plasmática dos espermatozoides está diretamente relacionada à sua resistência à criopreservação (Parks & Lynch, 1992; LeBIG *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2011a). Em trabalho recente desenvolvido por nosso grupo observamos que existem diferenças marcantes nos constituintes de membrana entre cavalos que resistem e não resistem ao processo de

congelo de sêmen (Ramires & Alvarenga, 2014 -dados não publicados)

Outro fator que também está relacionado à qualidade seminal e resistência espermática à criopreservação, principalmente à refrigeração, é a composição do plasma seminal, que é variada entre os animais, podendo ser torna-lo benéfico ou deletério aos espermatozoides (Jascko *et al.*, 1992). Estudo recente realizado por Monteiro *et al.* (2014) demonstrou em garanhões sub-férteis que os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo, que não tiveram contato prévio com plasma seminal, possuem maior qualidade e fertilidade quando que os do ejaculado, demonstrando um efeito deletério da plasma seminal sobre a viabilidade espermática nestes animais.

Técnicas para melhorar a qualidade e fertilidade sêmen de garanhões

Remoção do plasma seminal

O plasma seminal é conjunto de fluidos produzidos pela rede testis, epidídimo e glândulas acessórias, que é expelido em frações durante a ejaculação e tem a função de transportar e fornecer substratos metabólicos para os espermatozoides, além de participar do processo de maturação espermática (Troedsson *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2000). Este é composto por substâncias protetoras e estimuladoras das células espermáticas (Squires *et al.*, 1999), contudo devido a sua composição variável entre os reprodutores (Almeida, 2006), o plasma seminal pode ser benéfico ou deletério à qualidade espermática (Jascko *et al.*, 1992). Com isso, algumas vezes é necessário removê-lo para aumentar o tempo de viabilidade do sêmen refrigerado (Brinsko *et al.*, 2000; Kareskoski & Katila, 2008). Estudos realizados por Brinsko *et al.* (2000) e Ramires-Neto *et al.* (2012) demonstram que em simentais com baixa resistência espermática à refrigeração (“Bad cooler stallions”) quando se remove o plasma seminal, há uma aumento da qualidade seminal após a refrigeração. Existem diversas técnicas para concentrar espermatozoides do ejaculado de garanhões, entretanto a mais comumente utilizada é a centrifugação. Contudo,

estudos demonstraram haver efeitos deletérios da centrifugação sobre a viabilidade dos espermatozoides, uma vez que a força e tempo de centrifugação podem interferir negativamente na motilidade, integridade e taxa de recuperação espermática (Sieme *et al.*, 2003). Para realizar a remoção do plasma seminal através da centrifugação convencional o sêmen deve ser acrescido de diluente a base de leite desnatado na proporção 1:1. Posteriormente realiza-se o processo de centrifugação. A intersecção entre tempo e força de centrifugação que apresenta maior taxa de recuperação espermática com maior porcentagem de espermatozoides íntegros é 600xg durante 10 minutos (Dell`aqua *et al.*, 2000). Posteriormente a centrifugação, o sobrenadante deve ser desprezado utilizando um cateter acoplada a uma seringa ou uma bomba de vácuo e o pellet ressuspensionado com o meio extensor desejado. Sempre que houver uma compactação muito grande do pellet de espermatozoides deve-se diminuir nas coletas futuras a força de centrifugação ou utilizar de outras técnicas como a filtração e o cushion visando minimizar o excessivo empacotamento dos espermatozoides.

Uma alternativa para remover plasma seminal do ejaculado, minimizando as lesões aos espermatozoides, é a centrifugação com uma substância coloidal denominada cushion. Este método visa maximizar a recuperação de espermatozoides de sêmen centrifugado de ganhões pois utiliza forças de centrifugação elevadas e reduzir os danos decorrentes do empacotamento dos espermatozoides, uma vez que o cushion no fundo do tubo de centrifuga funciona como uma almofada que reduz o dano a célula espermática (Ecot *et al.*, 2005; Knop *et al.*, 2005; Sieme *et al.* 2005; Sieme *et al.* 2006).

Para realizar a remoção do plasma seminal utilizando centrifugação com cushion, o sêmen deve ser diluído na proporção 1:1 com meio diluente a base de leite desnatado e armazenado em um tubo falcon de 50 mL. Deve-se depositar cuidadosamente 1mL de cushion no fundo do tubo de centrifuga, utilizando uma cateter acoplado a

uma seringa. Realiza-se centrifugação a 1000xg durante 20 minutos. Posteriormente a centrifugação, o sobrenadante deve ser cuidadosamente removido através da aspiração com um cateter acoplado a uma seringa ou um equipamento de aspiração. Após isso, remove-se cuidadosamente também a solução de cushion utilizando um cateter acoplado a uma seringa e ressuspende-se o pellet com o meio extensor desejado. Visando também reduzir estes danos aos espermatozoides decorrente da técnica de remoção do plasma seminal, pode-se utilizar um filtro composto por membrana hidrofílica sintética (Sperm Filter[®], Botupharma, Brasil) com poros de 2µm que retêm os espermatozoides e possibilitando a passagem somente do plasma seminal (Ramires Neto *et al.*, 2013).

O sêmen também diluído na proporção 1:1 com meio extensor a base de leite desnatado é depositado sobre a membrana e deve-se realizar movimentos leves tocando-a em uma placa de petri de 15 cm. Desta maneira, devido ao tamanho dos poros e à capilaridade, o plasma seminal passa através do filtro e os espermatozoides ficam retidos. Posteriormente acrescenta-se o meio extensor ao filtro no volume previamente calculado e realiza-se homogeneização para ressuspensão dos espermatozoides. O processo dura em média de 5 minutos e o filtro pode ser usado por pelo menos 10 vezes.

Seleção espermática

As técnicas de seleção espermática visam melhorar a qualidade do sêmen fresco, refrigerado ou congelado de ganhões através da separação dos espermatozoides com motilidade progressiva, sem defeitos morfológicos do restante do ejaculado (Macpherson *et al.*, 2002) e para isso utiliza-se a centrifugação em gradientes de densidade. Esta técnica possuiu grande potencial para melhorar o aproveitamento reprodutivo, principalmente de ganhões subfêrteis (LEÃO, 2001). A seleção em gradiente de Percoll é uma das técnicas mais utilizadas para centrifugação de células, vírus e partículas subcelulares (Samardzija *et al.*, 2006) do sêmen, contudo a taxa de recuperação de células é

baixa (Leão *et al.*, 2001). Recentemente foi proposto um novo gradiente de densidade para seleção de espermatozoides, utilizando um colóide composto por partículas de sílica recobertas com silane (Samardzija *et al.*, 2006). Ao testar este novo gradiente em garanhões Macpherson *et al.* (2003) demonstraram a eficiência deste método para separar células com motilidade adequada e morfologicamente normais do sêmen refrigerado. Ramires-Neto *et al.* (2012) e Maziero *et al.* (2012) também observaram que a utilização da seleção espermática com colóide composto por partículas de sílica recobertas com silane denominado comercialmente de Equipure aumentou a resistência espermática à refrigeração. Papa *et al.* (2012) ao testarem este colóide antes da congelação de sêmen equino observaram aumento significativo dos parâmetros de cinética espermática tanto após a seleção espermática quanto após a descongelação do sêmen. Stoll *et al.* (2012) observaram melhora dos parâmetros espermáticos com a seleção espermática realizada após a descongelação, entretanto neste caso a recuperação espermática foi extremamente baixa. Diversos autores tem demonstrado melhora da fertilidade de sementais sub férteis com o uso do Equipure. Para realizar a seleção espermática com o gradiente de densidade, um total de 1×10^9 espermatozoides devem ser concentrados em 5 mL de diluente comercial à base de leite desnatado, para isso pode-se utilizar a centrifugação convencional, a centrifugação com cushion (Minitube, Alemanha) ou a filtração em SpermFilter (Botupharma, Brasil).

Após isso, 5 mL do gradiente de densidade (Equipure) deve ser adicionado em um tubo falcon de 15 mL. Os 5 mL com o sêmen concentrado deve ser cuidadosamente adicionado neste mesmo tubo, acima do gradiente de densidade. Para isso, pode-se utilizar um pipeta pasteur, deslizando vagarosamente o sêmen através das paredes do tubo falcon. É realizada uma centrifugação de 400xg por 20 minutos e após isso os espermatozoides sem alterações morfológicas e com motilidade progressiva ficam depositados no fundo do tubo falcon. O restante do ejaculado fica retido acima do gradiente de densidade. Com o

auxílio de uma pipeta de 1mL deve-se remover o pellet com os espermatozoides selecionados e diluí-lo com o meio apropriado.

Meios diluente especiais

Para o armazenamento seminal a baixas temperaturas é necessário a utilização de diluentes apropriados. Estes meios diluentes possuem vários componentes básicos que atuam na manutenção da atividade metabólica dos espermatozoides, estabilização da membrana plasmática mediante o equilíbrio do pH do meio, proteção contra o choque térmico, manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico, inibição do crescimento bacteriano, fornecimento de energia (Fürst, 2006; Lorenzoni, 2010) e como crioprotetores (Amann & Pickett, 1987). Existem no mercado diversos meios diluente para refrigeração de sêmen equino. Estudo realizado por Papa *et al.* (2014) comparou os diluentes comerciais Botu-sêmen (Botupharma, Brasil) e INRA 96 (IMV, França) e observou superioridade dos parâmetros espermático e fertilidade do sêmen após 24 horas de refrigeração à 5°C diluído com Botu-sêmen, sendo esta diferença mais pronunciada quando utilizou-se garanhões com baixa resistência espermática à refrigeração. Neste mesmo experimento, foi observado no sêmen diluído com INRA 96 um maior crescimento bacteriano após 24 horas de refrigeração, o que pode ser explicado pelas concentrações de antibióticos presentes em cada um dos diluentes comerciais. A contaminação microbiana no sêmen propicia o aumentando da quantidade de radicais livres neste sêmen, ocasionando lesões irreversíveis à membrana espermática (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009), além de predispor a ocorrência de problemas uterinos na fêmea, como endometrite (Griggler *et al.*, 2001). Nas pesquisas com meios diluentes para refrigeração do sêmen equino, um fator que tem ganhado destaque é a incorporação de colesterol na membrana plasmática dos espermatozoides através do complexo de inclusão com ciclodextrina. Há na literatura relatos que bactérias com menor teor de colesterol na membrana apresentam uma pequena tolerância a baixas temperaturas (White, 1993). Combes *et al.* (2000) incorporando colesterol à

membrana plasmática de espermatozoides equinos, obtiveram melhora da cinética espermática e integridade de membrana. Realizando estudo semelhante, Hartwing *et al.* (2013) observaram aumento da qualidade e fertilidade do sêmen de garanhões após a refrigeração à 5°C por 24 horas quando utilizou meio diluente a base de leite desnatado acrescido do complexo de colesterol e ciclodextrina, sendo estas diferenças mais significativas também em garanhões com baixa resistência espermática à refrigeração. Nos meios diluentes de congelamento, um dos principais componentes são os crioprotetores. Estas substâncias ligam-se à água modificando seu ponto de fusão, removendo assim os núcleos de cristalização e diminuem a faixa crítica de temperatura na qual se formam os cristais responsáveis pela crioinjúria (Amorim, 2006). Existem duas classificações para os crioprotetores: penetrantes ou não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes mais utilizados em equinos são: glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfoxido e amidas (Medeiros *et al.*, 2002; Squires *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2005). A associação das amidas e glicerol no diluente de congelamento demonstrou maior proteção aos espermatozoides de garanhões, principalmente sobre a cinética espermática após a descongelamento, quando comparado ao diluente apenas com glicerol. Espera-se que a menor viscosidade das amidas associado a seu menor peso molecular favorece a permeabilidade destes compostos à membrana plasmática diminuindo o stress osmótico melhorando preservação das células espermáticas durante o processo de criopreservação com conseqüente incremento da fertilidade (Alvarenga, 2005).

REFERÊNCIAS

- Almeida, J.L. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino. 2006. 16 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
- Alvarenga, M.A.; Papa, F.O.; Buratini Jr, J. The effect of breeds spermatoc parameters over equine semen freezability. In: *Symposium on Stallion Semen*, Amersfoort. Proceedings 82, 1996.
- Alvarenga, M.A.; Papa, F.O.; Landim-Alvarenga, F.C.; Medeiros, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Anim. Reprod. Sci.*, 89:105-113, 2005.
- Amann, R.P.; Pickett, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equi. Vet. Sci.*, 7, 3, 145-173, 1987.
- Amorim, P.K.R. Efeito da criopreservação sobre características estruturais e funcionais do espermatozóide equino (*Equus caballus*). 2006. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.
- Brinsko, S.P.; Crocke, E.C.; Squires, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 54, 129-36, 2000.
- Brinsko, S.P.; Love, C.C.; Bauer, J.E. *et al.* Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, 99, 1, 65-71, 2007.
- Combes, G.B.; Varner, D.D.; Schroeder, F.; Burghardt, R.C.; Blanchard, T.L. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 56, 127-32, 2000.
- Dell'aqua, J.A.; Papa, F.O.; Alvarenga, M.A.; Zahn, F.S. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2001. 68, 324-25.
- Ecot, P.; Decuadro-Hansen, G.; Delhomme, G.; Vidament, M. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. *Anim. Reprod. Sci.*, 1005. 89, 245-248.

- Fürst, R. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino. 2006. 96f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- 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 stallions permatozoa. *Theriogenology*, 1992, 37,1241-52.
- Garcia, B.M.; Fernandez, L.G.; Ferrusola, C.O.; Bolanos, J.M.G.; Martinez, H.R.; Tapia, J.A.; Morcuende, D.; Pena, F.J. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2011. 75: 811–818.
- Hartwig, F.P., Lisboa, F.P., Monteiro, G.A., Maziero, R.R., Freitas-Dell Aqua, C.P., Alvarenga, M.A., Papa, F.O., and Dell Aqua, J.A. Jr. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*. 2013, 81(2):340-346
- Leão, K.M.. Inseminação artificial por endoscopia com número reduzido de espermatozoides utilizando sêmen fresco e congelado de garanhões. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.
- Lorenzoni, S.R.G. Criopreservação de sêmen equino envasado em criotubo. 2010. 65f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Leßig, J.; Gey, C.; Süß, R.; Schiller, J.; Glander H.J.; Arnhold, J. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and 31P NMR spectroscopy. *Comp BiochemPhysiol B*, 2004. 137; 265-277.
- Kareskoski, M.;Katila, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008, 107, 249–56.
- Knop, K.; Hoffmann, N.; Rath, D.; Sieme, H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Anim Reprod Sci*, 2005. 89, 294-297.
- Macpherson, M.L.; Shore, M.D.; Fernandez, M.H.; Miller, C.D.; Thompson, J.A.; Blanchard, T.L.; Varner, D.D. Processing factors which influence viability and fertility of cryopreserved equine spermatozoa. *Havemeyer Foundation Mono Series*, v.6, p.27-29, 2001.
- Parks, J. E.; Ehrenwald, E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation.In 'Fertilization in Mammals'. (Eds B. D. Bavister, J. Cummins and E. R. S. Roldan.) pp. 155-67. (*Serono Symposium: Norwell*), 1990.
- Medeiros, C.M.O.; Forell, F.; Oliveira, A.T.D.; J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 2002, 57: 1, 327-344.
- Monteiro, G.A. Criopreservação e fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis. 2013. 120f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Estado de São Paulo, Botucatu.
- Ortega-Ferrusola, C.; Gonzalez-Fernandez, L.; Muriel, A.; Macias-Garcia, B.; Rodriguez-Martinez, H.; Tapia, J.A.; Alonso, J.M.; Pena, F.J.Does the Microbial Flora in the Ejaculate Affect the Freezeability of Stallion Sperm? *Reprod. Dom.*, 2009, 44, 518–522.
- Samardzija, M.; Karadjole; Matkovic, M.; Cergolj, M.; Getz, I.; Dobranic, T.; Tomaskovic, A.; Petric, J.; Surina, J.;Grizelj, J.; Karadjole, T.A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim. Reprod. Sci.* 2006, 91: 237-47
- Papa, P.M.; Maziero, R.R.D.; Hartwig, F.P.; Lisboa, F.P.; Dellaqua; J.A.; Alvarenga, M.A.; Guasti, P.N.; Landim-Alvarenga, F.C.; Papa, F.O. Effect of density gradient on sperm parameters os stallion frozen semen. *J. Equi. Vet. Sci.* 2012, 32: 505, 6th ISSR Abstract.
- Ramires Neto, C.; Monteiro, G.A.; Soares, R.F.;Pedrazzi, C.;Dell`aqua, J.A.; Papa, F.O.;

- Alvarenga, M.A. Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. *Journal of Equi Vet Sci*, 2012, 33, 40-3.
- Ramires-Neto, C.; Monteiro, G.A.; Delfiol, D.J.Z.; Farras, M.C.; Maziero, R.R.D.; Hartwing, F.P.; F.O. Papa, M.A. Alvarenga. Effect of different methods for sperm selection on cooled stallion semen. *J. Equi Vet Sci*, 2012^b.32, 509,
 - Ramires Neto, C.; Monteiro, G. A.; Soares, R.F.; Pedrazzi, C.; Dell'aqua, J.A.; Papa, F.O.; Castro- Chaves, M.M.B.; Alvarenga, M.A. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*, 2013, 79.1120-1123.
 - Sieme, H.; Martinsson, G.; Rauterberg, H.; Walter, K.; Aurich, C.; Petzold, R.; Klug, E. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod. Domest. Anim.* 2003, 38, 134–40.
 - Sieme, H.; Knop, K.; Rath, D. Effects of duration, force of centrifugation and cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. Havemeyer Foundation Mono Series, 2005, 18: 6-9.
 - Squires *et al.* Cooled and frozen stallion semen: animal reproduction and biotechnology laboratory. Colorado: Colorado State University (Bulletin n. 9) 1999.
 - Squires, E.L.; Keith, S.L.; Graham, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 2004, 62, 1056-1065
 - Stoll, A.; Love, C.C.; Ball, B.A. Use of a Single-Layer Density Centrifugation Method Enhances Sperm Quality in Cryopreserved–Thawed Equine Spermatozoa. *J. Equi. Vet. Sci.* In Press, 2012.
 - Troedsson, M.H.; Loset, K.; Alghamdi, A.M.; Dahms, B.; Crabo, B.G. Inter- action between equine semen and the endometrium: the inflam- matory response to semen. *Anim Reprod Sci*, 2001. 68, 273-8.
 - White, I.G. Lipids and calcium take of sperm in relation to cold-shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*, 1993, 5:.639-58.