

IGOR FREDERICO CANISSO

**COMPORTAMENTO SEXUAL, PARÂMETROS SEMINAIS E FERTILIDADE DO SÊMEN CONGELADO DE JUMENTOS (*Equus asinus*) DA RAÇA PÊGA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

*Arrima-te ao bordão da esperança, convicto de que o sol que dissipará as sombras espessas das dificuldades que atravessas não tardará a despontar no horizonte que já se inflama de luz...*

*Irmão José*

*Para os montes levanto os olhos: de onde de me virá socorro?  
O meu socorro virá do Senhor, criador do céu da terra.  
Ele não permitirá que teus pés resvalem; não dormirá aquele que te guarda.  
Não, não há de dormir, nem adormecer o guarda de Israel.  
O Senhor é teu guarda, o Senhor é teu abrigo, sempre o teu lado.  
De dia, o sol não te fará mal; nem a lua durante a noite.  
O senhor te resguardará de todo o mal; ele velará sobre tua alma.  
O Senhor guardará os teus passos, agora e para todo sempre.  
Salmo 120... Deus guarda de seu povo: Cântico das peregrinações,*

*Bíblia Sagrada*

## *Dedico*

*A Deus;*

*Aos meus pais,*

*Antonio Canisso Neto e*

*Rosa Ilda Frederico Canisso.*

*À minha irmã Aline Frederico Canisso;*

*À Erotides Capistrano da Silva minha companheira.*

*Aos meus avós:*

*Antonio Frederico e*

*Divina Monteiro Frederico;*

*Alexandre Canisso (in memorian) e*

*Maria Montouro Canisso (in memorian).*

*Aos meus outros pais,*

*Mauricio Capistrano da Silva e*

*Dionice Maria Capistrano Ferreira..*

*A todos os meus pacientes, especialmente os eqüídeos.*

*À minha égua Pampa, grande responsável por essa carreira.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade da realização deste mestrado.

Ao CNPq pela concessão de uma bolsa de mestrado em período integral, condição indispensável para a realização desta pós-graduação.

Ao professor Giovanni Ribeiro de Carvalho pelos ensinamentos e oportunidade.

Aos professores José Domingos Guimarães e Ciro Alexandre Alves Torres pelos ensinamentos e pela co-orientação.

Ao senhor Luís Felipe Haddad pela abertura das portas de seu haras e pelo apoio financeiro.

À Nutricell Campinas São Paulo Ltda, pelo empréstimo de um aparelho de Ultra-som.

Aos professores do programa de pós-graduação da Universidade Federal de Viçosa e da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pelos conhecimentos transmitidos no decorrer das disciplinas cursadas.

Aos funcionários do Setor de Eqüideocultura do DZO-UFV, em especial, ao Fernando Antonio Freitas e ao José Paulo Behning.

Aos funcionários da sede do DZO-UFV, principalmente, a Maria Celeste, Venâncio, Rosana, Mario.

A todos os estagiários que contribuíram com sua ajuda durante o período experimental. Um especial agradecimento a algumas pessoas que foram indispensáveis para a realização desta dissertação, sendo os estagiários: Pedro Game Ker, Tiago Castro Senna e Aline Luciana Rodrigues; ao gerente, José Roberto do Haras Tarumã e ao pós-graduando Leonardo Franco Martins.

Aos funcionários do Haras Tarumã Guaraciaba – Minas Gerais, Antonio, Custódio, Dona Maria e Gérson, pelos grandes auxílios.

Aos vários estagiários, alunos de veterinária e zootecnia, que muito contribuíram temporariamente: Ana Paula Brustolini, Renan Reis de Oliveira, Jairo, Ana Claudia e Mateus.

A todos os organizadores do I – Simpósio Mineiro de Eqüideocultura: Ana Paula Brustolini, Aline Luciana Rodrigues, Ana Cristina, Bernardo Lima Rodrigues, Luciano Lago, Tatiane, Erick, Natali e Giovanni Ribeiro de Carvalho. Graças a nossa participação ativa e integrada que pudemos realizar o I-SIMEQ, que veio brindar esta pós-graduação e minha passagem por Viçosa.

Aos companheiros de pós-graduação: Charles Bispão, Muller Pallão, Hebert Rovay, Rogério Fürst, Fabiana Lana e a todos os outros que não foram aqui citados.

Aos meus amigos mineiros e “amineirados”: Luisa Mellvile; Bernardo Lima Rodrigues; Rogério Pinho, Reno Roldi Araújo; Erick Castilho, Leandro Maia.

A Ana Cristina Tolomelli e a Ana Paula Brustoline pela amizade e grande ajuda no encaminhamento final desta dissertação.

A minha esposa Erotides Capistrano da Silva por todo amor, carinho e apoio durante toda essa jornada.

A meus pais Antonio Canisso Neto e Rosa Ilda Frederico Canisso, pelo amor e carinho, por terem me preparado para a grande missão da vida.

Ao senhor Mauricio Capistrano da Silva e a senhora Maria Dionice Capistrano Ferreira, por todo o apoio, amizade e carinho ao longo de todos esses anos, e por terem me recebido como filho na vossa família.

Aos meus avós Divina Monteiro Frederico e Antonio Frederico, o meu muito obrigado pelo amor, afeto, ensinamentos e apoio na jornada.

Aos meus avós Alexandre Canisso e Maria Montouro Canisso (*in memorian*), que Deus os guarde no céu, o meu muito obrigado. Quero registrar que talvez sem o apoio do meu avô no começo de minha vida eu não teria a honra de me tornar médico veterinário.

A minha irmã Aline Frederico Canisso pelo amor e apoio nas grandes dificuldades desta jornada.

Aos meus grandes amigos das épocas do Paraná, dos tempos de vacas muito magras, pelos grandes auxílios, amizade e momentos de alegria: Ana Luiza Vieira, Adriana Castaldo Colósio, Maicon Lobo Castro, Thiago Felipe Martins, Cristiane Reis Scala e Fernando Lunardeli.

Ao Dr. Valdemar Bertequini (*in memorian*) Médico Veterinário, Hipiatra e Teriogeneologista, que primeiro me apresentou a reprodução de eqüídeos, e pelo auxílio junto aos meus pais no convencimento da minha escolha de carreira.

Aos animais, meus pacientes utilizados no período experimental, obrigado pelo agradável convívio e apaixonante contato que vocês me proporcionaram.

A todos os meus familiares que de modo direto e indireto contribuíram para a obtenção do êxito na jornada: Marli Marques Nogueira, Maria Frederico Nogueira, Antonio Marques Nogueira, Inês Frederico, Viviane Verones, Jean César Verones, Carlos Marques Nogueira, Paulo Frederico, Fernando Tolomei Lopes em especial a minha prima Rosemeire Marques Nogueira e minha tia Maria Frederico Nogueira.

Aos meus companheiros de luta das épocas de veterinário de campo no estado de Mato Grosso, pela amizade, ajuda e ensinamentos: Naia Girardi, Alex Bargoni, Felipe Pacheco e Marta Maria.

A todo pessoal da Agropecuária Plantel Cavalos Cuiabá – MT: Nilzeth O.Barbosa, Nilma O.Barbosa, Nevair O.Barbosa e Daniela O.Silva, pelos auxílios, ensinamentos, informações, amizade, momentos de alegria e descontração, imprescindíveis para a realização deste dia.

A todos que de alguma forma contribuíram com a jornada até este ponto, que injustamente não foram aqui citados, e mesmo aqueles que não conheci, que pelos mistérios da vida lutaram por mim no anonimato, a todos vocês muito obrigado.

Aos eqüídeos em especial minha primeira égua (“Égua Pampa”), que de criança fez nascer e crescer em mim a grande paixão e admiração por cavalo, despertando desde muito cedo a vocação para Medicina Veterinária, Hipiatra e Teriogenealogia.

## **BIOGRAFIA**

Igor Frederico Canisso é nascido no dia 12 de maio de 1980, na cidade de Birigui, região Noroeste do Estado de São Paulo, filho dos Paulistas Antonio Canisso Neto e Rosa Ilda Frederico Canisso. Realizou o primeiro e segundo grau nas escolas estaduais Regina Valarine Vieira e Stélio Machado Loureiro, inteiramente na cidade de nascimento. Graduou-se Médico Veterinário pela Universidade Federal do Paraná no ano de 2003, na cidade de Palotina, região oeste do estado do Paraná. No decorrer de sua graduação exerceu atividades de monitoria junto às disciplinas de: Bioquímica Veterinária, Clínica Cirúrgica Veterinária e Teriogenealogia. No ano de sua formatura ao realizar o Provão do Ministério da Cultura e Educação como requisito obrigatório a todos os alunos graduandos de Medicina Veterinária de todas as instituições do país, classificou-se como o melhor aluno formando de Medicina Veterinária da Região Sul, segundo melhor desempenho nacional geral, e primeiro lugar na avaliação discursiva do Brasil. Ele focou seus estudos e é interessado em Teriogenealogia antes mesmo do início de seu curso de Medicina Veterinária.

Em 2004, exerceu o cargo de Professor Substituto do Departamento de Clínica Médica Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Cuiabá, onde ministrou as disciplinas: Semiologia e Radiologia Veterinária, Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária e Clínica Médica de Ruminantes. Ainda durante o referido período foi responsável pelas atividades inerentes à prática veterinária nas áreas: Reprodução, Clínica e Cirurgia, referentes aos setores de Suinocultura, Bovinocultura Leiteira e Núcleo de Criação e Conservação do

Cavalo Pantaneiro, da Fazenda Experimental - FAMEV da Universidade Federal de Mato Grosso.

No ano de 2005, exerceu o cargo de superintendente de pecuária de corte e eqüideocultura do grupo Concremax no estado do Mato Grosso nas regiões de: Brás Norte, Juína, Castanheira, Juruena, Santo Antonio do Leverger e Cuiabá.

Militou na prática veterinária como autônomo nos segmentos de: Ovinocultura de Corte, Bovinocultura de Corte, Bovinocultura Leiteira, Eqüideocultura, nas áreas de Reprodução, Clínica, Cirurgia e Produção, nos períodos correspondentes de 2003 a 2006, com ênfase na espécie eqüina, principalmente nas raças Quarto de Milha, Paint Horse, Puro Sangue Árabe e Pantaneiro.

Em março de 2006 iniciou o programa de Mestrado em Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, com área de concentração em Reprodução Animal e linha de pesquisa Biotecnologia da Reprodução Eqüídea.

Ainda no ano de 2006, exerceu o cargo de coordenador do grupo de estudos sobre eqüídeos da UFV (Eq-Tec). Neste período idealizou os moldes e conteúdo do maior evento de eqüideocultura realizado no Brasil, o primeiro SIMEQ (Simpósio Mineiro de Eqüideocultura). O evento foi realizado nos dias 07, 08 e 09 de junho de 2007, obtendo êxito absoluto.

Às 15 horas do dia 12 de junho de 2008, submeteu-se à defesa de sua dissertação, perante a presente banca e teve sua dissertação aprovada. Imediatamente à defesa do mestrado iniciou seus estudos em Equine Breeding and Stud Farm Management na Aberystwyth University, Grã – Bretanha.

## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS.....</b>	xiii
<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	xiii
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	xiv
<b>RESUMO .....</b>	xvii
<b>ABSTRACT.....</b>	xxi
<b>I - INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	2
<b>CAPÍTULO I: CARACTERÍSTICAS DO COMPORTAMENTO SEXUAL DE JUMENTOS DA RAÇA PÊGA EM COLETA DE SÊMEN COM USO DE ÉGUA EM ESTRO .....</b>	5
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	6
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	10
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	15
<b>3.1. Animais .....</b>	15
<b>3.2. Colheita de sêmen .....</b>	16
<b>3.3. Avaliação do comportamento sexual .....</b>	16
<b>3.4. Avaliação do sêmen .....</b>	17
<b>3.5. Análises estatísticas .....</b>	18
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	19
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	27
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	28
<b>CAPÍTULO II: ALGUNS ASPECTOS BIOMÉTRICOS DO APARELHO GENITAL EXTERNO DE JUMENTOS DOADORES DE SÊMEN DA RAÇA PÊGA.....</b>	33
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	34
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	36
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	38

3.1. Animais.....	38
3.2. Procedimentos.....	39
3.3. Análises estatísticas.....	40
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
5. CONCLUSÃO .....	50
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
<b>CAPÍTULO III: PARÂMETROS SEMINAIS DE JUMENTOS REPRODUTORES DA RAÇA PÊGA .....</b>	<b>53</b>
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	56
2.1. Volume seminal .....	56
2.2. Motilidade e vigor espermático .....	58
2.3. Concentração espermática e número total de espermatozóides .....	60
2.4. Morfologia espermática .....	61
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	65
3.1. Animais .....	65
3.2. Avaliação seminal .....	66
3.3. Análises estatísticas .....	66
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	68
5. CONCLUSÃO .....	77
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
<b>CAPÍTULO IV: CONGELAMENTO E FERTILIDADE DO SÊMEN DE JUMENTOS DA RAÇA PÊGA EM ÉGUAS INSEMINADAS PÓS- OVULAÇÃO .....</b>	<b>83</b>
1. INTRODUÇÃO .....	84
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	89
2.1. Inseminação artificial em eqüídeos .....	89
2.1.1. Sêmen <i>in natura</i> , diluído, resfriado transportado e congelado de eqüídeos .....	93
2.2. Congelamento de sêmen de eqüídeos .....	103
2.2.1. As membranas espermáticas .....	105
2.2.2. Crioprotetores .....	109
2.2.3. Alguns dos principais diluidores de sêmen para o	

<b>congelamento</b> .....	114
<b>2.2.4. Processamento do sêmen</b> .....	119
<b>2.2.5. Procedimentos utilizados para o congelamento de sêmen de jumentos</b> .....	127
<b>2.3. Fertilidade e perda embrionária em eqüídeos</b> .....	137
<b>2.4. Avaliação do sêmen congelado de eqüídeos</b> .....	149
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	154
<b>3.1. Animais</b> .....	154
<b>3.2. Procedimentos</b> .....	155
<b>3.3. Análises estatísticas</b> .....	159
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	160
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	169
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	170

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>CAPÍTULO – IV</b>	<b>Páginas</b>
<b>Esquema 1:</b> Provável mecanismo de ação da proteção da LDL e dos fatores protetores do leite, proposto para sêmen de touros. Adaptado: BERGERON & MANJUNATH (2006)...	118

## LISTA DE QUADROS

<b>CAPÍTULO – IV</b>	<b>Páginas</b>
<b>Quadro 1:</b> Meio Diluidor de MARTIM <i>et al.</i> (1979) .....	156
<b>Quadro 2:</b> Meio Diluidor de Congelamento NAGASE & NIWA, (1964) modificado .....	157
<b>Quadro 3:</b> Solução hiposmótica .....	157

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPITULO I</b>		<b>Páginas</b>
<b>Tabela 1:</b>	Parâmetros físicos do sêmen de jumentos da raça Pêga.....	19
<b>Tabela 2:</b>	Média e desvio padrão de algumas características do comportamento sexual de jumentos em colheita de sêmen com uso de éguas em estro.....	20
<b>CAPITULO II</b>		
<b>Tabela 1:</b>	Valores Médios $\pm$ Desvio Padrão registrados para os principais parâmetros seminais de seis asininos doadores de sêmen da raça Pêga (Agosto/2006 – Fevereiro/2007).....	42
<b>Tabela 2:</b>	Médias e Desvio Padrão (mm) das Biometrias do Testículo Direito e Esquerdo (Comprimento, Altura e Largura) de seis reprodutores asininos adultos e jovens da raça Pêga.....	43
<b>Tabela 3:</b>	Médias e Desvio Padrão (mm) do Índice Testicular e Volume Testicular Esquerdo e Direito, obtidos a partir de mensurações testiculares de seis reprodutores da raça Pêga .....	46
<b>Tabela 4:</b>	Médias e Desvio Padrão (mm) da Largura do terço médio do Funículo Espermático Direito e Esquerdo, de seis reprodutores da raça Pêga .....	48

### CAPITULO III

- Tabela 1:** Valores Médios e Desvios Padrão do Volume Seminal Discriminado nas Frações Gel e Fração Livre de Gel em 180 Coletas de Sêmen de Seis Jumentos reprodutores da Raça Pêga ..... 69
- Tabela 2:** Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MOTT), da motilidade progressiva (MOTP) e do vigor espermático do sêmen fresco in natura em 180 Coletas de sêmen de seis jumentos reprodutores da raça Pêga..... 72
- Tabela 3:** Valores médios e desvios padrão da concentração espermática ( $\times 10^6$  espermatozóides/mL) e do número de espermatozóides totais no ejaculado ( $\times 10^9$  espermatozóides) (valor sem correção de perdas no equipamento de coleta e gel) do sêmen fresco in natura em 180 coletas de sêmen de seis jumentos reprodutores da raça Pêga ..... 74
- Tabela 4:** Valores médios e desvios padrão do percentual de alterações da morfologia espermática no sêmen fresco in natura (discriminada em Defeitos Maiores (DFA), Defeitos Menores (DFE) e Defeitos Espermáticos Totais (DFT)) em 180 coletas de sêmen de seis jumentos reprodutores da Raça Pêga..... 75

### CAPITULO IV

- Tabela 1:** Valores Médios  $\pm$  Desvio Padrão da variação da Motilidade Total, Motilidade Progressiva, Percentual de espermatozóides reagidos no HOST, e do percentual da coloração eosina-nigrosina em diferentes fases do processamento do Sêmen (fresco, resfriado e congelado/descongelado) em dois diluidores seminais no ejaculado de cinco reprodutores asininos da raça Pêga..... 162
- Tabela 2:** Valores Médios e Desvios Padrão da variação da

	morfologia espermática para o sêmen fresco e congelado agrupados de acordo com a classificação de BLOM (1973).....	165
<b>Tabela 3:</b>	Taxas de concepção por ciclo em éguas mestiças e da raça Campolina inseminadas até 6 horas após a ovulação, intra-cornual ipsilateral a ovulação, com sêmen congelado de três jumentos da raça Pêga ( <i>Equus asinus</i> ).....	167

## RESUMO

CANISSO, Igor Frederico, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2008. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-orientadores: José Domingos Guimarães e Ciro Alexandre Alves Torres.

Esta dissertação compreende quatro experimentos. Experimento1: Este estudo descreve algumas características do comportamento sexual de jumentos quando uma égua em estro foi usada para a coleta de sêmen. Foram usados neste estudo seis jumentos (J: 1, 2, 3, 4, 5, 6) da raça Pêga, com idade variando de 3,5 a 16 anos e pesando de 230 a 330 kg. Os animais foram previamente condicionados em um haras comercial de produção de muaras localizado em Guaraciaba, Minas Gerais, Brasil. Para a colheita de sêmen, as éguas tiveram seu estro confirmado com o uso de um garanhão. As coletas foram realizadas com vagina artificial (modelo Botucatu), com água aquecida a 51°C, pelo mesmo médico veterinário e preferencialmente distante de outros asininos. As coletas foram realizadas em intervalos de 48 a 72 horas, totalizando 180 coletas (17 a 40 coletas/reprodutor). Os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen foram avaliados empregando-se um microscópio óptico comum, e a fração gel e a fração livre de gel foram mensuradas e avaliadas separadamente. Os dados de comportamento sexual foram analisados com uso do teste de Kruskal–Wallis ( $P < 0.05$ ), com o Programa de Análises Estatísticas e Genéticas SAEG 9,1 (UFV, 2007). Os parâmetros seminais foram: motilidade total  $84.2 \pm 6.0\%$ , motilidade progressiva  $74.5 \pm 7.1\%$ , vigor  $3.9 \pm 0.5$ , volume sêmen  $47.3 \pm 28.7$  mL e a fração gel de  $71.7 \pm 54.8$  mL. A

fração gelatinosa esteve presente em 90 das 180 coletas, e para J1 39/40 (relação total de coletas), porém J4 e J5 não apresentaram essa fração. As características do comportamento sexual foram: tempo de reação  $18.3 \pm 17.6$  minutos; tempo de monta  $5.1 \pm 3.5$  segundos; time de ejaculação  $25.4 \pm 7.7$  segundos; número de montas sem ereção  $1.1 \pm 1.3$  e número de resposta de Flehmen  $7.4 \pm 5.8$ . Os jumentos adultos (J1, J2, J3) apresentaram menor tempo de reação em relação aos demais e menor número de montas sem ereção. Não foram observadas diferenças significativas entre jumentos no seu comportamento ( $P > 0.05$ ), porém foi observada diferenças entre grupos quanto ao tempo de reação. Todas as coletas de sêmen foram iniciadas com investigação olfativa do genital externo das éguas. O tempo de ejaculação, resposta de Flehmen e montas sem ereção foram similares ao descrito em monta natural usando jumentas. Entretanto, não foi observado comportamento mastigatório exibido por alguns reprodutores na presença de jumentas. O uso de égua em estro para coleta de sêmen pode ser feito eficientemente sem afetar significativamente o comportamento sexual. Experimento 2: Este experimento foi conduzido com seis jumentos reprodutores da raça Pêga, com peso médio de  $272 \pm 34,97$  (231 – 326 kg), sendo subdivididos em adultos (J1, J2 e J3, 16,14 e 15 respectivamente) e jovens (J4, J5 e J6, média 3,5 anos). Os reprodutores apresentavam histórico de fertilidade normal à monta natural, e após realização de exame andrológico foram classificados como aptos à reprodução. Foram realizadas 180 coletas de sêmen, tendo os reprodutores apresentado parâmetros seminais considerados normais para a espécie. De agosto/2006 a fevereiro/2007, cada reprodutor, após a coleta de sêmen, foi submetido a três ou quatro mensurações do aparelho genital externo para comprimento testicular (CT - crânio caudal), altura testicular (AT – dorso ventral), largura testicular (LT – médio lateral) e espessura do funículo (FUN – terço médio). Os dados de biometria testicular foram utilizados para o cálculo do índice testicular (IT) e volume testicular (VT). O IT médio observado foi de 7,45 (5,94 a 9,64) e o VT esquerdo foi de  $155,51 \pm 14,45$  mL, enquanto o direito foi de  $149,34 \pm 14,92$ . A medida de FUND (funículo espermático direito) foi de  $25,35 \pm 3,38$  mm (20,38 a 30,80 mm) e a de FUNE (funículo espermático esquerdo) foi  $24,61 \pm 1,59$  mm (22 a 26 mm). Jumentos, mesmo com IT menor do que o proposto para garanhões; se apresentaram mais eficientes que os últimos, para a produção espermática. O volume espermático associado ao IT

pode ser usado como objeto auxiliar na estimativa da constatação de normalidade para testículos de jumentos. A mensuração *in vivo* do funículo espermático pode ser uma nova variante na utilização do exame andrológico de jumentos. Os dados descritos podem servir de valores de referência e valores práticos quanto à biometria do aparelho genital externo de jumentos.

Experimento 3: Este experimento foi conduzido em um haras comercial de produção de muares. Utilizaram-se seis jumentos reprodutores agrupados em adultos (16, 15, 14 anos) e jovens (3,5, 3,5, 3,5 anos), pesando  $272 \pm 34,97$  (231 – 326 kg), com objetivo de determinar os parâmetros seminais para a raça Pêga. Os animais foram submetidos a exame andrológico, sendo classificados como aptos à reprodução. Realizou-se 180 coletas de sêmen (17 a 40/animal) com o emprego de vagina artificial (modelo Botucatu). Os resultados para os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen foram: volume sêmen:  $47,27 \pm 28,66$  mL; volume da fração gel:  $71,75 \pm 54,80$  mL; motilidade total  $84,22\% \pm 6,04$ ; motilidade progressiva:  $74,47 \pm 7,06\%$ ; vigor espermático:  $3,87 \pm 0,51$ ; concentração espermática:  $254,64 \pm 91,25 \times 10^6/\text{mL}$ ; espermatozoides totais:  $10,3 \pm 4525,26 \times 10^9$ ; defeitos espermáticos maiores e menores:  $7,97 \pm 3,02\%$  e  $6,80 \pm 1,59\%$ , respectivamente. Foram observados efeitos de classe sobre os parâmetros seminais, sendo que a presença da fração gelatinosa foi detectável em 30% das coletas (54/180 coletas) e o volume gel foi influenciado individualmente. Estes dados podem servir de referências para novos estudos. Contudo, levantamentos de campo e novos estudos devem ser conduzidos envolvendo maior número de animais para que sejam construídos valores de referência para a espécie.

Experimento 4: Este delineamento compreende a avaliação de uma metodologia de congelamento do sêmen de jumentos, com o emprego de uma curva de resfriamento prévio, e com uso de dois diluidores de congelamento: meio diluidor de Martim *et al.* (1979) e meio diluidor de Nagase & Niwa, (1964) modificado. Foram realizadas vinte e cinco coletas de sêmen com uso de vagina artificial de cinco reprodutores da raça Pêga, pesando em média  $272 \pm 34,97$  e com idades variando de 3,5 -17 anos. Foram realizadas avaliações do sêmen fresco, resfriado e congelado nas diferentes fases da criopreservação do sêmen analisando a morfologia espermática, integridade de membrana por coloração de eosina nigrosina e teste hiposmótico, além da avaliação subjetiva dos parâmetros físicos. Em adição, foi realizado teste de fertilidade com sêmen de três reprodutores em 51 éguas (60 ciclos), sendo

30ciclos/diluidor, com o objetivo de estudar alguns aspectos envolvidos na criopreservação do sêmen de jumentos da raça Pêga. As taxas de gestação aos 13, 25 e 35 dias foram: 53,33%, 43,66% e 16,6% Nagase & Niwa (1964) modificado e 50%, 46,66% e 10% Martim *et al.* (1979). O teste hiposmótico se mostrou adequado para indicar a população de células que sobrevivem ao congelamento, enquanto a coloração de eosina nigrosina se mostrou inapropriada na presente metodologia. As taxas de gestação foram altas aos 13 e 25 dias pós-inseminação, porém com elevadas taxas de perdas embrionárias. Os diluidores tradicionalmente empregados para sêmen de touros e garanhões podem ser empregados para a criopreservação do sêmen de jumentos.

## ABSTRACT

CANISSO, Igor Frederico, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa,, June, 2008.  
**Sexual behavior, seminal parameters and fertility of the semen freeze from donkeys (*Equus asinus*) Pêga breed.** Advisor: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-Advisors: José Domingos Guimarães and Ciro Alexandre Alves Torres.

This dissertation is compounded for four trials. Experiment 1: This paper describes field results of some sexual behavior characteristics shown by donkeys when using an estrous mare for semen collection. Six donkeys (J: 1, 2, 3, 4, 5, 6) (Pêga breed), 3.5–16 year old and body weight from 230 to 330 kg. The jacks were conditioned to breed mares in a stud farm of mule production in Guacariaba, Minas Gerais, Brazil. For the semen collections, mares' estrous signs were confirmed by a teaser stallion. The collections were done with an artificial vagina (Botucatu model), (water temperature 51 °C) by the same veterinarian and far from the other donkeys. The collection intervals were from 48 to 72 h totaling 180 collections (17 to 40 semen collection/breeder). The physical and morphological seminal parameters and were evaluated using a light microscope; gel fraction and semen volume were measured separated. Behavior data were analyzed by Kruskal–Wallis test  $P < 0.05$  by Statistical Analysis Systems-SAEG 9.1 (2007). The seminal parameters were: total motility  $84.2 \pm 6.0\%$ , progressive motility  $74.5 \pm 7.1\%$ , vigor  $3.9 \pm 0.5$ , semen volume  $47.3 \pm 28.7$  ml and gel fraction  $71.7 \pm 54.8$  ml. Gel fraction was present in 90/180 collections, in J1 39/40, but never in J4 and J5. The characteristics of sexual behavior were: reaction time  $18.3 \pm 17.6$  min, time to the mount  $5.1 \pm 3.5$  s, time to ejaculation  $25.4 \pm 7.7$  s, number of mounts without erection

1.1 ± 1.3 and number of Flehmen responses 7.4 ± 5.8. The older jacks group was the shorter was the reaction time and less mounts without erection. None of the sexual behavior characteristics was significantly different among jacks ( $P > 0.05$ ). All the collections started with sniffing of external genitalia. The ejaculation time, Flehmen response, and mounting without erection were similar to that described in natural breeding of jennies. However, no clapping mouth response was observed in the donkeys, neither difference in the mount time between jacks. In conclusion the used estrous mare was an efficient method of semen collection in donkeys neither significant effects on the sexual behavior.

Experiment 2: The present study was performed with six jacks of the Pêga breed, weight from 231 to 326 kg ( $272 \pm 34$ , 97). The breeders were divided in into the adult group (J1, J2 e J3, mean 15 years old) and a young group (J4, J5 e J6, mean 3,5 years old). The jacks presented records of normal rates of fertility at natural mating. Afterwards breeding soundness evaluation was performed and all animals ensure they were of capable for reproduction. Hundred eighty semen collections were performed, and the jacks presented normal seminal parameters for the specie. From August/2006 to February/2007, after semen collection each jack was submitted to three or four measurements of the extern genital tract (both right and left side) for: testis length (TL – cranio caudal); testis height (TH – dorsal ventral); testis width (TW lateral-lateral) and thickness of spermatic funiculum (FUN – third part). The biometric data from testis biometric were used for calculation of testis indices (TI) and testis volume (TV). The average of TI observed was 7,45 (5,94 a 9,64) and TV  $155,51 \pm 14,45$   $149,34 \pm 14,92$  respectively left and right. The mean of FUN were for the right  $25,35 \pm 3,38$  mm (20,38 a 30,80 mm) and  $24,61 \pm 1,59$  mm (22 a 26 mm) for the left side. The jacks presented lesser TI than those proposed for stallions, but the asinine were more efficient than average related to stallion for sperm production. The testis volume associated with IT can be used in addition to the evaluation of the normality of the jacks breeder's testis. The measurement *in vivo* of spermatic funiculum can be used with other new component for the breeding soundness evaluation of jacks. The biometric values of the genital extern tract of this study it can support routine breeding evaluation and be applied to news studies.

Experiment 3: This study was development in stud farm for mule and donkey production aiming to establish normal values of seminal parameters of jacks Pêga breed. Six jacks

are used and arrangement in two groups adults (16, 15, 14 years old) an young (3.5, 3.5, 3.5 years old) weighting  $272 \pm 34,97$  kg (231 – 326 kg). The animals were submitted to breeding soundness evaluation and all were approved for reproduction, beside that all animals present record of normal fertility. Were performed 180 semen collections (17 to 40/ jacks) by use artificial vagina Botucatu model. The values registered for physical seminal parameters and sperm morphology were: semen volume  $47,27 \pm 28,66$  mL, gel fraction volume  $71,75 \pm 54,80$  mL, total motility  $84,22\% \pm 6,04$ , progressive motility  $74,47 \pm 7,06\%$ , spermatic vigor  $3,87 \pm 0,51$ , sperm concentration  $254,64 \pm 91,25 \times 10^6/\text{mL}$  e, total sperm  $10,3 \pm 4525, 26 \times 10^9$ , major spermatic defects and minor defects were  $7,97 \pm 3,02 \%$  e  $6,80 \pm 1,59\%$  in order. Were observed effect of class about seminal parameters, despite of the presence gel fraction was measurable in 30% of semen collections (54/180 collections) and the volume of gel fraction were influenced individually. This data may be used as references values for new studies. However, fields records and new studies involving greater number of breeders it should be done to establish real values for the specie. Experiment 4: This study comprehend the evaluation of the semen freezing methodology for jacks, with the application f the curve cooling pre freezing, and the use of two semen dilutors: Martim *et al.* (1979) and Nagase & Niwa (1964) modified. Twenty five semen collection were performed of five jacks Pêga breed; weighting  $272 \pm 34,97$  kg and with age vary from 3,5 years to 17 years. Evaluations were performed in raw semen, cooled, and freezing semen in different phases of semen cryopreservation of the jacks Pêga breed. The analyses were: sperm morphology, membrane integrity by test stress hyposmotic and supravital stain and also physical seminal parameters. In addition, was realized fertility test in 51 mares (60 estrous cycles), 30 estrous cycles/dilutor with the semen from three breeders. The pregnancy rates were 13, 25 and 35 days were: 53,33%, 43,66% e 16,6% for Nagase & Niwa (1964) modified and 50%, 46,66% e 10% Martim *et al.* (1979).The hiposmotic test showed suitable test for indication the sperm cells survivors to the cryopreservation procedures, while the supravital stain was unsuitable for the present methodology. The pregnancy rates were elevated between days 13<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup>, but slight rates of embryo loss. The traditionally dilutors used for semen bulls and stallions can be used for jacks semen cryopreservation.

## I - INTRODUÇÃO GERAL

A indústria eqüídea mundial exerce importante papel como fonte geradora de renda e empregos. A eqüídeocultura brasileira ocupa posição de destaque internacional não só pelo expressivo número de animais e por ter a segunda maior população de eqüídeos do mundo, como também pela excelência de seu plantel (ALVARENGA, 2002).

Recente estudo estimativo sobre a indústria eqüestre no Brasil demonstrou que o rebanho efetivo é cerca de 7,5 milhões de eqüinos e 1,2 milhões de muares e jumentos. Este segmento agropecuário é responsável pela geração de 641.220 mil empregos diretos e 3,2 milhões de empregos indiretos, com uma movimentação financeira estimada para o ano de 2006 de 7.5 bilhões de reais (CNA, 2006).

Minas Gerais se destaca entre os demais estados brasileiros pela tradição na criação de eqüídeos e pelo maior número efetivo de eqüídeos do Brasil, com cerca de um milhão de animais no seu plantel. A topografia acidentada de seu território foi palco e cenário do surgimento e desenvolvimento das principais raças de eqüídeos do Brasil. Por suas características peculiares de relevo, propiciou condições demandadoras e geradoras ao aparecimento de animais tipo sela, com características muito particulares, tais como, boa comodidade à montaria, e ao mesmo tempo, mansidão, para poder realizar de pequenos a grandes deslocamentos por entre as montanhas e morros de seu território.

Desta maneira, com esses preceitos, o estado foi o berço das raças eqüídeas nacionais: Mangalarga Marchador, Campolina, Piquira, Pampa e Jumento Pêga, sendo que todas estas raças apresentam pontos em comum como o andamento natural marchado, aliado à muita comodidade (TORRES & JARDIM, 1992).

O jumento Pêga é uma raça asinina genuinamente nacional, mais especificamente mineira, que apresenta cerca de 200 anos de evolução e seleção. Sua origem ocorreu na região dos campos das Vertentes, estado de Minas Gerais, na fazenda Curtume, no município de Entre Rios, com a criação e seleção do padre Manoel Maria Torquato de Almeida, (que iniciou seu trabalho em 1810), com cruzamentos entre as raças asininas: italiana e egípcia. Em 1847, o padre transferiu sua criação para o Coronel Eduardo José de Resende, fazenda Engenho Grande dos Cataguases, município de Lagoa Dourada (NUNES, 2007).

O atual cenário da eqüideocultura nacional tem-se caracterizado por uma revalorização dos eqüídeos, marcado pelo expressivo interesse por grande parte da população por eqüinos, asininos e muares. Não sendo diferente com a raça Pêga, já que seus híbridos estão tendo recordes de preços em leilões, além do aparecimento de novos criadores, expressiva participação em concursos de marcha e exposições de agropecuária em diversos estados do Brasil, não apenas em Minas Gerais, mas também, Espírito Santo, Goiás, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, e outros estados da federação.

Oficialmente, a Associação de Criadores de Jumento Pêga conta com cerca 1700 criadores filiados e cerca de 16000 animais registrados (NUNES, 2007).

Muitos resultados reportados na literatura evidenciam diferenças entre as espécies eqüina e asinina quanto aos protocolos de reprodução (TRIMECHE *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006; VIDAMENT *et al.*, 2008). A literatura é escassa nos aspectos que tangem a biologia reprodutiva de asininos (MORAIS, 1990; COSTA, 1991, GASTAL, 1991, HENRY *et al.*, 1998), assim como em biotecnologia reprodutiva (OLIVEIRA, 2005; VIDAMENT *et al.*, 2008).

Na presença de tais fatos, o atual cenário demanda que se conheça mais os aspectos da biologia reprodutiva do jumento e que se possam dominar procedimentos como a biotecnologia reprodutiva de asininos e suas inter-relações com a espécie eqüina em possíveis acasalamentos. Além de avaliar por meio de delineamentos experimentais a utilização de protocolos utilizados para outras espécies, principalmente a eqüina, e se pode ser realmente extrapolada para os asininos. Novas metodologias devem ser desenvolvidas para que sejam atendidas eficientemente as crescentes demandas na espécie.

Os objetivos deste estudo foram avaliar a biometria testicular; parâmetros espermáticos; comportamento sexual a coleta de sêmen com vagina artificial, por coletas freqüentes, utilizando éguas em estro como manequim; congelamento de sêmen empregando uma curva de resfriamento até 5°C com taxa de média de - 0,5°C/min, e dois diluidores à base de lactose-gema-orvus-es-paste e glicerol. Optou-se por este modelo de apresentação de corpo da dissertação na forma de capítulos.

## **CAPÍTULO I**

### **CARACTERÍSTICAS DO COMPORTAMENTO SEXUAL DE JUMENTOS DA RAÇA PÊGA EM COLETA DE SÊMEN COM USO DE ÉGUA EM ESTRO**

## 1. INTRODUÇÃO

Asininos são criados em vários países do mundo, sendo que em alguns países, como o Brasil, Cuba, Estados Unidos, México e Argentina são particularmente criados para servirem como doadores de sêmen para a produção de muares. Muares são animais bastante valorizados em áreas rurais, pois são animais dotados de grande resistência e força física, ideais para atividades como a de lida com gado de corte em grandes fazendas no Brasil central e também na agricultura, como animal de transporte de cargas e tração.

O jumento Pêga é uma raça asinina brasileira de grande porte, particularmente valorizada para a produção de muares em diversos estados da federação. Essa raça vem sendo selecionada e melhorada há cerca de duzentos anos. Tradicionalmente criadores obtêm melhores preços quando o reprodutor é condicionado à cobertura de éguas.

Entretanto, a cobertura de éguas para o jumento não é um fato natural, baseado nas diferenças de comportamento entre as espécies (CLAYTON *et al.*, 1980; HENRY *et al.*, 1987; GINTHER, 1992; TAYLOR & MATHEWS, 1998; McDONNELL, 2000); assim, para a cobertura de éguas o jumento deve ser condicionado (NISHIKAWA, 1959; KREUCHAUF, 1984; LODI *et al.*, 1995).

A fêmea asinina desempenha um papel mais ativo na monta natural e no cortejo se comparado com a égua (CLAYTON *et al.*, 1980; HENRY *et al.*, 1991; McDONNELL, 2000). Como manifestação normal do comportamento sexual jumentas em estro procuram o jumento, apresentam vocalização, demonstram

intenso comportamento sexual (heterossexual e homossexual; como montas em fêmeas e no macho) e se organizam em um grupo sexualmente ativo semelhante ao descrito para vacas em estros (HENRY *et al.*, 1991; HENRY *et al.*, 1998; MCDONNELL, 1998).

Desta forma, esta diferença de comportamento sexual menos intenso de éguas e as diferenças no comportamento sexual normal pode explicar o menor interesse demonstrado por jumentos para com as éguas e de éguas para com os jumentos (LODI *et al.*, 1995; MCDONNELL, 1998).

Adicionalmente, asininos e eqüinos se organizam diferentemente no sistema sociais, em particular asininos domésticos (HENRY *et al.*, 1991), além de algumas espécies selvagens são reprodutores territoriais (KLINGEL, 1998). Temos também asininos domésticos que demonstram o mesmo comportamento com éguas em sistema de monta natural livre em pastagens (LODI *et al.*, 1995; HENRY *et al.*, 1998), enquanto garanhões são machos formadores de harém e não territorialista (MCDONNELL, 1986; FREITAS *et al.*, 2006).

A biologia reprodutiva de asininos tem sido alvo de vários estudos incluindo o comportamento sexual, fisiologia do ciclo estral, parâmetros seminais e comportamento maternal (CLAYTON *et al.*, 1980; GINTHER *et al.*, 1983; HENRY *et al.*, 1987; MORAIS *et al.*, 1993; COSTA, 1991; HENRY *et al.*, 1991; GASTAL *et al.*, 1997; HENRY *et al.*, 1998; MCDONNELL, 1998).

Estudos em comportamento sexual de jumentos têm sido focados em cortejo, monta natural em pastagens, colheita de sêmen e estratégias de monta (COSTA, 1991; MORAIS *et al.*, 1993; HENRY *et al.*, 1991; GASTAL *et al.*, 1997; HENRY *et al.*, 1998; MCDONNELL, 1998). Poucos estudos têm sido conduzidos com colheita de sêmen de jumentos (HENRY *et al.*, 1987; MORAIS *et al.*, 1993; GASTAL *et al.*, 1997).

Sabe-se que a fêmea exerce importante papel na estimulação masculina durante a interação sexual (HENRY *et al.*, 1998), tanto para garanhões quanto para jumentos em coleta de sêmen (MORAIS *et al.*, 1993; NOUE *et al.*, 2001) e para o uso de éguas jumentos devem ser condicionados (MORAIS *et al.*, 1993; HENRY *et al.*, 1998).

A colheita de sêmen em garanhões submetidos a condições de manejo intensivo em haras ou centrais de reprodução (NOUE *et al.*, 2001), bem como para jumentos não é um fato natural, mas sim algo artificial e muitas vezes anti-natural imposto pelo homem (MORAIS *et al.*, 1993), principalmente se comparado com o comportamento sexual natural.

Tradicionalmente, jumentas são usadas para a coleta de sêmen, (GASTAL *et al.*, 1996; 1997) embora relatos sugiram o uso de macho castrado ou éguas como manequim possam ser usadas (NISHIKAWA, 1959; KREUCHAUF, 1984; MORAIS *et al.*, 1994).

Poucos estudos têm sido conduzidos empregando éguas e jumentas (COSTA, 1990; MORAIS *et al.*, 1993), porém, nenhum estudo se preocupa em utilizar somente éguas para a coleta de sêmen.

Historicamente, os jumentos são considerados reprodutores que apresentam longos tempos de reação, difíceis de serem manejados em condições intensivas (MORAIS *et al.*, 1993; GASTAL *et al.*, 1996; HENRY *et al.*, 1998; TAYLOR & MATHEWS, 1998; MCDONNELL, 1998, 2000; TIBARY, 2007).

Diversos estudos e práticas de manejo têm sido sugeridos para contornar tais dificuldades de manejo. Uma das premissas é reconhecer as diferenças de comportamento sexual entre garanhões e jumentos, ou seja, os mesmos não podem ser manejados da mesma maneira.

Uma das estratégias empregadas consiste em manter, antes da coleta, o jumento distante da égua ou jumenta (permitir monta sem ereção, com a permissão de rufiação primeiro; manutenção de dois piquetes adjacentes, sendo que um piquete se mantém um grupo de jumentas e em outro duas ou mais jumentas em estro, onde as mesmas se organizarão em um grupo sexualmente ativo o que estimulará a manifestação do comportamento sexual do jumento).

Como também, após o desmame criar o jumento, futuro-reprodutor, com uma potra e mantê-lo distante de jumentas, não permitindo a cobertura de jumentas no início da vida reprodutiva, podendo o mesmo ser empregado na produção de muares por monta natural (GASTAL *et al.*, 1996; HENRY *et al.*, 1998; MCDONNELL, 1998; 2000).

No entanto, em diversos haras de produção de muares, não se encontram disponíveis jumentas para coleta de sêmen, assim, nestes locais, éguas devem ser utilizadas para a coleta de sêmen.

Desta forma, não se encontra na literatura estudos detalhados envolvendo éguas exclusivamente para a colheita de sêmen nesta específica situação.

Portanto, se tem como objetivos neste estudo: a) descrever as características do comportamento sexual demonstrado por jumentos durante a colheita de sêmen quando uma égua em estro é usada na coleta de sêmen; b) avaliação dos parâmetros seminais para colheitas sobre essas condições; c) avaliar se é possível o uso de éguas para a colheita de sêmen em jumentos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O sistema de acasalamento de uma população é definido pelo tipo de organização social que ela exhibe, sendo que os eqüídeos domésticos e selvagens apresentam dois tipos bem caracterizados, o sistema territorial e o não territorial (LODI, 1993).

O jumento doméstico (*Equus asinus*) é um macho que permanece em uma área restrita do ambiente que ele definiu como território, uma vez que somente deixará esta área em caso de falta de água e alimento (HENRY *et al.*, 1998).

O local escolhido geralmente apresenta sombra, além de boa disponibilidade de água e pastagens. Deste modo, as jumentas, que são animais errantes (migratórios), são atraídas para este território (HENRY *et al.*, 1991; 1998; MCDONNELL, 1998). As jumentas em estro que estejam de passagem pelo território serão cortejadas e cobertas neste local pelo jumento, contudo, sem serem arrebanhadas e assim podendo permanecer neste local durante todo o período de estro (HENRY *et al.*, 1991; LODI, 1993; MCDONNELL, 1998).

O asinino defende seu território ferozmente contra invasores, principalmente quando se trata de outros jumentos, e geralmente não permite que outros machos se aproximem. Contudo, em algumas situações, um jumento permite a entrada de outro jumento em seu território e este, por sua vez, se comportará como subordinado sendo que em algumas ocasiões poderá até efetuar coberturas após o macho dominante (HENRY *et al.*, 1998;

McDONNELL,1998). Esse jumento vassalo ainda pode auxiliar na defesa do território contra a invasão de outros machos (MCDONNELL, 1998).

O cortejo sexual de jumentos com fêmeas da mesma espécie inicia-se com uma intensa interação macho-fêmea. Ocorre vocalização, olfação nasolabial e de parte do corpo, tendo maior frequência na região perineal, mordidas na região do pescoço, joelhos e vulva, e normalmente cursando com manifestação da resposta de Flehmen que culmina com a monta sem ereção com duração de 10 a 30 segundos (HENRY *et al.*, 1991; HENRY, 1991).

Outras observações freqüentes são: atos de retirada em fuga rápida e lenta, seguido de pastejo, em que o jumento permanece à distância com pastoreio leve e com aparente desinteresse pela fêmea, vocalização, ereção parcial do pênis, movimentos masturbatórios, para somente, então, entrar e sustentar ereção e assim efetuar a monta (HENRY *et al.*, 1998; MCDONNELL, 1998).

Para a realização da cobertura de éguas o jumento deve ser condicionado (NISHIKWA, 1959; KREUCHAUF, 1984). Um método utilizado para esta adaptação é a criação do jumento selecionado como futuro-reprodutor juntamente com uma potra e distante de jumentas após o desmame, como já mencionado.

Esta prática, aliada a cobertura de éguas, no início da vida reprodutiva, permite o condicionamento do jumento e quando o mesmo estiver maduro o suficiente e acostumado a cobrir éguas, pode ser recondicionado para a cobertura de jumentas, encerrando sua vida reprodutiva em manejo de monta natural com fêmeas das duas espécies (HENRY *et al.*, 1998; TAYLOR & MATTEWS, 1998).

Este fato se deve a algumas diferenças básicas entre jumentos e garanhões, em que o primeiro é classificado como macho territorialista e não formador de harém; enquanto o segundo como não territorialista e formador de haréns (HENRY *et al.*, 1991; MCDONNELL, 1986; 2000). Deste modo, o jumento não forma haréns e, preferencialmente, realiza acasalamento em jumentas (HENRY *et al.*, 1991; MCDONNELL, 1998) e éguas (LODI *et al.*, 1995) dentro dos limites de seu território.

BEACH (1976) classificou e agrupou as respostas comportamentais das fêmeas domésticas em estro em três categorias: atratividade, proceptividade e receptividade. De acordo com HENRY *et al.* (1998) a fêmea desempenha papel relevante no comportamento sexual masculino e são notórias as diferenças do comportamento estral de éguas e jumentas (GINTHER, 1992; CROWELL-DAVIS, 2007). Estas últimas exibem uma expressão facial característica com constantes movimentos mastigatórios, abaixamento e extensão do pescoço e orelhas voltadas para trás e caídas (CLAYTON *et al.*, 1981; HENRY *et al.*, 1987), o que provavelmente seja mais atrativo para o jumento (HENRY *et al.*, 1991; MCDONNELL, 1998).

Éguas em estro são atrativas para os jumentos, mas não tanto quanto jumentas em estro. Além disso, são menos proceptivas e receptivas aos jumentos conforme demonstrado por LODI *et al.* (1995). Talvez esses sejam os pontos principais envolvendo o cruzamento das duas espécies que explicam os fenômenos comportamentais (HENRY *et al.*, 1998; MCDONNELL, 1998).

LODI *et al.* (1995) avaliando a resposta comportamental de cortejo e monta de jumentos em éguas sob condições de pastagens, observaram comportamento semelhante do jumento em relação a éguas, ao previamente descrito em jumentas por HENRY *et al.* (1991), porém com intervalos e manifestações de cortejo mais curtos e discretos com a fêmea de espécie diferente.

Existem grandes diferenças na manifestação de receptividade sexual de éguas e jumentas e talvez esta seja a responsável por alguns insucessos obtidos no acasalamento e coletas de sêmen com éguas como manequim (MORAIS *et al.*, 1993, TIBARY, 2007), destacando os longos períodos de reação observados quando uma égua é utilizada como manequim (MCDONNELL, 1998; TAYLOR & MATHWES, 1998; TIBARY, 2007).

Em sistema de monta natural, sob condições de pastagens entre as espécies LODI *et al.* (1995) demonstraram que o jumento foi capaz de identificar éguas em estro nesta condição. No entanto, somente 31 a 41% das éguas em estro confirmadas com rufiação com um garanhão exibiram sinais comportamentais de estro ao jumento e, de acordo com a classificação de BEACH (1976), as éguas em estro se mostraram menos proceptivas e atrativas

para o jumento, pois os episódios de cortejo foram mais curtos e menos intensos.

Por estas razões, o melhor manequim que pode ser utilizado para a coleta de sêmen de jumentos seria a jumenta em estro, porém éguas e machos castrados também podem ser utilizados para essa finalidade (KREUCHAUF, 1984; MORAIS *et al.*, 1993).

Diversos estudos foram desenvolvidos envolvendo a coleta de sêmen em jumentos (NISHIKAWA, 1959; HENRY *et al.*, 1987; MORAIS, 1990; COSTA, 1991; GASTAL, 1991; GERBERS, 1995). Contudo, na maioria destas pesquisas se tem utilizado jumentas como manequim de coleta ou usado éguas e jumentas sem distinção entre as fêmeas nas avaliações. Poucos foram os estudos sobre coleta de sêmen em jumentos utilizando apenas éguas, apesar de existirem inúmeras citações na literatura do uso de éguas, machos castrados e pôneis, porém sempre sem a devida distinção (NISHIKAWA, 1959; KREUCHAUF, 1984, MORAIS, 1990; GASTAL, 1991).

A coleta de sêmen de jumentos com uso de éguas se faz necessária em muitos haras nas condições nacionais, uma vez que apenas fêmeas da espécie eqüina estão disponíveis em algumas situações. O tempo de reação é dado pelo período da exposição inicial do jumento a uma fêmea em estro (SILVA FILHO *et al.*, 1999). Sendo observado em jumentos de várias raças, independente do tipo de manequim empregado, longos tempos de reação quando comparado com o garanhão e, segundo os autores, variam em média de 10 a 50 minutos (NISHIKAWA, 1959; KREUCHAUF, 1984; HENRY *et al.*, 1987; MORAIS, 1990, GASTAL, 1991, COSTA, 1991; GERBERS, 1995; TIBARY, 2007).

HENRY (1991) trabalhando com dois jumentos da raça Nordestina, sob condições de monta controlada em jumentas, registrou o tempo médio de reação de  $11,6 \pm 8,9$  e  $20,3 \pm 15,4$  e de  $11,3 \pm 9,3$  a  $21,1 \pm 22,9$  minutos para o primeiro e segundo ejaculados dos dois reprodutores, respectivamente. Enquanto que em condições de monta a campo, trabalhando com os mesmos dois animais, os tempos de reação foram  $39,9 \pm 30,4$  e  $25,9 \pm 17,8$  minutos, respectivamente.

Quanto ao tempo de ejaculação, NISHIKAWA (1959) registrou valores de 6 a 25 segundos para asininos. Não há na literatura muitos estudos em asininos envolvendo a avaliação do tempo de monta, como em garanhões (SILVA FILHO *et al.*, 1999).

A importância do tempo de monta em garanhões foi demonstrada pela alta correlação com volume de gel no ejaculado, que é uma característica altamente indesejável na manipulação do ejaculado (DAVIES-MOREL, 1999). Na maioria dos estudos, os autores utilizaram um tempo, denominado de tempo de serviço, como sendo o tempo decorrido da exposição do jumento ao manequim até a completa ejaculação (GASTAL, *et al.*, 1996).

### 3. MATERIAL E METÓDOS

#### 3.1. Animais

O comportamento sexual de seis jumentos da raça Pêga foi estudado de agosto de 2006 a fevereiro de 2007. O estudo foi conduzido em um haras privado de produção comercial de muares e asininos localizado no município de Guaraciaba, Minas Gerais, Brasil (20°45'20" latitude sul e 42°52'40" leste).

No início do estudo, os jumentos apresentavam idade média de 3,5 a 16 anos, pesando de 230 a 330 Kg. Os reprodutores foram alocados em dois grupos: adultos (J1: 16 anos, J2: 15 anos, J3: 14 anos) e jovens (J4, J5 e J6, todos animais no grupo apresentavam idade média de 3,5 anos). Todos os reprodutores apresentavam histórico de normal desempenho à monta natural em éguas por uma ou mais estações reprodutivas.

Antes de se começar a pesquisa, os jumentos foram submetidos a um completo exame andrológico de acordo com as recomendações de KENNEY *et al.* (1983) para o exame andrológico de garanhões, e todos foram considerados aprovados para uso na reprodução.

Os animais, anteriormente, foram adaptados aos procedimentos de coleta de sêmen, e tiveram suas reservas espermáticas extra-gonadais esgotadas e estabilizadas através de coletas de sêmen ou monta natural em éguas diariamente por sete dias consecutivos.

Os jumentos foram mantidos sobre iluminação natural em baias de alvenaria, individualmente, com livre acesso a água, sal mineralizado e feno (*Cynodon dactylon* cv Tifyon) *ad libitum*. Em adição foi oferecido 20 kg de

capim fresco picado (*Pennisetum purpureum* cv Elefante) dividido em dois tratos diários (9:00/15:00 horas). Os jumentos foram soltos em piquete gramado ou pista de areia por 2 a 3 horas/dia. Durante as fases pré-experimental e experimental os jumentos mantiveram contato auditivo e visual com éguas, estas mantidas 200 a 500 metros, não tendo contato físico.

### **3.2. Colheita de sêmen**

Para a colheita de sêmen foram usadas éguas em estro confirmadas com uso de um garanhão, e somente éguas com boa aceitação ao jumento foram empregadas como manequim. Como caracterização de boa aceitação, a égua não deveria rejeitar as investidas do jumento na rufiação ou montas, não dar, ou tentar dar coices bem como se mexer incessantemente. Caso uma égua apresentasse algum destes sinais, seria substituída por outra com características mais favoráveis ao procedimento.

As colheitas de sêmen foram feitas distantes de outros jumentos, com uso de vagina artificial (modelo Botucatu), com água aquecida a 51°C, a intervalos de 48 a 72 horas, totalizando 180 coletas (17 a 40 coletas por jumento).

As coletas foram realizadas sempre por um mesmo médico veterinário, de acordo com a demanda de sêmen dos jumentos no haras. Durante o estudo não foram permitidas atitudes de fugas pelos jumentos apesar de ser uma característica normal do comportamento sexual desta espécie (HENRY *et al.*, 1991), uma vez que em condições intensivas poderia dificultar o manejo e provocar acidentes.

### **3.3. Avaliação do comportamento sexual**

Para avaliação dos parâmetros de comportamento, dois assistentes foram posicionados distantes cerca de três metros da égua, sendo um do lado direito tomando nota das respostas comportamentais do jumento e outro do lado esquerdo, para o controle do cabresto e afrouxamento da corda quando o jumento em coleta demonstrou interesse em montar na égua (com/sem ereção) para a realização da colheita do sêmen.

Os seguintes parâmetros foram tabulados: i) Resposta de Flehmen (FLH): número de resposta de Flehmen manifestado na presença de uma égua em estro em cada episódio de coleta; ii) Monta sem ereção (MSE): número de montas sem ereção (sem ereção total) - durante a colheita de sêmen quando o jumento demonstrou intenção de montar na égua o cabresto foi liberado pelo assistente do lado esquerdo, e a seguir a monta foi permitida; iii) Tempo de Reação (TR): tempo em minutos da exposição inicial do jumento a égua até a completa ereção (seguida por monta ejaculatória); iv) Tempo de monta (MT): tempo em segundos entre a ereção completa e o início da coleta com a introdução do pênis na vagina artificial, caso o jumento não saltasse sobre a égua após atingir a ereção total, este tempo foi adicionado ao tempo de reação e sendo assim contabilizado; v) Tempo de ejaculação: tempo em segundos da introdução do pênis na vagina artificial até o final da coleta com a retirada da vagina; vi) Observações clínicas gerais: observações do cortejo e atitudes gerais são descritas.

O tempo máximo permitido para cada jumento realizar um serviço completo foi de 90 minutos. Caso o jumento não tenha realizado o serviço completo neste período, o mesmo foi retornado para a sua respectiva baia, e a seguir nova tentativa foi realizada uma hora depois e se nessa nova tentativa não fosse obtido sucesso, nova tentativa foi realizada no dia seguinte.

### **3.4. Avaliação do sêmen**

Imediatamente após a colheita do sêmen, o mesmo foi filtrado e a fração gelatinosa removida e mensurada. A seguir, os parâmetros físicos seminais foram avaliados com uso de um microscópio óptico comum com estágio aquecido a 37°C.

Os parâmetros seminais foram avaliados de acordo com KENNEY *et al.* (1983), que são: motilidade total (0 -100%); motilidade progressiva (0 -100%); vigor espermático (1 -5); concentração espermática ( $\times 10^6$  espermatozoides/mL) e espermatozoides totais ejaculados ( $\times 10^9$ ). Os parâmetros de motilidade e vigor foram estimados visualmente, em sete campos contados.

Uma amostra (10  $\mu$ l) de cada coleta de sêmen foi adicionado a 1 mL de solução de formol salino tamponada de HANCOCK (1957) aquecida a 37°C,

para avaliação da morfologia espermática. Posteriormente, realizou-se a avaliação da morfologia espermática em aumento de 1000 vezes sobre imersão, onde 200 células foram contadas e os defeitos espermáticos arranjados em defeitos maiores e menores de acordo com BLOM (1973). A concentração espermática foi avaliada por método hematocimétrico com uso da câmera de Neubauer.

### **3.5. Análises Estatísticas**

Os resultados das características de comportamento sexual e parâmetros seminais são apresentados em média  $\pm$  desvio padrão, para jumentos adultos e para jovens, e média geral.

Para as análises estatísticas empregou-se o programa estatístico SAEG 9,1 (Sistema de Análises Genéticas e Estatística – UFV) (SAEG–UFV, 2007). Foram efetuados cálculos da média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação dos resultados obtidos para cada variável avaliada, por reprodutor e para o grupo experimental. Correlações simples e de Pearson foram realizadas entre todas as variáveis estudadas. Para as variáveis qualitativas, efetuou-se os testes de Lillinfors e Cochran e Bartlett para verificar a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias dos grupos, respectivamente.

Aqueles dados que não atenderam a premissa da ANOVA, foram submetidos à análise não paramétrica e as médias comparadas pelos testes de Kruskal Wallis ou Wilcoxon com probabilidade de erro de 5%. As variáveis que atenderam a pelo menos uma premissa, foram submetidos à análise de variância por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios e os desvios padrão para algumas características do comportamento sexual da coleta de sêmen de seis jumentos estão representados, nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1:** Parâmetros físicos do sêmen de jumentos da raça Pêga

Parâmetros	Valores
Volume sêmen (mL)	47,27ml $\pm$ 28,66
Volume gel (mL)	71,75ml $\pm$ 54,80
Motilidade total (%)	84,22% $\pm$ 6,04
Motilidade progressiva (%)	74,47% $\pm$ 7,06
Vigor espermático (1-5)	3,87 $\pm$ 0,51
Concentração (espermatozoides/mL)	253 x 10 <sup>6</sup>
Total de espermatozoides ejaculados	8, 9 x 10 <sup>9</sup>

As observações clínicas gerais incluem rolamento no solo. Não sendo observadas atitudes mastigatórias, investigação olfativa da região perineal da égua, solo e secreções útero-vaginas.

Os parâmetros físicos seminais foram: motilidade total 84,22%  $\pm$  6,04, motilidade progressiva 74,47%  $\pm$  7,06, vigor espermático 3,87  $\pm$  0,51, volume sêmen livre de gel 47,27mL  $\pm$  28,66, volume gel 71,75mL  $\pm$  54,80, concentração espermática 253 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, espermatozoides totais ejaculado 8, 9 x 10<sup>9</sup>, defeitos espermáticos maiores e defeitos espermáticos menores . A fração gelatinosa se fez presente em 90/180 coletas, J1 39/40, mas não D4 e D5 em nenhuma coleta.

**Tabela 2:** Média e desvio padrão de algumas características do comportamento sexual de jumentos em colheita de sêmen com uso de éguas em estro\*

Jumento	Tempo de Reação (minutos)	Tempo de Monta (segundos)	Tempo de ejaculação (segundos)	Numero de Monta sem ereção	Número Resposta de Flehmen
J1	11,69±10,01 <sup>a</sup>	6,05±4,48 <sup>a</sup>	35,95±8,5 <sup>a</sup>	0,45 ±0,81 <sup>a</sup>	9,25±5,16 <sup>a</sup>
J2	7,51±8,77 <sup>ac</sup>	4,05±1,78 <sup>ab</sup>	27,82 ±5,47 <sup>ac</sup>	1,0 ±0,61 <sup>ac</sup>	6,14±1,91 <sup>ac</sup>
J3	14,73±11,38 <sup>ace</sup>	3,92±1,3 <sup>abc</sup>	20,47±2,61 <sup>bde</sup>	0,72±0,59 <sup>acd</sup>	3,73±4,52 <sup>acd</sup>
Adultos	12,21 ± 62,82	4,82 ± 3,23	28,14±9,33	1,25±0,48	7,02±2,01
J4	18,32±11,46 <sup>adeg</sup>	6,39±4,81 <sup>abcd</sup>	21,28±2,40 <sup>bdef</sup>	0,89±1,13 <sup>acdf</sup>	10,32±6,42 <sup>acdf</sup>
J5	21,54±24,26 <sup>adegh</sup>	5,42±4,32 <sup>abcde</sup>	22,30±3,06 <sup>bdefh</sup>	2,42±1,92 <sup>bcegh</sup>	9,09±6,78 <sup>bcegh</sup>
J6	35,64±22,44 <sup>bd fgh</sup>	4,37±1,37 <sup>abcde</sup>	22,82±3,51 <sup>bcefh</sup>	1,58±1,11 <sup>bcdfh</sup>	4,89±4,58 <sup>bcdfh</sup>
Jovens	25,38 ± 21,30	5,38 ± 3,84	22,15±2,93	2,16±1,40	8,19 ± 3,04
Total	18,28±17,65	5,08±3,52	25,38±7,72	1,1±1,26	7,41±5,79

\*Médias e Desvio Padrão seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) para o Teste de Kruskal-Wallis. TR: tempo de reação, TM: tempo de monta, TE: Tempo de ejaculação, MSE: monta sem ereção, FHL: Resposta de Flehmen.

A resposta de Flehmen é caracterizada pela elevação do lábio superior e da cabeça, aprisionamento do ar, a seguir caracterizado pela sustentação da elevação do lábio superior acompanhado por uma respiração profunda com extensão do pescoço (WEEKS *et al.*, 2002).

A resposta de Flehmen é um comportamento comum a diversas espécies unguladas (WEEKS *et al.*, 2002). Em animais domésticos, é descrito para garanhões no monitoramento do estágio reprodutivo de éguas (STANLBAUM & HOUP, 1989). Esse comportamento também é descrito em jumentas e jumentos em pastagens (HENRY *et al.*, 1991) e no cortejo por jumentos à monta natural com uso de éguas (LODI *et al.*, 1995).

Este comportamento tem sido descrito em jumentos na coleta de sêmen usando jumentas e éguas como manequim (MORAIS *et al.*, 1993; GASTAL *et al.*, 1996). Em experimento com garanhões domésticos STAHLBAUM & HOUP (1989) observaram que a mais comum manifestação da resposta de

Flehmen foi precedida por uma investigação nasal. No presente estudo a resposta de Flehmen foi manifestada por jumentos após cheirarem a região perineal das éguas, bem como secreções do genital no solo e fezes da égua.

O número de resposta de Flehmen no presente estudo foi similar ao estudo conduzido por GASTAL *et al.* (1996) com o uso de jumentas para a coleta de sêmen, assim como aos valores reportados por HENRY *et al.*, (1991) em condições de pastagem em monta natural com fêmeas da mesma espécie.

O tempo de monta, não tem sido investigado por outros estudos envolvendo jumentos, apenas para garanhões, SILVA FILHO *et al.* (1999) reportaram o tempo de monta de 7 segundos em éguas e 5 segundos quando o manequim foi usado.

A avaliação do tempo de monta se faz necessário para avaliar o quanto o jumento está confortável e confiante para saltar no manequim, observa-se em certos jumentos que foram atingidos com um coice momentos antes da coleta após atingirem ereção, não saltarem sobre a fêmea ou mesmo atrasarem para isto, e assim manifestado por longos tempos de reação.

Observou-se neste trabalho que o tempo de monta foi curto tanto para adultos como para jovens, demonstrando que os asininos estavam confiantes para saltar na égua. Para garanhões esta característica foi reportada a apresentar correlação positiva com volume gel no ejaculado (SILVA FILHO *et al.*, 1999). Neste, a correlação entre tempo de monta e volume gel foi baixa e não significativa ( $r^2= 0,14$ ).

A monta sem ereção é largamente aplicada na indústria bovina de inseminação artificial, baseado no estudo conduzido por ALQUIMIST (1973), uma vez que esse autor demonstrou que o número de espermatozóides no ejaculado pode aumentar com uso da monta sem ereção; provavelmente, por ocorrer a emissão espermática, e estes espermatozóides serem armazenados por curto período de tempo na ampola esperando a segunda emissão e a seguir a ejaculação.

Entretanto, a monta sem ereção é um elemento pré-copulatório normal para eqüídeos, que se faz presente como parte de uma seqüência de interações macho-fêmea (HENRY *et al.*, 1991; MORAIS *et al.*, 1993; LODI *et al.*, 1995; MCDONNELL, 1998; 2000). Além do mais, para alguns jovens

garanhões a monta sem ereção pode acelerar a execução do serviço (MCDONNELL, 2000). Este trabalho observou que a monta sem ereção foi essencial para a colheita de sêmen, contudo, em condições intensivas, esse comportamento tem sido punido em garanhões, isto pode ser responsável pela redução do interesse de alguns deles (NOUE *et al.*, 2001) e até mesmo para asininos.

Foi percebido que os jumentos foram realizaram monta sem ereção, numa tentativa de providenciar condições mais próximas ao comportamento natural com jumentas (HENRY *et al.*, 1991; GASTAL *et al.*, 1996).

A monta sem ereção é considerada uma característica normal do comportamento de eqüideo (HENRY *et al.*, 1998; KLINGEL, 1998; MCDONNELL, 2000). É observado em asininos selvagens e domésticos (HENRY *et al.*, 1991; KLINGEL, 1998), bem como em eqüinos (MCDONNELL, 2000). Este comportamento também tem sido reportado em colheita de sêmen por outros autores (GASTAL *et al.*, 1996; MORAIS *et al.*, 1993).

Percebeu-se que a monta sem ereção foi permitida por ser um comportamento normal, foram observadas diferenças entre jovens e adultos, em que os jovens realizaram o dobro de monta sem ereção em relação às jovens (1,12 versus 2,2). É preciso considerar que em algumas coletas de sêmen a realização da monta sem ereção foi essencial para a posterior ereção completa e na seqüência a coleta.

HENRY *et al.* (1991) em experimento conduzido com dois asininos em sistema de monta natural em pastagem, encontraram diferenças para o jumento adulto (12 anos) e o jovem (3,5 anos). Com isso, os achados destes autores suportam o presente estudo, porque naturalmente, animais adultos são mais eficientes no número de monta ejaculatória em relação a machos jovens.

Em estudo conduzido com garanhões da raça Crioulo em pastagens sob condições de monta natural, o garanhão jovem apresentou maior número de montas sem ejaculação em relação a outros dois garanhões do referido estudo nas mesmas condições (FREITAS *et al.*, 2006).

Para as análises feitas entre grupos adultos e jovens, o tempo de reação para adultos foi de  $12,21 \pm 62,82$  minutos, enquanto que para os jovens a média foi de  $25,16 \pm 21,30$  minutos; observou-se diferenças entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

O grupo dos jumentos jovens estava iniciando a sua segunda estação reprodutiva, os mesmos tinham servido na estação reprodutiva anterior 2006/2007. As diferenças de tempo de reação para os dois grupos podem ser explicadas pelo pouca idade do grupo de jovens. GEBERS (1995) reportou diferenças nos TR entre grupo de jumentos jovens e adultos. Entretanto, os valores registrados foram inferiores ao longo tempo de reação informado pelo autor para jovens (41 minutos), apesar de semelhantes tempos serem registrados em ambos os estudos para animais adultos.

Provavelmente, os longos tempos de reação relatados para jovens por GEBERS (1995) possam ser justificáveis pelo fato de ser a primeira estação de monta dos animais, e por isso o autor mencionar que os animais foram condicionados a coleta de sêmen em período anterior ao início do estudo.

O tempo de reação observado na presente pesquisa foi similar a outros estudos envolvendo jumentas em coleta como manequim (GASTAL *et al.*, 1996; HENRY *et al.*, 1998).

COSTA (1991) conduziu um estudo de campo envolvendo o comportamento sexual de 83 machos da raça Pêga. Neste, apenas uma coleta de sêmen foi realizada para jumentos de diferentes idades e estágio reprodutivo. O autor ainda relata o uso de éguas, porém não reporta proporção de jovens e adultos, relata que o tempo de reação variou de um até quarenta e cinco minutos, com média de 10 minutos para a realização da colheita de sêmen.

Sendo que aqui, o TR foi de  $18,28 \pm 17,65$  minutos, com coeficiente de variação de 96,5%, que demonstrou a grande variação desta característica, variação semelhante foi encontrado por (SILVA FILHO *et al.*, 1999), em estudos conduzidos com um garanhão.

As características comportamentais são grandemente influenciáveis pelo animal, dia e condições de ambiente. Jumentos são animais que apresentam grande capacidade de dispersão com o ambiente e condições ambientais como barulho, vento, chuva, etc; fatos semelhantes foram reportados por HENRY *et al.* (1991) e por TAYLOR & MATWES (1998). Aparentemente, observou-se que em dias que as condições ambientais foram extremas (como dias quentes, ou frios, ou com muito vento), maiores tempos de reação foram esperados.

Outros aspectos podem ter contribuído negativamente para o tempo de reação tais como: manejo geral do haras; movimentação de tratores e máquinas agrícolas em estrada municipal que atravessa a propriedade; movimento de trabalhadores rurais; presença de bovinos em pastos em arredores. Como reportado por HENRY *et al.* (1991) jumentos são animais que se dispersam com facilidade.

Outra observação clínica interessante é que alguns jumentos em algumas coletas de sêmen manifestaram o interesse de rolar no solo, sendo que essa condição aconteceu em diversas coletas essenciais para a completa ereção e assim realização da coleta de sêmen. Tal comportamento também foi observado por (HENRY *et al.*, 1991) em condições de pastagens em monta natural em jumentas.

Em todas as coletas de sêmen a ereção iniciou após momentos de quietude e aparente paralisia de movimentos do jumento, com ausência de barulho ambiental. Após poucos milésimos de segundos, o jumento iniciou a exposição peniana, seguido pela emissão de três jatos de secreção transparente de baixa viscosidade acompanhado no mesmo momento pelo início da exposição peniana e ereção, acompanhado pela elevação da cauda em posição horizontal, seguidos pela elevação do pênis em ereção contra o abdômen.

O tempo de ejaculação não tem sido estudado por muitos autores, sendo que no presente estudo os valores encontrados foram semelhantes ao reportado por HENRY *et al.* (1991) de 25 a 30 segundos. Porém, ligeiramente inferiores aos reportados por SILVA FILHO *et al.* (1999) de 35 segundos para apenas um garanhão em duas estações com uso de égua em estro e manequim.

O comportamento de fuga lento e rápido tem sido caracterizado como normal para jumentos em pastagens e em coleta de sêmen (HENRY *et al.*, 1991, LODI *et al.*, 1995; GASTAL *et al.*, 1996). No entanto, em condições intensivas de coleta o manejo dessa coleta pode se tornar complicado, assim tal comportamento não foi permitido neste.

Em todas as coletas de sêmen do presente experimento, a chegada do jumento até a égua foi precedida por vocalização típica do macho desta

espécie. O mesmo comportamento foi reportado com uso de jumentas monta natural em pastagens (HENRY *et al.*, 1991; 1998) em coleta de sêmen (GASTAL *et al.*, 1996) e também em monta natural em éguas em pastagens (LODI *et al.*, 1995).

De acordo com HENRY *et al.* (1991) este comportamento é usado por jumentos para induzirem a manifestação de estro de jumentas e provavelmente para atraí-las para seu território.

Este comportamento conforme reportado por LODI *et al.* (1995) apresentou pequena reação em éguas sob condições de pastagens em monta natural. Em acordo, percebeu-se a vocalização do jumento induzindo pequeno ou nenhum efeito comportamental detectável nas éguas usadas para a coleta. O comportamento de vocalização também aqui se observou, imediato a rufiação da égua caracterizado por investigação olfativa da região perineal da égua, resposta de Flehmen, investigação de secreções da égua no solo, vezes, seguido normalmente pela resposta de Flehmen e/ou vocalização.

Durante todo o período da coleta, o comportamento da égua manequim após as investidas do jumento variou de pequena demonstração de estro como urina emitida em pequenos jatos, discreta eversão clitoral até permanecer imóvel sem manifestar reação positiva e negativa.

Em um estudo conduzido por LODI *et al.* (1995), os autores demonstraram que os sinais de estro da égua variaram de discreta resposta até a completa rejeição, além disso, observaram diferentes manifestações em éguas de acordo com o jumento, tais características não foram constatadas, além disso, em algumas situações a mesma égua foi empregada em diferentes coletas para diferentes machos no mesmo dia e assim não percebemos diferentes manifestações para diferentes machos. A seleção de éguas com boa aceitação a asininos é uma característica de extrema importância na coleta de sêmen para asininos, MORAIS *et al.* (1993).

Os parâmetros seminais estiveram inclusos nos intervalos médios considerados como normais para a espécie (HENRY *et al.*, 1987; GASTAL *et al.*, 1997), e especialmente para a raça Pêga (MORAIS *et al.*, 1994; COSTA, 1991; GERBER, 1995). Assim, o uso de égua em estro como manequim pode

ser empregado na rotina para diferentes propósitos sem afetar as características seminais.

## **5. CONCLUSÃO**

O tempo de ejaculação, resposta de Flehmen, monta sem ereção foi similar ao descrito com uso de jumentas em monta natural e coleta de sêmen. O método de colheita de sêmen usando éguas em estro para jumentos previamente condicionados na cobertura de éguas foi eficiente. A menor participação da fêmea em estro aparentemente tem pequena ou nenhum efeito no tempo de reação. Nos casos em que as premissas descritas neste estudo sejam seguidos em éguas em estro, estas podem ser usadas para a coleta de sêmen.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALQUIMIST, J.O. Effects of sexual preparation on sperm output, semen characteristics and sexual activity of beef bulls with a comparison to dairy bulls. **Journal of Animal Science**, .v. 36, p. 331-336, 1973.

ALVARENGA, M.A. **Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões.** Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual Paulista, 2002. 87p. Tese (Livre Docência em Reprodução Animal) FMVZ – Universidade Estadual Paulista, 2002.

BEACH, F.A. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. **Hormone and Behavior**, v.7, p.105-138, 1976.

BLOM, E., 1973. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, p. 383-391, 1973.

CLAYTON, H.M.; LINDSAY, F.E.F., FORBES, A.C.; HAY, L.A. Some studies of comparative aspects of sexual behaviour in ponies and donkeys. **Applied Animal Ethology**, v.7, n. 2, p.169-174, 1981.

CNA: **Estudo do complexo do agronegócio cavalo no Brasil:** Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada ESALQ-USP/Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2006. 70p (coletânea estudos gleba, 40).

COSTA, A.J.S.A. **Avaliação clínico andrológica do jumento da raça Pêga.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1991. 66p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária - UFMG, 1991.

CROWELL-DAVIS, S.H. Sexual behavior of mares. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 1, p. 12-17, 2007.

DAVIES-MOREL, MCG. **Equine Artificial Insemination.** Wallingford-Oxon: CAB International, 1999. 406p.

FREITAS, C.C.; TAROUCO, A.K.; MÖLLER, G.; TREIN, C.; RIBEIRO, L.A.O. MATTOS, R.C. Sexual behavior of Crioulo stallions on pasture. **Animal Reproduction Science**, v.94, n.1-4, p.42-45, 2006.

GASTAL, M.O.; HENRY, M.; BEKER, A.R.; GASTAL, E.L. Effect of ejaculation frequency and season donkey jack semen, **Theriogenology**, v. 47, p. 627-638, 1997.

GASTAL, M.O.; HENRY, M.; BEKER, A.R.; GASTAL, E.L. Sexual behavior of donkey jacks: influence of ejaculatory frequency and season, **Theriogenology**, v.46, n.4, p.593-603, 1996.

GASTAL, M.M.F.O. **Estudo das características seminais e do comportamento sexual de jumentos**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1991. 105p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária - UFMG, 1991.

GEBERS, A. M. **Emissão diária de espermatozoides e algumas características reprodutivas de jumentos da raça Pêga**. Viçosa: Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1995. 90p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) DZO – UFV, 1995.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. , 2. ed. Cross Plains: Equiservices, Publishing1992, 642p.

GINTHER, OJ; SCRABA, S.T.; NUTI, L.C. Pregnancy rates and sexual behavior under pasture breeding conditions in mares. **Theriogenology**, v. 20, n.3, p. 332-345, 1983.

HANCOCH, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Reproduction Microscopy Science**, v.76, p.84-97, 1957.

HENRY, M.; LODI, L.D.; GASTAL, M.M.F.O. Sexual behaviour of domesticated donkey (*Equus asinus*) breeding under controlled or free range management systems. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, p.263-276, 1998.

HENRY, M.; MCDONNELL, S.M.; LODI, L.D.; GASTAL, E.L. Pasture mating behavior of donkeys (*Equus asinus*) at natural and induced oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility** (Suppl.) v. 44, p. 77-86,1991.

HENRY, M. Comportamento sexual dos asininos. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária - UFMG**, v.6, p.5-19, 1991.

HENRY, M.; OLIVEIRA, M.M.F.; DIAZ, A.P.; GASTAL, E.L.; TOLENTINO, F.T. Comportamento de jumentos no período de cortejo e ato sexual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1987, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p. 71.

HENRY, M.; FIGUEIREDO, A.E.F.; PALHARES, M.S.; CORYN, M. Clinical and endocrine aspects of the oestrus cycle in donkeys (*Equus asinus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, (suppl) v. 35, p. 297 -303, 1987.

KLINGEL, H. Observations on social organization and behaviour of African and Asiatic wild asses (*Equus africanus*) and (*Equus hemionus*). **Applied Animal Behavior Science**. v. 60, p.103-113, 1998.

KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion**. Hastings: Journal Society Theriogenology, v.9, 1983.100p.

KREUCHAUF, A. Reproductive physiology in the jackass. **Animal Research Development**. v.20, p.51-78, 1984.

LODI, L.D.; HENRY, M.; PARANHOS-COSTA, M.J.R Behavior of donkey jacks (*Equus asinus*) breeding horse mares (*Equus caballus*) at pasture. **Biology Reproduction Monograph**.v.1, p. 591-598, 1995.

LODI, L.D. **Aspectos do comportamento de jumentos (*Equus asinus*) em sistema de monta de éguas (*E. caballus*) a campo**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 1993,108p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária-UFMG, 1993.

MCDONNELL, S.M. 2000) Reproductive behavior of stallions and mares: comparison of free-running and domestic in hand breeding. **Animal Reproduction Science** v.60-61, p. 211-219, 2000.

MCDONNELL, S. M. Reproductive behavior of donkey (*Equus asinus*). **Applied Animal Behavior Science**, v. 60, n. 2-3, p. 277-282, 1998.

MCDONNELL, S.M. Normal and abnormal sexual behavior. In: Blanchard TL and Varner DD. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**. v.8, n.1,p.71-89, 1992.

MCDONNELL, S.M. Reproductive Behavior of the stallion. **Veterinary Clinics of North America-Equine Practice**, v.2, n. 3, p. 535-555, 1986

MORAIS, R.N.; MUCCILOLO, R.G.; VIANA, W.G. Biologia reprodutiva de jumentos. II. Características físicas e morfológicas do sêmen. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 31, n.1, p.49-57, 1994.

MORAIS, R.N.; MUCCILOLO, R.G.; VIANNA, W.G. Biologia reprodutiva de jumentos. I Biometria testicular e comportamento sexual durante a colheita de semen. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, n. 1 p. 47-50, 1993.

MORAIS, R.N. **Contribuição ao estudo da biologia reprodutiva de jumentos (*Equus asinus*)**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, 1990. 105p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – FMVZ –USP, 1990.

- NISHIKAWA, Y. **Studies on reproduction in horses**. Tokyo: Japan Racing Assoc. 340p, 1959.
- NOUE, P.; BERNABE, J.; RAMPIM, O.; VIDAMENT, M.; DUMAS, T.; PALMER, E, MAGISTRINI, M. Sexual behavior of stallions during in-hand natural service and semen collection: an observation in French studs. **Animal Reproduction Science**. v. 68. , p.161-169, 2001.
- NUNES, R. O jumento Pêga. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE EQUIDECULTURA, 1., 2007, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Departamento de Zootecnia- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. p. 33-39.
- OLIVEIRA, J.V.; ALVARENGA, M.A.; MELO,C.M.; MACEDO, L.M.; DELLÁQUAJR; J.A.; PAPA, F.O. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezeability and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p.82-84, 2006.
- OLIVEIRA, J.V. **Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumento (Equus asinus) por meio de testes laboratoriais e fertilidade**, Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, 2005.108p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – FMVZ- Universidade Estadual Paulista, 2005.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA–UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas – SAEG**. Versão 9.1. Viçosa, MG, 2007. 142p.
- SILVA FILHO, J.M.; VALLE, G.R.; VIANNA, W.S.; PALHARES, M.S. Utilização de manequim para coleta de sêmen eqüino e sua influência sobre características reprodutivas do garanhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n.5, p.499-504, 1999.
- STAHLBAUM, C.C.; HOUP, K.A The role of the Flehmen response in the behavioural repertoire to the stallion. **Physiology and Behavior**, v. 45, n. 6, p. 1207-1204,1989.
- TAYLOR, T.; MATHEWS, N.S. Mammoth asses – selected behavioural considerations for the veterinarian. **Applied Animal Behavior Science**, v. 60 p.283-289, 1998.
- THOMPSON, D.L. Reproductive physiology of stallion and jack. In: EVANS, J.W. (Ed.) **World Animal Science: Horse Breeding and Management**. London: Elsevier, 1992, p. 237-257.
- TIBARY, A. Stallion Reproductive Behavior. In: SAMPER, J.C. et al. (Ed.) **Current Therapy in Equine Reproduction**. Saint Louis: Saunders-Elsevier, 2007. p.174 -184.
- TORRES A.P.; JARDIM, W.R. **Criação do cavalo e de outros eqüinos**. 3ed. São Paulo: Nobel. 1992, 654p.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation, **Theriogenology**, v. 50, p. 793-806, 1998.

VIDAMENT, M.; VICENT, P.; ,MARTIN, F.X.; MAGISTRINI, M.; BLEBOIS, E. Differences in ability oh jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, (in Press) 2008.

WEEKS, J.W.; CROWELL-DAVIS, S.L.; HEUSNER, G. Preliminary study of the development of the Flehmen response in Equus caballus. **Applied Animal Behaviour Science**, v.78, n. 2-4, p. 329-335, 2002.

## **CAPÍTULO II**

### **ALGUNS ASPECTOS BIOMÉTRICOS DO APARELHO GENITAL EXTERNO DE JUMENTOS DOADORES DE SÊMEN DA RAÇA PÊGA**

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o principal interesse em jumentos se resume na doação de sêmen para a produção de muares, embora exista no país plantéis asininos de elevado padrão genético, em que esse reprodutor é usado para a produção da própria espécie.

A raça Pêga é uma raça asinina nacional criada em quase todos os estados da federação, sendo largamente usada em cruzamentos com éguas puras e mestiças para produção de muares marchadores (NUNES, 2007), necessitando, desta forma, de avaliação precisa da qualidade seminal e do aparelho reprodutivo para possível predição da fertilidade e normalidade andrológica.

Destaca-se neste ponto o exame andrológico por ser importante ferramenta auxiliar de predição da capacidade reprodutiva do macho, sendo de relevância para a aplicação de biotecnologias do sêmen, na rotina dos haras, bem como em pesquisas (LOVE, 2007), auxiliando na melhoria da eficiência reprodutiva (KENNEY *et al.*, 1983).

No Brasil, as normas e padrões da avaliação andrológica e do sêmen foram estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Porém, o reprodutor asinino não foi incluído nos padrões estabelecidos por essa entidade. Deste modo, experimentos e levantamentos de campo devem ser realizados para se estabelecer os padrões de exame andrológico para esta espécie.

A biometria testicular deve ser um requisito obrigatório nessa avaliação, uma vez que fornece informações úteis em termos de comparação do tamanho normal e, principalmente, previsão quanto à produção espermática (KENNEY *et al.*, 1983).

A partir das biometrias testiculares podem ser realizados cálculos de índice e volume testicular. O índice testicular pode ser utilizado como importante ferramenta no estabelecimento da condição de normalidade reprodutiva do órgão e como auxiliar na estimativa da produção espermática diária e assim auxiliar na predição do número de éguas e ou jumentas a serem cobertas e/ou inseminadas com sêmen de um dado reprodutor durante a estação de monta (MORAIS, 1990).

Configura-se também como objetivo deste estudo avaliar alguns aspectos da biometria do aparelho genital externo de jumentos reprodutores da raça Pêga, andrologicamente normais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A biometria testicular deve ser um requisito obrigatório na avaliação andrológica, tendo como principais finalidades diagnosticar alterações testiculares, e auxiliar na predição do potencial reprodutivo e produção espermática diária (VARNER *et al.*, 1991).

Devido à disposição horizontal dos testículos no escroto do jumento e do garanhão, o perímetro escrotal não é realizado, mas variantes da técnica, como a largura testicular escrotal e comprimento são realizados (MORAIS, 1990; VARNER *et al.*, 1991). Ambas as técnicas são de rápida e fácil aplicação, oferecendo uma previsão da produção espermática diária (COSTA, 1991; GERBERS, 1995).

MORAIS (1990) e COSTA (1991) chamam atenção da importância dos parâmetros testiculares na avaliação andrológica de jumentos, uma vez que oferece subsídios relevantes para a interpretação e formulação do laudo andrológico.

GEBAUER *et al.* (1974), aparentemente, foram os primeiros a introduzir a avaliação testicular com paquímetro em testículo de garanhões, e EL WISHY (1974) em jumentos, em que ambos os trabalhos foram baseados no estudo pioneiro de HAHN *et al.*, (1969), que utilizaram 120 reprodutores da raça Holandesa nos Estados Unidos.

EL WISHY (1974) trabalhando com testículos de nove jumentos recém-castrados (médias: idade 5,1 anos e peso 257 kg), registrou os seguintes valores para comprimento, largura e altura testiculares: 8,41x 5,91 x 4,77 cm

para o testículo direito e 8,37 x 5,78 x 4,46 cm para o testículo esquerdo. O autor desenvolveu uma fórmula para avaliação do volume testicular e obteve os volumes de 103,44 e 103,89 mL para os testículos direito e esquerdo, respectivamente.

KREUCHAUF (1984) estudando a biometria de jumentos africanos com idades variáveis entre dois e 12 anos e 150 kg de média de peso corporal, registrou as seguintes medidas para comprimento, largura e altura: 8,58; 5,78 e 6,30 cm. O autor não verificou assimetria entre as gônadas do mesmo reprodutor.

MORAIS (1990) trabalhando com seis jumentos da raça Pêga em São Carlos-SP (peso médio 400 Kg, e idades 3 a 12 anos), observou valores de 10,35; 6,73 e, 7,12 cm e 10,12; 7,38 e 7,68 cm para os comprimento, largura e altura dos testículos esquerdo e direito, respectivamente. O autor empregou a mesma fórmula descrita por EL WISHY (1974), para cálculo do volume testicular, obtendo valores de 182, 34 ± 32,58 e 201,36 ± 9,36 para o testículo esquerdo e direito, nesta ordem.

GASTAL (1991) trabalhando com seis jumentos da raça Nordestina na zona metalúrgica de Minas Gerais, com peso médio 162 kg, registrou as seguintes mensurações de comprimento, altura e largura testicular: 7,6; 5,5 e 5,1 cm para ambos os testículos.

KENNEY (1989) *apud* MORAIS (1990), numa tentativa de tornar mais objetiva a avaliação e comparação testicular entre garanhões, estabeleceu o índice testicular (IT) que é calculado pelo somatório da altura, largura e comprimento de ambos os testículos dividido por dois, em que o IT=8 para garanhões é dado como valor normal.

Em asininos, (MORAIS, 1990) utilizou seis jumentos da raça Pêga, considerados como aptos à reprodução (peso médio 400 Kg, e idades 3 a 12 anos), registrando valores de IT variando de 8,24 a 12,73, sendo superiores ao valor considerado como normal para garanhões por KENNEY (1989) citado por MORAIS (1990).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Animais

O presente experimento foi desenvolvido durante o período de agosto/2006 a fevereiro/2007. Foram utilizados seis reprodutores da raça Pêga, (J1, J2, J3, J4, J5 e J6), com peso médio de  $272 \pm 34,97$  (231 – 326 kg) e idade média, no início do experimento, de 109 meses.

Os animais pertenciam a um haras de criação comercial de asininos e muares, localizado no município de Guaraciaba, Zona da Mata de Minas Gerais. Foram subdivididos em dois grupos: adultos (J1, J2 e J3 16,14 e 16 respectivamente) e jovens (J4, J5 e J6 todos com média de 3,5 anos). Todos os reprodutores apresentavam histórico de boa fertilidade à monta natural com éguas, em estações de monta anteriores.

Antes do início dos procedimentos, realizou-se exame clínico andrológico de acordo com as recomendações de KENNEY *et al.* (1983) para sêmen de garanhões, sendo todos os animais classificados como aptos à reprodução.

Durante o período decorrido entre as mensurações, foram realizadas 180 coletas de sêmen para avaliação dos parâmetros seminais e constatação da normalidade andrológica. Para as coletas se fez uso de uma vagina artificial modelo Botucatu; fazendo a coleta com uso de égua em estro como descrito no capítulo I.

Imediatamente após a coleta foram feitas avaliações dos parâmetros físicos (volume, motilidade, motilidade progressiva, vigor, concentração) e morfológicos do sêmen, de acordo com a metodologia de KENNEY *et al.* (1983).

Os jumentos foram mantidos em baias de alvenaria individuais com acesso a bebedouro, sal mineralizado comercial específico para eqüídeos, além de feno de capim (*Cynodon dactylon* cv. Tifton 85), com acesso irrestrito durante todo o período do dia. Ofereceu-se 20 kg/animal de capim fresco picado (*Pennisetum purpureum* cv Elefante), divididos em dois tratos: um pela manhã e outro pela tarde. Além disto, pela manhã, antes do primeiro trato, foi fornecido diariamente a todos os reprodutores uma dose de 20 mL de um suplemento líquido poli-vitamínico e micro-minerais para eqüídeos, de acordo com a recomendação do fabricante.

### 3.2. Procedimentos

Ao longo do período experimental, cada reprodutor foi submetido a três ou quatro mensurações, em que cada órgão foi mensurado individualmente, utilizando-se um paquímetro, conforme descrito por GEBAUER *et al.* (1974) e adaptado por GEBER (1995) para asininos, após a coleta de sêmen. Sendo mensurados em ambos os testículos: o comprimento testicular (CT - crânio caudal), altura testicular (AT – dorso ventral), largura testicular (LT – médio lateral).

Além disso, realizou-se a espessura do funículo (FUN – terço médio) em ambos os antimeros corporais. Foram feitas, em cada momento da mensuração, várias medidas seqüenciais até a coincidência de três resultados iguais de cada item, para só então ser considerado o resultado válido.

As mensurações testiculares foram utilizadas para se obter o “índice testicular”, como preconizado por KENNEY (1989) *apud* MORAIS (1990) de acordo com a fórmula:  $IT = \frac{(CTE \times LTE \times ATE) + (CTD \times LTD \times ATD)}{100}$ . Onde: IT = índice testicular; CTE = comprimento testicular esquerdo; LTE = largura testicular esquerda; ATE=altura testicular esquerda; CTD= comprimento testicular direito; LTD= largura testicular direito; ATD= altura testicular direito.

Realizou-se a estimativa do volume testicular (cm) empregando a fórmula preconizada por EL WISHY (1974) para testículos de jumentos e garanhões de acordo com a fórmula:  $Y_{vt} = *33,57X - 56,57$ . Sendo  $Y_{vt}$  igual ao volume testicular; "X" representa a altura testicular (cm); e os números 33,57 e 56,57 representam os fatores de correção constantes.

### **3.3. Análises estatísticas**

Para as análises empregou-se o programa estatístico SAEG 9,1 (SAEG –UFV, 2007). Foram efetuados cálculos da média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação dos resultados obtidos para cada variável avaliada, por reprodutor e para o grupo experimental.

Para as variáveis qualitativas, efetuaram-se os testes de Lillinfors e Cochran e Bartlett para verificar a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias dos grupos, nesta ordem. Aqueles dados que não atenderam a premissa da ANOVA, foram submetidos à análise não paramétrica e as médias comparadas pelos testes de Kruskal Wallis ou Wilcoxon com probabilidade de erro de 5%. As variáveis que atenderam a pelo menos uma premissa, foram submetidos à análise de variância por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios registrados dos principais parâmetros seminais estão sumarizados na tabela 1. Os valores registrados para os parâmetros físicos do sêmen e morfológicos estiveram incluídos dentro da faixa considerada normal por outros estudos com jumentos da raça Pêga (MORAIS, 1990; COSTA, 1991; GEBERS, 1995; GASTAL *et al.*, 1996).

Os valores de biometria testicular para ambos os órgãos encontram-se sumarizados na tabela 2. Ao agruparem-se os animais neste estudo em duas categorias como propôs GEBERS (1995), em adultos e jovens, os valores médios para CTD (comprimento do testículo direito) foram diferentes entre os dois grupos (91,23 mm, contra 84,68 mm para adultos e jovens na ordem) ( $p < 0,05$ ).

Este procedimento se deu, provavelmente, porque os animais jovens ainda estavam em fase de desenvolvimento corporal e testicular, já que a média de idade dos mesmos era de 36 meses ao início da fase experimental. O mesmo autor registrou que CTD apresenta correlação alta e positiva com emissão diária de espermatozoides ( $r = 0,80$ ), medidos pelo número de espermatozoides totais no ejaculado enquanto no presente experimento a correlação foi positiva e baixa ( $r = 0,26$ ).

A média para o CTD dos dois grupos foi de  $88,77 \pm 6,96$  mm, inferior aos relatados para raça Pêga, por MORAIS (1990) 105,5mm; por COSTA (1991) 92,0 mm; e por GEBERS (1995) 91,5mm. Porém, superiores aos relatados por GASTAL (1991) 76 mm para a média de ambos os testículos de um mesmo reprodutor, para animais da raça Nordestina.

É importante observar que pode ter havido diferenças no emprego da metodologia. No presente experimento teve-se o cuidado de realizar a mensuração do aparelho genital externo, empregando-se a contenção dos reprodutores em tronco específico para eqüídeos.

Os referidos autores relataram dificuldade na mensuração testicular no início da fase experimental, devido os animais terem permanecido inquietos, por não estarem condicionados a esse tipo de prática de manejo.

MORAIS (1990), COSTA (1991) e GEBERS (1995) utilizaram animais com maior peso corporal em relação ao peso médio dos animais do presente experimento. O que pode estar relacionado a diferenças observadas nas biometrias testiculares entre o presente e os demais estudos.

Foi registrado por COSTA (1991) em seus estudos, assim como neste, relação linear positiva entre peso corporal e CTD; aqui a correlação foi de  $r = 0,68$ , porém não houve diferenças no peso médio entre os dois grupos de jovens e adultos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1:** Valores Médios  $\pm$  Desvio Padrão registrados para os principais parâmetros seminais de seis asininos doadores de sêmen da raça Pêga (Agosto/2006 – Fevereiro/2007).

Parâmetros	Mensuração
Volume seminal livre de gel	47,27 mL $\pm$ 28,66 mL
Volume e nº. de ejaculados com gel	71,75 mL $\pm$ 54,8 mL (54/180 coletas)
Motilidade total	84,22 % $\pm$ 6,04
Motilidade Progressiva	74,47 % $\pm$ 7,06
Vigor Espermático (1-5)	3,87 $\pm$ 0,51
Defeitos Espermáticos Maiores	7,97% $\pm$ 3,02 %
Defeitos Espermáticos Menores	6,80 $\pm$ 1,59%
Concentração Espermática	254, 64 x 10 <sup>6</sup> /mL
Espematozóides totais no ejaculado	10, 3 x 10 <sup>9</sup> $\pm$ 452,56 (6,3 a 12,5x10 <sup>9</sup> )

O CTE médio de ambas as categorias registradas neste experimento foi de 88,21  $\pm$  8,86, enquanto a média para o grupo de adultos foi superior e diferente da média do grupo de jovens (91,23 mm versus 84,68 mm, respectivamente) ( $p < 0,05$ ).

Os animais do grupo de jovens possuíam idade média de 36 meses, provavelmente os testículos ainda estavam em fase de desenvolvimento. O valor registrado para CTE apresentou-se semelhante aos relatados para a raça (MORAIS, 1990; COSTA, GEBERS, 1995). A CTE média comparada com o CTD dos animais foi parecida ( $p>0,05$ ) ( $88,21 \pm 8,86$  e  $88,77 \pm 6,96$  mm), indicando certa similaridade neste parâmetro entre testículos.

**Tabela 2:** Médias e Desvio Padrão (mm) das Biometrias do Testículo Direito e Esquerdo (Comprimento, Altura e Largura) de seis reprodutores asininos adultos e jovens da raça Pêga.

<b>Características Biométricas do Testículo Esquerdo</b>			
<b>Jumentos</b>	<b>Comprimento</b>	<b>Altura</b>	<b>Largura</b>
<b>Categoria</b>	<b>Individual</b>	<b>Individual</b>	<b>Individual</b>
J1 <b>adulto</b>	$102,80 \pm 0,40^a$	$68,80 \pm 0,40^a$	$67,80 \pm 0,40^a$
J2	$78,70 \pm 0,46^{bc}$	$62,70 \pm 0,46^{bc}$	$67,41 \pm 0,50^{ac}$
J3	$85,00 \pm 0,00^{bde}$	$66,62 \pm 0,49^{bce}$	$65,62 \pm 0,49^{bde}$
<b>Subtotal</b>	$91,23 \pm 9,99$	$66,83 \pm 2,22$	$66,83 \pm 1,12$
J4 <b>jovem</b>	$84,92 \pm 0,26^{bdeg}$	$58,14 \pm 0,35^{bdfg}$	$66,07 \pm 0,26^{bdeg}$
J5	$77,38 \pm 0,49^{bcfgi}$	$59,00 \pm 0,00^{bcfgi}$	$63,61 \pm 0,49^{bdfhi}$
J6	$91,00 \pm 0,00^{adfjh}$	$59,55 \pm 0,00^{bcfhi}$	$65,44 \pm 0,49^{bdegj}$
<b>Subtotal</b>	$84,68 \pm 5,57$	$58,90 \pm 0,69$	$65,08 \pm 1,11$
<b>Total</b>	$88,21 \pm 8,86$	$63,17 \pm 4,30$	$66,02 \pm 1,41$
<b>Características Biométricas do Testículo Direito</b>			
<b>Jumentos</b>	<b>Comprimento</b>	<b>Altura</b>	<b>Largura</b>
<b>Categoria</b>	<b>Individual</b>	<b>Individual</b>	<b>Individual</b>
J1 <b>adulto</b>	$100,8 \pm 0,40^a$	$64,20 \pm 0,40^a$	$75,00 \pm 0,00^a$
J2	$85,64 \pm 0,99^{bc}$	$55,58 \pm 0,50^{bc}$	$55,11 \pm 0,33^{bc}$
J3	$85,35 \pm 0,48^{bce}$	$56,90 \pm 0,81^{bce}$	$70,27 \pm 0,45^{bde}$
<b>Subtotal</b>	$91,77 \pm 7,62$	$59,68 \pm 3,88$	$69,56 \pm 7,04$
J4 <b>jovem</b>	$82,0 \pm 0,0^{bdfg}$	$62,85 \pm 0,35^{adfg}$	$67,85 \pm 0,35^{bcfg}$
J5	$83,0 \pm 0,0^{bcfgi}$	$69,00 \pm 0,00^{adfhi}$	$68,00 \pm 0,00^{bcfgi}$
J6	$90,44 \pm 0,50^{acfjh}$	$58,55 \pm 0,50^{bdegj}$	$80,00 \pm 0,00^{adfjh}$
<b>Subtotal</b>	$85,26 \pm 3,81$	$63,27 \pm 4,29$	$72,14 \pm 5,79$
<b>Total</b>	$88,77 \pm 6,96$	$61,33 \pm 4,44$	$70,75 \pm 6,60$

\* Médias e Desvio Padrão seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P<0,05$ ) para o Teste de Kruskal-Wallis.

Os valores médios da ATD foram superiores e diferentes (63,46 mm) para o grupo dos animais jovens em relação ao grupo dos animais adultos (58,89mm) ( $p < 0,05$ ), provavelmente ATD se desenvolva mais precocemente que as demais características testiculares quando o órgão estiver em fase de crescimento.

A média de ATD neste estudo foi inferior ao registrado por outros autores para a raça, (74,4 mm), sendo a diferença média de peso dos animais entre esses estudos de 130 kg (MORAIS, 1990; COSTA, 1991; GEBERS, 1995). No entanto, os valores médios de ATD mostraram-se próximos ao obtido por GASTAL, (1991) com jumentos da raça Nordestina (55 mm).

O valor médio registrado de LTD foi de 69,56 mm para adultos e 72,14 mm para jovens, porém sem diferenças entre os grupos ( $p > 0,05$ ). O LTD se mostrou superior aos relatados para jumentos da raça Pêga, sendo que a média obtida pelos autores foi de 67,3 mm relatados para jumentos da raça Pêga (MORAES, 1990; COSTA, 1991; GEBERS, 1995), enquanto que para animais a raça Nordestina GASTAL (1991) encontrou valores de LTD de 51 mm.

O jumento J6 apresentou um valor elevado para LTD, o que aumentou a média do grupo de jovens. Contudo, este parâmetro é o menos influenciável por erros de metodologia, uma vez que a mensuração é médio-lateral e não envolve o epidídimo, porém apesar dos experimentos anteriores terem empregados a mesma raça, as condições de criação e manejo foram diferentes, o que pode ter interferido no desenvolvimento testicular dos reprodutores.

Entretanto, os demais parâmetros, as médias para ATE e LTE foram maiores e porém não diferentes 69,83 mm e 58,9mm; 66,83 mm e 65,04mm, para adultos e jovens, respectivamente ( $p > 0,05$ ). Isto, provavelmente, devido os adultos terem completado o desenvolvimento testicular em oposição aos demais que ainda estavam em fase de desenvolvimento.

A média para ATE ( $63,17 \pm 4,30$ ) neste estudo foi levemente inferior aos valores médios relatados por (MORAIS, 1990; COSTA, 1991; GEBERS, 1995), que registraram valores entre 70 a 74 mm, porém superiores ao observado em Jumentos da raça Nordestina (GASTAL, 1991).

Do mesmo modo, a LTE e a LTD registram valores superiores aos relatados na literatura para animais da raça Pêga (MORAIS, 1990; COSTA, 1991; GEBERS, 1995) e superiores aos relatados para jumentos da raça Nordestina (51 mm) por GASTAL (1991).

Os valores registrados para o índice testicular encontram-se sumarizados na tabela 3. O índice testicular (IT) médio observado foi de 7,45 e as variações entre 5,94 e 9,64. Sendo inferiores ao mínimo (IT = 8) preconizado para garanhões por KENNEY (1989) *apud* MORAIS (1990).

No entanto, todos os reprodutores apresentavam histórico reprodutivo de boa fertilidade em pelo menos uma estação reprodutiva, e os parâmetros seminais se apresentaram na faixa considerada normal para asininos.

Valores superiores ao presente estudo foram registrados por MORAIS (1990) em seis reprodutores asininos com valores de IT de 8,24 a 12,73. Calculando-se o IT a partir dos dados mensurados por COSTA (1991) e GEBERS (1995), obtiveram-se os valores de 7,90 e 8,12 para IT em jumentos Pêga, andrologicamente normais. Provavelmente, as diferenças de tamanho corporal bem como as condições de criação dos reprodutores, possam ter sido responsáveis pelas diferenças nas características de biometria testicular e, conseqüentemente, no IT.

O valor referido por KENNEY (1989), para garanhões quando aplicado para jumentos deve ser reconsiderado, de modo que se constata que o valor de 8,0 é muito alto para a espécie em questão, em que neste, apesar de valores de 7,45 de IT os animais apresentaram-se normais quanto à eficiência na produção espermática, manifestada pelo número de espermatozoides totais ( $10,3 \times 10^9 \pm 452,56$ ; 6,3 a  $12,5 \times 10^9$  espermatozoides) presentes no ejaculado dentro da faixa considerada normal para a espécie (KREUCHAUF, 1984; MORAIS, 1990, COSTA, 1991, GEBERS, 1995), e muito superior aos registrados para garanhões (KENNEY *et al.* 1983).

Os Jumentos mesmo apresentando IT menor possuem entre todos os animais domésticos a maior eficiência espermatogênica por grama de parênquima testicular (NEVES, 2001). Assim, novos experimentos com adequado período de avaliação devem ser conduzidos para ser possível estabelecer o valor ideal para reprodutores asinino doadores de sêmen.

Os valores registrados para o volume testicular encontram-se sumarizado na tabela 3. De acordo com a fórmula preconizada por EL WISHY (1974) para determinar o volume testicular de jumentos e garanhões, os valores médios observados para o volume testicular esquerdo (VTE) foi de  $155,51 \pm 14,45$  mL e o volume testicular direito (VTD) foi de  $149,34 \pm 14,92$  mm.

Nas comparações de VTE e VTD entre animais, não foram observadas diferenças para um mesmo animal ( $p < 0,05$ ). Ao considerar-se a fórmula preconizada pelo autor como correta e válida para asininos, a mensuração do volume testicular pode ser uma ferramenta útil na avaliação andrológica e na predição da produção espermática, uma vez que propicia dimensões globais do órgão e facilitaria a comparação entre animais, sob condições variadas de criação.

**Tabela 3:** Médias e Desvio Padrão (mm) do Índice Testicular e Volume Testicular Esquerdo e Direito, obtidos a partir de mensurações testiculares de seis reprodutores da raça Pêga.\*

Jumentos		Índice Testicular	Volume Testicular	Volume Testicular
categoria		(IT)	Esquerdo (VTE)	Direito (VTD)
J1	adulto	9,64	$174,39 \pm 1,35^a$	$158,94 \pm 1,35^a$
J2		5,94	$153,93 \pm 1,57^{bc}$	$130,03 \pm 1,70^{bc}$
J3		7,12	$167,09 \pm 1,64^{bcd}$	$134,44 \pm 2,71^{ace}$
J4	jovem	6,74	$138,61 \pm 1,19^{bcef}$	$154,44 \pm 1,19^{adfg}$
J5		6,79	$141,49 \pm 0,34^{bcefh}$	$175,06 \pm 0,00^{adphi}$
J6		7,75	$143,34 \pm 1,69^{bcefh}$	$139,98 \pm 1,60^{adegj}$
Total		7,45	$155,51 \pm 14,45$	$149,34 \pm 14,92$

\*Médias e Desvio Padrão seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ) para o Teste de Kruskal-Wallis. IT: índice testicular; VT; volume testicular.

MORAIS (1990) trabalhando com seis jumentos da raça Pêga registrou os valores de  $201,36 \pm 36,38$  mL e  $182,34 \pm 32,58$  mL para VTE e VTD. Ao realizar-se um cálculo aproximado, a partir de características de biometria testicular registrados por COSTA (1991) em 103 jumentos da raça Pêga, o VTE foi de 174,78 mL e o VTD de 181,49 mL e os valores obtidos para VTE e VTD a

partir dos dados mensurados por GEBERS (1995) foram de 184,51 e 181,15 mL, respectivamente. Sendo que as médias calculadas a partir dos dados dos dois últimos autores e dos valores de MORAIS (1990) foram superiores a este. Valores inferiores, 127,45 mL, ao que aqui se conseguiu e aos valores extrapolados para a raça Pêga foram diferentes aos registrados para a raça Nordestina (GASTAL, 1991).

Na comparação dos resultados das características de biometria testicular de jumentos da raça Pêga do presente experimento com demais raças, observa-se que os mesmos por serem animais de médio-grande porte dentro da espécie, apresentam características de biometria testicular superiores aquelas relatadas para jumentos da raça Nordestina por GASTAL (1991) e para animais mestiços de origem africana relatados por KREUCHAUF (1984).

O peso médio relatado pelos autores nestes dois experimentos foi de 162 kg e 150 kg, enquanto que esta pesquisa a média foi de 272 kg. Em uma comparação das características do presente experimento, com outros autores MORAIS, (1990) e GEBERS, (1995) que realizaram biometria testicular em jumentos da raça Pêga, observou-se diferença média de até 130 kg, o que pode ter explicado a inferioridade em quase todos os parâmetros de biometria testicular avaliados neste experimento em relação aos estudos com jumentos da raça Pêga, e a superioridade dos resultados do mesmo em relação aos demais, em que se utilizaram raça e animais de menor porte em relação ao jumento Pêga.

Os valores médios registrados para a largura do terço médio do funículo espermático direito e esquerdo encontram-se sumarizados na tabela 4. O valor médio da largura do terço médio do funículo espermático direito (FUND) foi  $25,35 \pm 3,38$  mm e de  $24,61 \pm 1,59$  mm para o funículo espermático esquerdo (FUNE), foram semelhantes ao valor preconizado como normal para garanhões por KENNEY *et al.* (1983).

**Tabela 4:** Médias e Desvio Padrão (mm) da Largura do terço médio do Funículo Espermático Direito e Esquerdo, de seis reprodutores da raça Pêga.\*

			<b>Funículo Espermático</b>	
<b>Jumentos</b>		<b>Direito</b>	<b>Esquerdo</b>	
<b>(categoria)</b>				
		<b>Geral</b>	<b>Geral</b>	
J1	adulto	30,80 ± 0,40 <sup>a</sup>	26,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	
J2		23,41 ± 0,50 <sup>bc</sup>	23,00 ± 0,00 <sup>bc</sup>	
J3		26,00 ± 0,00 <sup>bde</sup>	23,62 ± 0,49 <sup>bce</sup>	
Subtotal		27,52±2,92	24,49±1,32	
J4	jovem	23,85 ± 0,35 <sup>bcdg</sup>	26,00 ± 0,00 <sup>adfg</sup>	
J5		20,38 ± 0,49 <sup>bcdgi</sup>	22,00 ± 0,00 <sup>bcdhi</sup>	
J6		24,00 ± 0,00 <sup>bcdhj</sup>	26,00 ± 0,00 <sup>adfgj</sup>	
Subtotal		22,81±1,69	24,74±1,86	
<b>Total</b>		<b>25,35 ± 3,38</b>	<b>24,61 ± 1,59</b>	

\*Médias e Desvio Padrão seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) para o Teste de Kruskal-Wallis.

Não foi verificado estudos na literatura consultada envolvendo as dimensões do funículo espermático de jumentos, somente em ganhões por KENNEY *et al.* (1983).

Esta estrutura se faz de relevante, pois é por ela que são conduzidos os nutrientes ao testículo para que seja possível a realização da espermatogênese, o transporte de hormônio masculino e também no mecanismo de resfriamento do sangue arterial (THOMPSON, 1992).

NORONHA *et al.* (2001) realizaram estudo da morfologia do funículo espermático de jumentos da raça Pêga, registraram diferenças em relação a todas as demais espécies domésticas e silvestres estudadas, sendo caracterizado no estudo a presença de um tecido sub-capsular entremeado com tecido muscular que pode ser responsável pela facilitação do retorno

venoso do testículo e, conseqüentemente, maior eficiência no processo de drenagem, facilitando a espermatogênese.

Assim, esta cápsula corrobora com os achados de NEVES (2001), em que o autor registrou que a espécie asinina a que apresenta a maior eficiência na espermatogênese por grama testicular entre todos os animais domésticos.

Ao realizar-se a avaliação agrupada dos animais em jovens e adultos os valores para FUNE foram semelhantes, adultos 24,20 mm e jovens 24,66 mm para significância de 5%, em oposição ao órgão direito (FUND), em que foram observadas diferenças entre os grupos de adultos e jovens ( $p < 0,05$ ), sendo que o primeiro grupo apresentou valor superior 26,73 mm, contra 22,74 mm para segundo grupo, provavelmente por estarem em processo de desenvolvimento corporal e testicular.

Registrou-se no presente experimento correlação alta e positiva entre FUND e CTD ( $r^2 = 0,86$ ), enquanto que para os órgãos do lado esquerdo a correlação foi baixa. Sugere-se que a mensuração do funículo espermático seja incluída na avaliação andrológica de jumentos, pois pode ser um parâmetro auxiliar na interpretação dos resultados do exame andrológico.

## 5. CONCLUSÃO

Os jumentos deste estudo, mesmo com IT menor do que o proposto como normal para garanhões, apresentaram mais eficientes que animais da espécie eqüídea para a produção espermática, embora maior número de animais deva ser avaliado para que se possa estabelecer o IT normal para asininos.

O índice testicular precisa ser estabelecido e melhor estudado para reprodutores desta espécie criados nas condições brasileiras. O volume espermático associado ao IT pode ser usado como objeto auxiliar na estimativa da constatação de normalidade para testículos de jumentos.

A mensuração *in vivo* do funículo espermático pode ser uma nova variante na utilização do exame andrológico de jumentos, uma vez que apresenta altas correlações com IT, e de acordo com autores o jumento possui vantagens em relação aos demais, pois teria o retorno venoso testicular facilitado.

Os dados aqui descritos podem servir de valores de referência e como valores práticos frente à escassez de dados para a biometria do aparelho genital externo de jumentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ed. Belo Horizonte, MG, 1998. 54p.

COSTA, A.J.S.A. **Avaliação clínico andrológica do jumento da raça Pêga**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1991. 66p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Escola de Veterinária – UFMG, 1991.

EL WISHY, A.B. Testicular and epididymal sperm reserves in the ass (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*). **Z. Tierzuchig Zucstblol.**, v.91, p.344-44, 1974.

GASTAL, M.O.; HENRY, M.; BEKER, A.R.; GASTAL, E.L. Sexual behavior of donkey jacks: influence of ejaculatory frequency and season, **Theriogenology**, v.46, n.4, p.593-603, 1996.

GASTAL, M.M.F.O. **Estudo das características seminais e do comportamento sexual de jumentos**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1991. 105p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária - UFMG, 1991.

GEBAUER, M.R.; PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; SWIERSTRA, E.E. Reproductive physiology of the stallion: Daily sperm output and testicular measurements. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.165, n.8, p.711-13, 1974.

GEBERS, A. M. **Emissão diária de espermatozoides e algumas características reprodutivas de jumentos da raça Pêga**. Viçosa: Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1995. 90p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) DZO – UFV, 1995.

HAHN, J.; FOOTE, R.H.; SEIDEL, G.E. Testicular growth and related sperm output in dairy bulls, **Journal of Animal Science**, v.29, p. 41-47, 1969.

KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion**. Hastings: Journal Society Theriogenology, v.9, 1983.100p.

KREUCHAUF, A. Reproductive physiology in the jackass. **Animal Research Development**, v.20, p.51-78, 1984.

LOVE, C.C. Reproductive examination of stallion: evaluation of potential breeding soundness. In: YOUNGQUIST, R.S.; THREFALL, W. R. (Ed) **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. 2. ed.Saint Louis: Saunders-Elsevier, 2007, p.10-14.

MORAIS, R.N. **Contribuição ao estudo da biologia reprodutiva de jumentos (*Equus asinus*)**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, 1990. 105p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – FMVZ –USP, 1990.

NEVES, E.S.; GARCIA, H.C.; FRANÇA, L.R. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. **Biology of Reproduction**, v.67,p. 247-255, 2002.

NEVES, E. S. **Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogênico em jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus mulus mulus*)**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 135p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) ICB-UFMG, 2001.

MORAIS, R.N. **Contribuição ao estudo da biologia reprodutiva de jumentos (*Equus asinus*)**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, 1990. 105p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – FMVZ –USP, 1990.

NORONHA, P.B.; PEDUTTI-NETO, J.; BORELLI, V. Aspectos morfológicos do funículo espermático de jumentos (*Equus asinus* Linnaeus, 1758) da raça Pêga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.5, p.209-213, 2001.

NUNES, R. O jumento Pêga. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE EQUIDEOCULTURA, 1., 2007, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Departamento de Zootecnia-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. p. 33-39.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA–UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas – SAEG**. Versão 9.1. Viçosa, MG, 2007. 142p.

THOMPSON, D.L. Reproductive physiology of stallion and jack. In: EVANS, J.W. (Ed.) **World Animal Science: Horse Breeding and Management**. London: Elsevier, 1992, p. 237-257.

VARNER, D.; SCHUMACHER, J.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L. **Disease and Management of breeding stallions**. American Veterinary Publications,1991,349p.

### **III – CAPÍTULO**

## **PARÂMETROS SEMINAIS DE JUMENTOS REPRODUTORES DA RAÇA PÊGA**

## 1. INTRODUÇÃO

O maior interesse na criação de jumentos se dá na doação de sêmen para a produção de muares. O jumento Pêga é uma raça asinina valorizada no meio eqüestre por produzir excelentes animais marchadores em cruzamentos com éguas de raças puras e mestiças. Além disto, no Brasil existem diversos criatórios de asininos de elevado padrão genético, em que esse tipo de reprodutor é empregado para produção de asininos (NUNES, 2007). Desta maneira a avaliação reprodutiva do macho asinino é essencial, independente de qual maneira seja empregado na produção de eqüídeos.

O exame andrológico tem sido utilizado em todas as espécies de animais domésticas como indicador potencial da capacidade reprodutiva do macho (CBRA, 1998; LOVE, 2007), sendo a avaliação dos parâmetros seminais utilizada como ferramenta para a predição da qualidade seminal na avaliação andrológica e aplicação de biotecnologias ao sêmen na rotina dos haras, bem como em pesquisas.

A avaliação andrológica é uma importante ferramenta para auxiliar na melhoria da eficiência reprodutiva (KENNEY *et al.*, 1983; PIMENTEL, 1989, RICKETTS, 2005; LOVE, 2007). No Brasil, as normas e padrões da avaliação andrológica animal e do sêmen foram estabelecidos pelas Comissões sobre Andrologia organizada pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, sendo que a última de 1998 é a que permanece em vigência (CBRA, 1998).

Entretanto, o jumento não foi incluído nos padrões estabelecidos de avaliação do sêmen animal e, assim, experimentos e levantamentos de campo

devem ser realizados para se estabelecer os padrões normais de exame seminais para reprodutores asininos nas condições brasileiras.

Teve-se como objetivos neste estudo descrever os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen de jumentos reprodutores da raça Pêga.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Volume Seminal

Os eqüídeos e o varrão, dentre os reprodutores domésticos, são os que apresentam maiores volumes de ejaculados, sendo que em ordem crescente de volume do ejaculado estão o jumento, o garanhão e o varrão. O ejaculado destas espécies é formado por uma porção rica em espermatozóides e uma fração gelatinosa (NISHIKAWA, 1959; KREUCHAUF, 1984, DAVIES-MOREL, 1999, 2008; SENGER, 2003). A porção gelatinosa do ejaculado dos eqüídeos é produzida pela glândula vesicular (KREUCHAUF, 1984); no varrão a mesma fração é produzida pela glândula vesicular e pela glândula bulbo uretral (SENGER, 2003).

O volume do ejaculado em eqüídeos apresenta grande variação entre reprodutores e entre coletas de um mesmo reprodutor. A baixa repetibilidade desta característica está relacionada a muitos fatores tais como: raça, idade, particularidades individuais, freqüência de ejaculação, época do ano, duração do tempo de excitação, tipo de manequim, tempo de repouso sexual, alimentação, manejo, quantidade de trabalho na estação de monta, presença de gel, dentre outras (PICKETT *et al.*, 1970 e 1976; GEBAUER *et al.*, 1974; KENNEY *et al.*, 1983; PAPA, 1987; MORAIS, 1990, GASTAL, 1991, SAMPER, 2007).

Os valores para o volume do ejaculado sem a fração gelatinosa de jumentos apresentam amplitude de 10 a 180 ml, apresentando os valores mais

freqüentes, em torno de 40 a 100 ml (NISHIKAWA, 1959; KENNEY *et al.*, 1983; KREUCHAF, 1984, HENRY *et al.*, 1987; MORAIS, 1990, GASTAL, 1991, SANTOS, 1994).

Em asininos, segundo as observações feitas por NISHIKAWA (1959), KREUCHAUF (1984) e GEBERS (1995) a presença de gel, aparentemente, é uma característica individual dependente do jumento, época do ano, freqüência de coleta e excitação sexual, idade, além de diferenças raciais.

BERLINER *et al.* (1938) trabalhando com dois jumentos em uma central de reprodução de eqüídeos nos EUA observaram que quando aumentada a freqüência de coletas semanais de uma para duas, aumentava proporcionalmente a presença de gel no ejaculado. Este aumento da quantidade de gel, segundo NISHIKAWA (1959) se deve, provavelmente, pela maior excitação sexual provocada pela maior freqüência de coleta.

Contudo, o primeiro autor observou redução do volume de 18mL para 8 e 6 mL quando a freqüência de coleta semanal foi de uma, duas e três vezes por semana, respectivamente. ARRUDA *et al.* (1989a) obtiveram em 29 ejaculados de um reprodutor da raça Brasileira, volume sêmen livre de gel de  $46,6 \pm 10,0$  e somente um ejaculado apresentou gel no volume de 5 mL.

COSTA (1991) realizou apenas uma coleta de 103 jumentos da raça Pêga, andrologicamente normais, com idade 1.5 até acima de 12 anos em diferentes períodos de atividade reprodutiva, criados em diferentes regiões do estado de Minas Gerais e Bahia. O volume médio obtido foi de  $66.7 \pm 34.4$  mL, sendo que a porção gelatinosa esteve presente no ejaculado em apenas 13 animais e com um volume de  $28.1 \pm 20.4$  mL. Cabe ressaltar que as coletas foram feitas em reprodutores em diferentes estágios de atividade reprodutiva.

GEBERS (1995) avaliou 285 ejaculados de seis jumentos da raça Pêga e detectou a presença da fração gelatinosa em 90 ejaculados (90/285), e o volume médio de sêmen sem gel foi de  $98,35 \pm 44,24$  mL e de gel foi  $84,73 \pm 32,67$  mL. FERREIRA (1993) trabalhando com três jumentos da raça Pêga obteve médias de volume ejaculado sem gel de  $104,79 \pm 25,40$ ;  $63,25 \pm 24,84$  e  $67,04 \pm 17,87$  mL, respectivamente, sendo que o número de coletas não foi informado pela autora. Enquanto SANTOS (1994), trabalhando com 3 reprodutores da raça Pêga e três mestiços Pêga com a raça Nordestina, obteve

médias do volume do ejaculado sem gel de  $45,5 \pm 17,3$ ;  $54,5 \pm 18,5$ ;  $79,9 \pm 39,0$ ;  $66,8 \pm 11,6$ ;  $32,2 \pm 5,7$ ;  $9,2 \pm 17,9$  mL, respectivamente para cada um dos seis jumentos.

HENRY *et al.* (1987) utilizando três jumentos da raça Nordestina, realizando uma sessão de coleta semanal, com duas coletas com intervalo aproximado de uma hora, obtiveram volume médio de  $39,0 \text{ ml} \pm 22,2$  e  $40,9 \text{ ml} \pm 16,7$  para o primeiro ( $n=57$ ) e segundo ( $n=47$ ) ejaculado, não observando diferença no volume do ejaculado entre ordem de coleta.

ARRUDA *et al.* (1989b) analisando 85 ejaculados de um jumento da raça Brasileira, alojado em São Carlos, em três anos de avaliações, registraram valores médio de  $42,01 \pm 19,18$  mL para o volume total e a ocorrência de gel em 12,94% dos ejaculados com volume médio de  $7,45 \text{ ml} \pm 4,60$ .

Avaliando 230 ejaculados de 17 jumentos da raça Hamadan, pesando entre 209 e 256 kg, ZALCMAN (1940) *apud* BIELANSKI & WIERZBOWSKI (1962), obtiveram um volume médio de 54 mL por ejaculado.

NISHIKAWA (1959) considerando dados de 121 ejaculados de dois jumentos mestiços registrou volume de 10 a 80 ml, com volume médio de  $49,24 \text{ mL} \pm 14,30$ , e observou a influência da estação na quantidade da fração gelatinosa, com predomínio nos meses de julho a setembro. Já, MANN *et al.* (1963), avaliando 27 ejaculados de dois jumentos com idades de 10 e 12 anos, obtiveram volume médio de 55.6 mL, com amplitudes de 17 a 120 ml.

## **2.2. Motilidade e Vigor Espermático**

O percentual de motilidade espermática, particularmente a motilidade progressiva, é um bom indicativo de viabilidade espermática em eqüídeos (DAVIES MOREL, 1999, 2008). Apesar de não necessariamente ser um indicador da capacidade fecundante, a motilidade espermática, obrigatoriamente, deve estar presente para que o espermatozóide possa fecundar (VOSS *et al.*, 1981).

A avaliação dos parâmetros de motilidade e vigor espermático se mostram um método rápido, simples e de baixo custo das condições gerais da população espermática presentes no ejaculado. Contudo, é uma análise

subjetiva e sujeita a erros, e não necessariamente se constitui em um prognóstico seguro do potencial fecundante do animal.

Por outro lado, a avaliação objetiva computacional oferece vantagens sob o método subjetivo, uma vez que muitos parâmetros da cinética espermática são possíveis de serem avaliados como: velocidade de trajeto, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, amplitude lateral de cabeça, frequência de batimentos de cauda, retilinearidade, linearidade, velocidade rápida, deslocamento lateral de cabeça, entre outras avaliações (ARRUDA, 2000).

Porém, segundo VIDAMENT (2005) as únicas características que apresentaram correlações com fertilidade para sêmen de eqüídeos são a motilidade rápida e velocidade rápida. Portanto, apenas estas características são utilizadas na avaliação rotineira no Stud Nacional Francês, sendo que apenas o parâmetro motilidade rápida pode ser usado na seleção de ejaculados.

A avaliação convencional com microscopia de luz é mais rotineiramente utilizada na prática com reprodução de eqüídeos, uma vez que é acessível a todos os veterinários de campo e não requer condições especiais para sua realização. Outro aspecto favorável à utilização da avaliação subjetiva foi a alta correlação entre análise objetiva e subjetiva observadas por KOLIBIANAKIS *et al.* (1992). Estes autores, em estudo com 114 amostras de sêmen, observaram alta correlação ( $r=0.89$ ;  $P<0.001$ ) entre as avaliações feitas com a análise subjetiva e computacional.

A motilidade total para sêmen fresco de jumentos, segundo os diversos autores, é 70 a 100 % NISHIKAWA (1959); BIELANSKY & WIERZBOWSKI (1962); KREUCHAUF (1984); HENRY *et al.* (1987); ARRUDA *et al.* (1989); MORAIS (1990); COSTA (1991); GASTAL (1991); SANTOS (1994); GERBER (1995).

Apesar de a motilidade progressiva ser uma característica fisiológica das espécies eqüíneas (MAGISTRINI, 2000) poucos estudos feitos com jumentos, realizou a subdivisão das motilidades em total e progressiva, de modo que os estudos registraram uma variação média de 70 a 85 % de motilidade progressiva (HENRY *et al.*, 1987, MORAIS, 1990; GASTAL, 1991; COSTA,

1991; GERBERS, 1995). ARRUDA *et al.* (1989) obtiveram em 29 ejaculados de um reprodutor da raça brasileira, a motilidade progressiva média de  $75,5 \pm 7,8\%$ .

Dentre esses parâmetros avaliados, o vigor espermático constitui a avaliação da força e velocidade espermática de forma subjetiva; sendo que WALTON (1952) classificou o vigor espermático dentro de uma escala de avaliação subjetiva de 0 a 5, onde zero (vigor nulo) e 5 (vigor máximo).

MIES FILHO (1987) ressalta a importância da avaliação desta característica para sêmen de ruminantes. Para sêmen de eqüídeos, esta característica não tem sido utilizada com freqüência como parâmetro para avaliação de qualidade de sêmen (GERBERS, 1995). No entanto, PAPA (1987) atribui um alto grau de importância do vigor espermático na avaliação de sêmen de garanhões, principalmente para sêmen congelado.

O vigor espermático médio avaliado por HENRY *et al.* (1987), em jumentos Nordestinos, foi de 4,2 para a primeira e segunda coleta do dia. GASTAL (1991) trabalhando com animais da mesma raça e com duas coletas com intervalo de 4 horas, observou média de 3,8 e 4,2 para o primeiro e segundo ejaculado, respectivamente.

COSTA (1991) em suas avaliações com apenas uma coleta em 112 jumentos da raça Pêga, obteve um vigor médio de 3,8 e MORAIS (1990), com jumentos da mesma raça, obtiveram 4,2. FERREIRA (1993) registrou valores médios para vigor 3,92; 3,33 e 3,67 em três reprodutores da raça Pêga. Enquanto GERBER (1995) obteve valor médio para vigor de 4,8 com amplitude de 4.69 a 4.94, em seis jumentos da mesma raça.

Já SANTOS (1994) trabalhando com três jumentos da raça Pêga e três jumentos mestiços da raça Nordestina com a raça Pêga, obteve valores médios 4.3 a 5 para o vigor espermático.

### **2.3. Concentração Espermática e Número Total de Espermatozóides**

A concentração espermática é resultante da eficiência espermatogênica e a secreção de fluído pelas glândulas sexuais acessórias (KENNEY *et al.*, 1983; VARNER *et al.*, 1991).

Uma pesquisa conduzida com testículos de jumentos da raça Pêga, na quantificação da espermatogênese com técnica histológica, constatou que esses animais apresentam maior eficiência espermatogênica por grama de parênquima testicular entre todos os animais domésticos (NEVES *et al.*, 2002; 2003), concordando com os estudos feitos por EL WISHY (1974) que comparando testículos de jumentos e garanhões, registrou o dobro de espermatozoides em testículos de jumentos.

A concentração espermática média varia de 100 a  $800 \times 10^6$  espermatozoides por mL, jumentos geralmente apresentam maior concentração espermática em relação a garanhões (KREUCHAUF, 1984). Segundo o mesmo autor, em revisão sobre o assunto, comenta que a média de espermatozoides totais em um ejaculado de jumentos é de 20 a 30 bilhões e os extremos são de 2 a 44 bilhões de espermatozoides totais por ejaculado.

Os estudos realizados até o momento mostram-se controversos aos aspectos que tangem a influência da sazonalidade na produção espermática de asininos. KREUCHAUF (1984) não observou influências sazonais da produção espermática em jumentos para as condições da Alemanha, já NISHIKAWA (1959) observou fortes variações da concentração espermática e volume do ejaculado no Japão, assim como, GASTAL (1991) no Brasil, que registrou pequenas variações na concentração espermática. Provavelmente, outros fatores podem ter contribuído para a variação observada pelos autores em adição a variação da luminosidade, como temperatura e a nutrição principalmente.

#### **2.4. Morfologia Espermática**

A fertilidade do reprodutor pode ser avaliada por meio de métodos diretos como taxa de prenhes, taxa de prenhes por serviço, taxa de natalidade, fecundação competitiva, dentre outros. Entretanto, a estimativa da fertilidade potencial do reprodutor pode ser feita pela realização do exame andrológico (PIMENTEL, 1989).

Os primeiros trabalhos de investigação sobre patologia do sêmen em animais domésticos foram realizados em touros por WILLIAMS & SAVAGE (1925). LANGERLÖF em (1934) citados por OTT (1986) foi um dos primeiros a

demonstrar que o aumento das anormalidades espermáticas estava associado com decréscimo da fertilidade em touros e a estabelecer as bases do espermograma clínico, sendo que em eqüinos, o primeiro trabalho a envolver a morfologia espermática foi de WALTON & FAIR (1928).

NISHIKAWA *et al.* (1952 e 1959) desenvolveram estudos para realizar comparações entre as características da morfologia espermática entre garanhão e jumento. Estes autores observaram que os espermatozóides asininos se assemelham ao dos garanhões, entretanto, com a cauda mais longa e a cabeça ligeiramente de formato mais globoso, semelhante ao espermatozóide do touro e carneiro. Também verificaram a relação da morfologia espermática com a fertilidade de garanhões.

A morfologia espermática de eqüídeos apresenta similaridade com as demais espécies de mamíferos domésticos, porém, a cabeça do espermatozóide é assimétrica e a inserção abaxial da cauda é considerada normal, além de acrossomo relativamente pouco desenvolvido (BIELANSKY & KACZMARSKI, 1979; MAGISTRINI, 2000).

Há poucos relatos da ocorrência de sub-fertilidade ou mesmo infertilidade em decorrência de elevados índices de alterações na morfologia espermática em jumentos (MORAIS, 1990; GEBERS, 1995). CRESPILO *et al.* (2006) descreveram um caso clínico de um jumento mestiço, com histórico de infertilidade, associado com baixa motilidade e alta quantidade de alterações morfológicas, principalmente com gota citoplasmática proximal. Ao realizar a microscopia eletrônica de transmissão, confirmaram-se irregularidades de microtúbulos, que causou desarranjo no colo espermático e conseqüentemente gota citoplasmática proximal.

Tentativas ao longo dos anos foram feitas no intuito de quantificar as alterações morfológicas e estabelecer sua relação com a fertilidade nos animais, e a espécie com maior número de trabalhos desenvolvidos foi a bovina, devido ao grande interesse econômico.

BLOM (1950) propôs uma classificação dos defeitos espermáticos em primários e secundários. Na opinião do autor, as primeiras alterações seriam geradas durante a espermatogênese e a secundária durante a maturação. DOTT (1975) trabalhando com sêmen de garanhão acrescentou nesta

classificação anormalidades terciárias (artefato de técnica), ou seja, por danos induzidos ao espermatozóide durante a manipulação pós colheita.

RAO (1971) manuseando touros normais e com problemas clínicos reprodutivos, não conseguiu enquadrar as alterações morfológicas encontradas no sêmen destes touros na classificação de defeitos primários e secundários, o que levou a contestação da classificação feita por BLOM (1950).

BLOM (1973) refez sua classificação original e agrupou as alterações em defeitos maiores e defeitos menores, sendo que a alteração morfológica é classificada de acordo com seu potencial efeito sobre a fertilidade de touros.

NISHIKAWA (1959) na avaliação de sêmen de jumentos e de garanhão classificou as alterações morfológicas de acordo com seu local de alteração: cabeça, peça intermediária e cauda.

No Brasil, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), na avaliação andrológica de reprodutores de todas as espécies, a classificação das anormalidades espermáticas deve ser agrupada em defeitos maiores e defeitos menores, baseados na classificação de BLOM (1973). Seguindo esses critérios, KREUCHAUF (1984) registrou média de 7,46 e 4,7% de anomalias espermáticas em 204 amostras de sêmen de seis reprodutores asininos africanos.

Uma série de experimentos foram conduzidos usando o sistema de classificação em defeitos maiores e menores. HENRY *et al.* (1987), trabalhando com jumentos da raça Nordestina, obtiveram 9,1 e 6,3%, de anomalias espermáticas para o primeiro ejaculado e 5,3 e 6,0 % de anomalias espermáticas para o segundo ejaculado, para defeitos maiores e menores, respectivamente.

ARRUDA *et al.* (1989), com dados de apenas um reprodutor adulto da raça brasileira, verificaram 3,06% de defeitos maiores e 3,10 % de defeitos menores. MORAIS (1990) trabalhando com seis reprodutores da raça Pêga também adultos obteve na mesma ordem média de 8,55% e 7,04% de defeitos maiores e menores, em 85 amostras de sêmen.

Já GEBERS (1995), trabalhando com seis reprodutores da mesma raça, registrou 5,40% e 4,4 % de defeitos maiores e menores, respectivamente, em 288 amostras de sêmen. No entanto, os estudos relatados não correlacionaram

o percentual de alterações na morfologia espermática com a fertilidade para jumentos.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Animais

O presente experimento foi desenvolvido durante o período de setembro/2006 a janeiro/2007. Foram usados seis jumentos (J1; J2; J3; J4; J5; J6) com idades de 16, 15, 14, 3.5, 3.5, 3.5 anos, respectivamente, pesando  $272 \pm 34,97$  (231 – 326 kg), pertencentes ao Haras Tarumã localizado em Guaraciaba Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. Foram subdivididos em dois grupos: adultos (J1, J2 e J3) e jovens (J4, J5 e J6).

Os jumentos foram mantidos em baias de alvenaria individuais com cama de serragem, com livre acesso ao bebedouro, sal mineralizado comercial específico para eqüídeos (Equifós<sup>®</sup>, Matsuda, Alvares Machado, SP) além de feno de capim (*Cynodon dactylon* cv. Tifton 85), com acesso irrestrito durante todo o período do dia. Além disto, foram oferecidos 20 kg/animal de capim fresco picado (*Pennisetum purpureum* cv Elefante), divididos em dois tratos diários, sendo que pela manhã, antes do primeiro trato, foi fornecido diariamente a todos os reprodutores uma dose de 20 mL de um suplemento líquido poli-vitamínico e micro-minerais indicado para eqüídeos (Vitasil<sup>®</sup>, Vansil Industria, Descalvado, SP), de acordo com a recomendação do fabricante.

### **3.2. Avaliação seminal**

Previamente ao início, todos os animais foram submetidos a um criterioso exame andrológico de acordo com o preconizado por KENNEY *et al.* (1983), para exame de garanhões e todos foram classificados como aptos à reprodução.

Foram realizadas coletas de sêmen com vagina artificial modelo Botucatu (Biotech<sup>®</sup>, Botucatu, SP), utilizando égua em estro como manequim conforme descrito no capítulo I. A temperatura inicial de preenchimento da vagina foi de 53°C, sendo a pressão ajustada manualmente no preenchimento de acordo com as dimensões do pênis de cada reprodutor. Não foram permitidas atitudes de fugas por parte dos jumentos, apesar de ser considerado um comportamento típico dos asininos (HENRY *et al.*, 1998).

Realizou-se a filtragem e separação das frações do sêmen após coleta, e a seguir procedeu-se imediatamente a avaliação física do sêmen, segundo os critérios preconizados por KENNEY *et al.* (1983) e, para avaliação da morfologia espermática, utilizou-se o método de preparação em câmara úmida, onde o sêmen foi diluído em solução de formol salino tamponado de HANCOCK (1957) previamente aquecido a 37°C, para evitar artefatos de técnicas.

Foram contadas 200 células em microscópio contraste de fase em aumento de 1000x, com óleo de imersão, e a seguir arranjando os defeitos espermáticos em anomalias de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda, e posteriormente classificando os em: defeitos maiores e defeitos menores como preconizado por BLOM (1973) para sêmen de touros.

### **3.3. Análises estatísticas**

Para as análises empregou-se o programa estatístico SAEG 9,1 (SAEG –UFV, 2007). Para as variáveis qualitativas, efetuaram-se os testes de Lillinfors e Cochran e Bartlett para verificar a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias dos grupos, respectivamente.

Aqueles dados que não atenderam a premissa da ANOVA, foram submetidos à análise não paramétrica e as médias comparadas pelos testes de

Kruskal Wallis ou Wilcoxon com probabilidade de erro de 5%. As variáveis que atenderam a pelo menos uma premissa, foram submetidos à análise de variância por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores registrados para avaliação dos parâmetros físicos e morfológicos encontram-se sumarizados nas tabelas 1, 2, 3 e 4. A média do volume sêmen (VS) livre da fração gelatinosa, de todos os ejaculados foi de  $47,27 \pm 28,66$  mL (180 coletas).

O volume de gel no sêmen (VG) foi de  $71,75 \pm 54,80$  mL nas coletas em que essa fração foi detectável. A fração gelatinosa esteve presente em 30% das coletas (54/180 coletas), sendo que o jumento J1 foi responsável por 72,22% das coletas que apresentaram gel (39/54) e com um VG médio de  $90,00 \pm 51,79$  mL. O jumento J2 apresentou essa fração em sete das 17 coletas que foram realizadas com esse reprodutor, e o VG médio foi de  $37,42 \pm 34,12$  mL. O animal J3 apresentou essa fração somente em uma coleta (1/40 coletas), e o VG nesta coleta foi de apenas 5 mL. Para as coletas realizadas com os reprodutores J4 e J5, em nenhuma das coletas feitas no presente experimento, foi possível detectar a fração gelatinosa. J6 apresentou gel em 7 coletas de um total de 29, e o VG foi de  $14,00 \pm 54,80$  mL (Tabela 1).

O VS registrado no presente experimento foi de  $47,27 \pm 28,66$  mL, e esteve dentro da amplitude considerada normal para jumentos (NISHIKAWA, 1959, KREUCHAUF, 1984, HENRY *et al.*, 1987, MORAIS, 1990). No entanto, para comparações com os demais estudos, o VS absoluto talvez seja de menor valor, uma vez que a maioria dos relatos com sêmen de jumentos da raça Pêga empregou manejos diferentes do presente estudo, como coletas semanais (MORAIS, 1990); ou apenas uma coleta de sêmen (COSTA, 1991); ou intervalos de coletas diferentes (GEBERS, 1995).

O valor obtido no presente experimento foi inferior ao relatado por SANTOS (1994) para três jumentos Pêga (60 mL) e superior a jumentos mestiços da raça Nordestina relatados pelo mesmo autor. Da mesma forma, os valores relatados por GEBERS (1995) foram superiores ao presente experimento. Entretanto, o volume seminal é uma característica bastante variável no ejaculado de eqüídeos (RICKETTS, 2005), além disto, alguns garanhões têm tendência de sempre ejacular maiores volumes (KENNEY *et al.*, 1983), como foi o registrado no presente estudo (média de VS para J1  $84,62 \pm 28,07$  mL).

**Tabela 1:** Valores Médios e Desvios Padrão do Volume Seminal Discriminado nas Frações Gel e Fração Livre de Gel em 180 Coletas de Sêmen de Seis Jumentos reprodutores da Raça Pêga.

Jumentos (categoria)	Total de Coletas	Volume Sêmen (VS)	Coletas com presença de Gel	Volume Fração Gel (VG)
J1 adulto	40	$84,62 \pm 28,07^a$	39	$90,00 \pm 51,79^a$
J2	17	$43,88 \pm 19,06^{bc}$	7	$37,42 \pm 34,12^{bc}$
J3	40	$58,82 \pm 13,34^{ace}$	1	$5,00 \pm 0,00^{bde}$
Sub-total	97	$66,72 \pm 22,03$	47	$77,22 \pm 54,48$
J4 jovem	28	$21,75 \pm 6,28^{bdfg}$	ND**	ND**
J5	26	$28,99 \pm 13,05^{bcfgh}$	ND**	ND**
J6	29	$26,31 \pm 8,94^{bcfgh}$	7	$14,00 \pm 54,80^{bdf}$
Sub-total	83	$25,41 \pm 15,03$	7	$14,00 \pm 14,89$
<b>Total</b>	180	$47,27 \pm 28,66$	54	$71,75 \pm 54,80$

\*Diferenças entre letras na mesma coluna indicam diferenças estatística ( $P < 0,05$ ), para o Teste de Kruskal Wallis. VS: volume sêmen em mL, VG: volume gel em mL; \*\*ND: Não detectável.

O VS registrado foi semelhante ao relatado por HENRY *et al.* (1987) para jumentos da raça Nordestina (40 mL) e por ARRUDA *et al.* (1989) em 85 ejaculados de um jumento da raça Brasileira. Entretanto, o intervalo de coleta no presente experimento foi de 48 a 72 horas, enquanto que nos dois demais as coletas foram semanais. O valor observado foi inferior aos relatados por ZALCMAN (1940) citados por BIELANSKI & WIERBOWSKI (1962) para 17 jumentos da raça Hamadan (52mL, 230 coletas).

Entretanto, o número de jovens e adultos não foi informado, uma vez que deve ser levado em consideração, pois foi evidenciado neste estudo e por GEBERS (1995) que animais jovens apresentam menores VS em oposição aos adultos.

Foram registradas diferenças ( $P < 0,05$ ) para a característica volume de sêmen (VS) entre os grupos de jovens e adultos. Os primeiros apresentaram média de 25,62 mL, em contraste com a média de 62,84 mL dos adultos ( $P < 0,05$ ). Os jovens estavam em fase de desenvolvimento corporal e reprodutivo, assim as glândulas sexuais acessórias responsáveis pela maior fração do VS ainda não haviam atingido a maturidade e a alta capacidade de produção, como é característico de eqüídeos (KENNEY *et al.*, 1983; THOMPSON, 1992).

O baixo VS apresentado pelos jovens foi o responsável pelo baixo VS no presente estudo, pois estes animais contribuíram com 46,11% dos ejaculados (83/180). Outro aspecto a considerar é que não existem estudos envolvendo jumentos jovens, como há para garanhões (KENNEY *et al.*, 1983), para a determinação do número mais adequado de coletas semanais que podem ser realizadas sem que haja interferência nas reservas espermáticas extra-gonadais, bem como no comportamento sexual. Talvez o intervalo de coletas de 48 a 72 horas empregado neste tenha sido inadequado para a faixa de idade de 36 a 41 meses.

A presença de gel no ejaculado foi influenciada pela idade, uma vez que os adultos foram responsáveis por 87% (47/54) dos ejaculados com a presença de gel. Estes dados estão de acordo com GEBERS (1995), que ao agrupar os animais em jovens e adultos com idades semelhantes aos deste experimento constatou que os adultos foram responsáveis por 71,11% da presença do gel no ejaculado, contra apenas 28,89% para os jovens.

As diferenças observadas se dão em função da idade, a presença e volume gel, devem ser observadas com ressalvas, pois J3, pertencente ao grupo dos adultos, apresentou gel detectável em somente uma coleta (VS: 5 mL).

Talvez o número de animais não tenha sido suficiente, assim como no estudo conduzido por GEBERS (1995), para poder realizarem-se conclusões

sobre a presença de gel e sua relação com a idade. Entretanto, já foi relatado que a presença de gel no ejaculados de jumentos é uma característica individual (NISHIKAWA, 1959; KREUCHAUF, 1984). Ainda com relação à presença de gel no ejaculado, deve-se atentar ao fato que os animais J4 e J5 não apresentaram gel detectável em nenhuma das coletas, porém os dois animais eram jovens (36 meses ao início e 41 meses ao final das coletas).

Deve-se mencionar que J6 não apresentou a fração gelatinosa nas primeiras coletas da fase experimental, mas passou a apresentar nas últimas coletas. Especula-se que caso o período de coletas se estendesse por um período de tempo maior, talvez J4 e J5 poderiam passar a apresentar a fração gelatinosa no ejaculado como fez o animal J6.

Os parâmetros médios de motilidade total (MOTT), motilidade progressiva (MOTP) e vigor (VIG) obtidos para os seis reprodutores foram de  $84,22\% \pm 6,04$ ,  $74,47 \pm 7,06\%$  e de  $3,87 \pm 0,51$ , respectivamente.

Os parâmetros espermáticos de MOTT, MOTP e VIG em jumentos adultos se mostraram inferior ao grupo de jovens ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). As médias foram respectivamente para jovens e adultos para MOTT de  $82,31 \pm 6,73\%$  versus  $86,44 \pm 4,17$ ; de MOTP  $71,90 \pm 7,68 \%$  versus  $72,46 \pm 4,77\%$  para jovens, e o VIG de  $3,75 \pm 0,56$  versus  $4,17 \pm 0,31$  jovens. Estes resultados discordam de GEBERS (1995), que não registrou diferenças entre jovens e adultos, ainda com tendência numérica maior para adultos.

**Tabela 2:** Valores médios e desvios padrão da motilidade total (MOTT), da motilidade progressiva (MOTP) e do vigor espermático do sêmen fresco in natura em 180 Coletas de sêmen de seis jumentos reprodutores da raça Pêga\*

Jumentos (categoria)	Nº Coletas	MOTT*	MOTP*	VIG**	
J1	adulto	40	79,12 ± 4,92 <sup>a</sup>	69,12 ± 4,78 <sup>a</sup>	3,31 ± 0,24 <sup>a</sup>
J2		17	75,58 ± 5,83 <sup>ac</sup>	62,05 ± 6,65 <sup>ac</sup>	3,35 ± 0,23 <sup>a</sup>
J3		40	88,37 ± 2,37 <sup>bde</sup>	78,87 ± 2,65 <sup>bde</sup>	4,36 ± 0,22 <sup>b</sup>
Sub- total		97	82,31 ± 6,73	71,90±7,68	3,75±0,56
J4	jovem	28	88,03 ± 2,83 <sup>bdeg</sup>	80,35 ± 3,58 <sup>bdeg</sup>	4,33 ± 0,23 <sup>b</sup>
J5		26	87,69 ± 4,52 <sup>bdegi</sup>	77,88 ± 4,72 <sup>bdegi</sup>	4,32 ± 0,24 <sup>b</sup>
J6		29	83,79 ± 3,69 <sup>adfhj</sup>	74,31 ± 3,92 <sup>adphi</sup>	3,87 ± 0,21 <sup>c</sup>
Sub- total		83	86,44 ± 4,17	72,46±4,77	4,17±0,31
Total		180	84,22 ± 6,04	74,47 ± 7,06	3,87 ± 0,51

\*Diferenças entre letras na mesma coluna indicam diferenças ( $P < 0,05$ ), para o Teste de Kruskal-Wallis MOTT: motilidade total, MOTP: motilidade progressiva, \*\*VIG: vigor diferentes letras denotam diferenças estatísticas para o teste TUKEY com probabilidade de erro de 5%.

Os valores de MOTT e MOTP estiveram dentro dos valores considerados normais pelos autores NISHIKAWA (1959) HENRY *et al.* (1987), ARRUDA *et al.* (1989), MORAIS (1990) e COSTA (1991). Entretanto, os resultados foram inferiores aos relatados por GEBERS (1995) MOTT 95,27% e MOTP 91,25%, contudo, semelhantes aos registrados por MORAIS (1990) e COSTA (1991) também em estudos com jumentos da raça Pêga.

O VIG espermático médio registrado nesta pesquisa está de acordo com a faixa de valor de vigor espermático considerado normal para jumentos (HENRY *et al.*, 1987; ARRUDA *et al.*, 1989; MORAIS, 1990; COSTA, 1991). O VIG foi semelhante ao relatado por MORAIS (1990) e COSTA (1991), porém, inferiores aos relatados por GEBERS (1995). A presença de gel e o VG no ejaculado estiveram associados com decréscimo no VIG ( $r = - 0,60$ ), assim quanto maior o VG pior foi o VIG.

Para o presente sistema de intervalos de coletas de 48 a 72 horas, os valores médios totais de concentração espermática (CONC) foram de  $254,64 \pm 91,25 \times 10^6/\text{mL}$  e número total de espermatozoides (EET) de  $10,3 \pm 4525,26 \times 10^9$  de espermatozoides. Os adultos apresentaram menores CONC (TABELA 3), mas maior número de EET (Tabela 3) em relação aos jovens ( $P < 0,05$ ). A explicação mais adequada para isto é a de que os adultos já completaram o processo de desenvolvimento testicular, assim como a produção de líquido seminal pelas glândulas sexuais acessórias, em oposição aos jovens que se encontravam em fase de desenvolvimento somático e reprodutivo.

O valor da CONC obtido foi de  $254,64 \pm 91,251 \times 10^6$  espermatozoides/mL, semelhante e incluído na amplitude citada como normal pelos autores (HENRY *et al.*, 1987; ARRUDA *et al.*, 1989; MORAIS, 1990; COSTA, 1991; GEBERS, 1995).

Realizou-se coletas a cada 48 a 72 horas, já nos demais foram semanais. Nota-se tendência de estudos mais antigos envolvendo coleta de sêmen de jumentos, o emprego de intervalos semanais. Apesar dos intervalos de coletas terem sido mais curtos, o EET esteve incluso na amplitude considerada normal (MORAIS, 1990; COSTA, 1991; GEBERS, 1995).

**Tabela 3:** Valores médios e desvios padrão da concentração espermática ( $\times 10^6$  espermatozoides/mL) e do número de espermatozoides totais no ejaculado ( $\times 10^9$  espermatozoides) (valor sem correção de perdas no equipamento de coleta e gel) do sêmen fresco in natura em 180 coletas de sêmen de seis jumentos reprodutores da raça Pêga.\*

Jumentos (categoria).	Coletas	CONC ( $\times 10^6$ )		Espermatozoides Totais $\times 10^9$ /ejaculado**	
		Média Individual e grupo		Média Individual e grupo	
J1	adulto	40	151,50 $\pm$ 34,34 <sup>a</sup>	12,58	$\pm$ 5707,75
J2		17	144,23 $\pm$ 25,43 <sup>ac</sup>	6,17	$\pm$ 2276,366
J3		40	225,75 $\pm$ 17,44 <sup>bde</sup>	13,19	$\pm$ 2728,13
Sub- total		97	180,84 $\pm$ 4633761	11,71	$\pm$ 4877,418
J4	jovem	28	350,78 $\pm$ 46,53 <sup>bdfg</sup>	7,5	$\pm$ 1870,27
J5		26	333,60 $\pm$ 35,96 <sup>bdfgh</sup>	9,4	$\pm$ 4410,19
J6		29	340,62 $\pm$ 32,39 <sup>bdfgh</sup>	9	$\pm$ 3393,82
Sub- total			341,95 $\pm$ 3894723	8,52	$\pm$ 3517434
Total		180	254,64 $\pm$ 91,25	10,3	$\pm$ 4525, 26

\*Diferenças entre letras na mesma coluna indicam diferenças estatística ( $P < 0,05$ ), para o Teste de Kruskal-Wallis CONC: Concentração Espermática E.total: número de espermatozoides totais no ejaculado. \*\* Espermatozoides totais diferentes letras denotam diferenças estatísticas pelo teste de TUKEY ( $P < 0,05$ ).

Os valores registrados para alterações na morfologia espermática foram de  $7,97 \pm 3,02$  % defeitos maiores (DMA) e de  $6,80 \pm 1,59$ % para os defeitos menores (DME) (Tabela 4).

A classificação de BLOM (1973) em DMA e DME, mesmo para bovinos, espécie na qual ela foi inicialmente estabelecida, deve ser empregada com cautela, devendo ser empregada como um guia auxiliar e não como regra, uma vez que não foram desenvolvidos muitos estudos sobre os efeitos de uma alteração morfológica individual ou grupos, e sobre qual realmente seria seu potencial efeito na redução da fertilidade.

Além disso, raramente as alterações morfológicas ocorrem ao ponto de se poder estudar de forma individual e seus efeitos na fertilidade (KENNEY *et*

*al.*, 1983; BRITO, 2007). Entretanto, animais com maiores percentuais de anomalias espermáticas apresentam piores níveis de fertilidade ou até infertilidade (KENNEY *et al.*, 1983, FERNANDES & PIMENTEL, 2002; CRESPILOHO *et al.*, 2006).

Os defeitos espermáticos relatados para jumentos são escassos. ARRUDA *et al.* (1989) encontrou 3,06 e 3,1% de DMA e DME, respectivamente, em 85 coletas de um reprodutor da raça Brasileira, e GEBERS (1995) registrou 5,4% e 4,4% de DMA e DME, nesta ordem, para sêmen de jumentos Pêga, sendo que ambos os relatos foram ligeiramente inferiores ao registrado no presente estudo ( $7,97 \pm 3,02\%$  e  $6,80 \pm 1,59\%$  para DMA e DME, respectivamente).

Entretanto, os valores do presente experimento foram próximos ao relatado por HENRY *et al.* (1987) para a raça Nordestina (9,1% e 5,3% para DMA e DME, respectivamente), e inferiores aos relatados por MORAIS, (1990) para animais da raça Pêga.

**Tabela 4:** Valores médios e desvios padrão do percentual de alterações da morfologia espermática no sêmen fresco in natura (discriminada em Defeitos Maiores (DFA), Defeitos Menores (DFE) e Defeitos Espermáticos Totais (DFT)) em 180 coletas de sêmen de seis jumentos reprodutores da Raça Pêga.\*

Jumentos (categoria)	Coletas	Defeitos Espermáticos			
		Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Totais (%)	
		Individual	Individual	Individual	
J1	adulto	40	$11,20 \pm 2,05^a$	$06,86 \pm 0,54^a$	$18,06 \pm 2,37^a$
J2		17	$13,29 \pm 1,52^{ac}$	$10,29 \pm 1,61^{bc}$	$23,58 \pm 1,72^{ac}$
J3		40	$05,98 \pm 1,36^{bde}$	$05,70 \pm 1,08^{bde}$	$11,68 \pm 2,35^{bde}$
Sub-total		97	$9,41 \pm 3,42$	$6,98 \pm 1,94$	$16,40 \pm 4,96$
J4	jovem	28	$05,64 \pm 0,78^{bdeg}$	$07,10 \pm 0,58^{acfg}$	$12,75 \pm 0,95^{bdeg}$
J5		26	$07,28 \pm 0,47^{bdfhi}$	$06,63 \pm 1,62^{adegi}$	$13,92 \pm 1,59^{bdfgh}$
J6		29	$06,00 \pm 0,61^{bdegj}$	$06,03 \pm 0,44^{bdehi}$	$12,03 \pm 0,77^{bdegi}$
Sub-total		83	$6,28 \pm 0,94$	$6,58 \pm 1,08$	$12,86 \pm 1,37$
<b>Total</b>		180	$07,97 \pm 3,02$	$06,80 \pm 1,59$	$14,77 \pm 4,14$

\*Diferenças entre letras na mesma coluna indicam diferenças estatística ( $P < 0,05$ ), para o Teste de Kruskal Wallis Def. Maior: defeitos espermáticos maiores, Def. Menor: Defeitos espermáticos menores, Def. Totais: Defeitos espermáticos totais.

Jumentos jovens apresentaram os mais baixos percentuais de alterações na morfologia espermática ( $P < 0,05$ ). Outro aspecto que pode ter contribuído com a elevação dessas médias foram o animal J1 ( $11,20 \pm 2,05$  e  $06,86 \pm 0,54$  defeitos espermáticos maiores e menores, respectivamente) e J2 ( $13,29 \pm 1,52$  e  $10,29 \pm 1,61$  defeitos espermáticos maiores e menores, respectivamente). J1 e J2, naturalmente pela maior idade, têm tendência de apresentação de maiores percentuais de defeitos espermáticos.

## 5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente estudo pôde-se concluir que: os parâmetros espermáticos foram influenciados pela idade; a presença e o volume de gel no ejaculado se mostraram como características aparentemente com efeitos da idade, porém, individualmente, mais importante em relação à idade.

A concentração espermática foi maior nos animais mais jovens, o número de espermatozóides totais presentes no ejaculado foi maior no grupo de animais adultos; a patologia espermática apresentou valores mais baixos no grupo de animais jovens, os valores registrados para defeitos maiores e menores se encontraram próximo ao registrado em outros estudos.

Estes dados podem servir de referências para novos estudos, todavia, levantamentos de campo e novos estudos devem ser conduzidos envolvendo maior número de animais para que sejam construídos valores de referência para a espécie.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo, 2000. 120p. Tese (Tese de Livre Docência em Reprodução Animal) FMVZ – Universidade de São Paulo, 2000.

ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; BARBOSA, R.T.; MANZANO, A. Congelação do sêmen de jumentos: características reprodutivas de um doador. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, (Supl.1), p. 215-216, 1989.

BERLINER, V.R.; COWART, F.E.; MEANS, R.H.; WRIGHT, J.B. Artificial insemination of horses and jennets for horse, mule and jack-stock production. **American Society of Animal Production**. v.1, 233-237, 1938.

BIELANSKI, W.; KACZMARSKI, F. Morphology of spermatozoa in semen of stallions of normal fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**. (Suppl.27), p. 39-45, 1979.

BIELANSKI, W.; WIERZBOWSKI, S. Some properties of the output of semen of jacks. **Acta Biologica Cracov. Society. Zoology**, v.5, n. 1, p. 117-124, 1962.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**. v. 25, p.383-391, 1973.

BLOM, E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. **Fertility and Sterility**. v.1, n.3, p.223-228, 1950.

BRITO, L.F.C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v. 6, n. 4, p. 249 -264, 2007.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ed. Belo Horizonte, MG, 1998. 54p.

COSTA, A.J.S.A. **Avaliação clínico andrológica do jumento da raça Pêga**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1991. 66p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária - UFMG, 1991.

CRISPILHO, A.M.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. **Ciência Rural**, v.36. n.5, p.1507-1510, 2006.

DAVIES-MOREL, MCG. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management**. 3.ed. Oxfordshire: CAB International, 2008, 378p.

DAVIES-MOREL, MCG. **Equine Artificial Insemination**. 1. ed. Wallingford-Oxon: CAB International, 1999. 406p.

DOTT, H.M. Morphology of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p.41-46, 1975.

EL WISHY, A.B. Testicular and epididymal sperm reserves in the ass (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*). **Z. Tierzuchig Zucstblol.**, v.91, p.344-44, 1974.

FERNANDES, C.E.; PIMENTEL, C. A. Características seminais e fertilidade no em garanhões. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 829-834, 2002.

FERREIRA, M.F.L. **Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e a fertilidade do sêmen de jumento(Equus asinus)**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária –Universidade Federal de Minas Gerais, 1993. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária – UFMG, 1993.

GASTAL, M.M.F.O. **Estudo das características seminais e do comportamento sexual de jumentos**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1991. 105p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária - UFMG, 1991.

GEBAUER, M.R.; PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; SWIERSTRA, E.E. Reproductive physiology of the stallion: Daily sperm output and testicular measurements. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.165, n.8, p.711-13, 1974.

GEBERS, A. M. **Emissão diária de espermatozoides e algumas características reprodutivas de jumentos da raça Pêga**. Viçosa: Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1995. 90p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) DZO – UFV, 1995.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal Royal Microsc. Society**, v.76, p.84-97, 1957.

HENRY, M.; LODI, L.D.; GASTAL, M.M.F.O. Sexual behaviour of domesticated donkey (*Equus asinus*) breeding under controlled or free range management systems. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, p.263-276, 1998.

HENRY, M.; OLIVEIRA, M.M.F.; DIAZ, A.P.; GASTAL, E.L.; TOLENTINO, F.T. Características do sêmen de jumentos da raça Nordestina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1987, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p. 72.

KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion**. Hastings: Journal Society Theriogenology, v.9, 1983.100p.

KREUCHAUF, A. Reproductive physiology in the jackass. **Animal Research Development**. v.20, p.51-78, 1984.

LOVE, C.C. Reproductive examination of stallion: evaluation of potential breeding soundness. In: YOUNGQUIST, R.S.; THREFALL, W. R. (Ed) **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. 2. ed. Saint Louis: Saunders-Elsevier, 2007, p.10-14.

MAGISTRINI, M. Semen evaluation. In: SAMPER, J.C. (Ed.) **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 1ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000, p. 91-108.

MANN, T.; MINOTAKIS, C.S.; POLGE, C. Semen composition and metabolism in the stallion and jackass. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.5, p. 109-22, 1963.

MORAIS, R.N. **Contribuição ao estudo da biologia reprodutiva de jumentos (*Equus asinus*)**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, 1990. 105p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – FMVZ –USP, 1990.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial**. 6ed. Porto Alegre: Sulina, 1987, vol. I e II, 750p.

NEVES, E.S.; GARCIA, H.C.; FRANÇA, L.R. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. **Biology of Reproduction**, v.67,p. 247-255, 2002.

NEVES, E. S. **Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogênico em jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus mulus mulus*)**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 135p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - ICB – UFMG, 2001.

NISHIKAWA, Y. **Studies on reproduction in horses**. Tokyo: Japan Racing Assoc. 340p, 1959.

NISHIKAWA, Y . WAIDE, Y.; ONUMA, H. Studies on reproduction in asses. VII – Morphological studies of semen. Bull. Nat. Inst Agric. Sci. Ser. G.,1:47-52. **Animal Breeding Abstracts**, v.20n.1p.15, 1952.

NUNES, R. O jumento Pêga. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE EQUIDECULTURA, 1., 2007, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Departamento de Zootecnia- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. p. 33-39.

OTT, R.S. Breeding Soundness examination of bulls. In: MORROW, D.A. (Ed.) **Current therapy in Theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1986, p. 125-136.

PAPA, F.O. **Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de eqüinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial**. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista, 1987.150p. Tese (Tese Livre Docência em Reprodução Animal) – FMVZ- Universidade Estadual Paulista, 1987.

PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; SEIDEL, G.E.; BERNDTSONM W.; VOSS, J.L. Reproductive physiology and spermatozoal output. **Journal Animal Science**, v. 43,n.3, p.617-625, 1976.

PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; SUTHERLAND, TM. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. **Journal Animal Science**, v. 31,n.4,p.713-28, 1970.

PIMENTEL, C.A. Aspectos da Patologia Espermática e Fertilidade do Garanhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., 1989, Belo Horizonte. **Anais...**Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1989. p. 127-132.

RAO, A.R. **Changes in the morphology of sperm during their passage though the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis**. Stockholm: Royal Veterinary College of Stockholm, 1971. 79p. Thesis. Royal Veterinary College of Stockholm, 1971.

RICKETTS, S.W. Reproductive anatomy and physiology of the stallion. In: RICKETTS, S.W. (Ed.) **Equine Stud Farm Medicine**. 10. ed. British Equine Veterinary Association: Newmarket, 2005, p.125-134.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA–UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas – SAEG**. Versão 9.1. Viçosa, MG, 2007. 142p.

SANTOS, G.F. **Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre características físicas e morfológicas dos espermatozóides de jumentos (*Equus asinus*) preservados a 5°C**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. 82p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária – UFMG, 1994.

SAMPER, J.C. Reproductive system: evaluate of the breeding stallion. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE MEDICINA EQUINA, 1, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Equídeos, 2007. 1-18p.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**, 2. ed. Moscow: Current Concepts, 2003, 450 p.

THOMPSON, D.L. Reproductive physiology of stallion and jack. In: EVANS, J.W. (Ed.) **World Animal Science: Horse Breeding and Management**. London: Elsevier, 1992, p. 237-257.

WALTON, A. A flow orientation as a possible explanation of "wave motion" an "rheotaxis" of spermatozoa. **Journal Experimental Biology**, v. 29.p.520-531, 1952.

WALTON, A.; FAIR, K.K. Preliminary investigation on the fecundation of premium stallions. **Journal Agricultural Science**, v.18,p. 772-777, 1928.

WILLIAMS, N.; SAVAGE,A. Observations on the seminal micropathology of bulls. **Cornell Veterinary**, v.15 p. 342 - 353, 1925.

VARNER, D.; SCHUMACHER, J.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L. **Disease and Management of breeding stallions**. American Veterinary Publications, 1991,349p.

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

VOOS, J.L.; PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.178, p.287-289, 1981.

## **IV – CAPÍTULO**

### **CONGELAMENTO E FERTILIDADE DO SÊMEN DE JUMENTOS DA RAÇA PÊGA EM ÉGUAS INSEMINADAS PÓS-OVULAÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução se colocam como uma importante ferramenta a serviço da eqüideocultura mundial, como instrumento direto do melhoramento genético. Dadas as vantagens proporcionadas pela inseminação artificial (IA), esta talvez seja a biotecnologia com maior impacto na produção eqüídea, pois um reprodutor pode deixar centenas de descendentes ao longo de sua vida reprodutiva quando a IA é usada eficientemente.

Por muitas décadas, o desenvolvimento e utilização da IA nos eqüídeos, principalmente com sêmen congelado, esteve restrito devido a imposições por muitas associações de criadores que não permitiam a utilização da técnica (SAMPER, 2007).

Recentemente, as legislações das associações de criadores de eqüídeos em diversos países do mundo se tornaram mais flexíveis, permitindo o registro de produtos oriundos desta biotecnologia, fazendo com que houvesse um grande impacto na indústria eqüestre em todo o mundo, principalmente a dos USA (LOOMIS & SQUIRES, 2005; LOOMIS, 2006), da Europa (AURICH & AURICH, 2006) e do Brasil (PAPA *et al.*, 2005).

Em 2000, a Associação Americana do Cavalo Quarto de Milha e Associação Americana do Paint Horse passaram a permitir a utilização do congelamento de sêmen. As duas associações respondem como associação mundial destas duas raças que juntas possuíam naquele ano cerca 5,1 milhões de cavalos registrados pelo mundo, sendo que 300.000 éguas são cobertas a cada ano.

Isto fez com que o mercado do sêmen congelado se tornasse mais valorizado em todo o mundo e para todas as raças (LOOMIS & SQUIRES, 2005). No Brasil a Associação Brasileira de Criadores de Jumento Pêga, principal associação de criadores de asininos revisaram seus conceitos e passaram a permitir a utilização desta biotecnologia (NUNES, 2007).

O congelamento de sêmen teve seu início com a descoberta acidental das propriedades crioprotetoras do glicerol por pesquisadores ingleses da Universidade de Cambridge (POLGE *et al.*, 1949). A partir desta descoberta diversos protocolos de congelamento de diferentes tipos de células puderam ser desenvolvidos (CHENIER, 1999).

A comunicação do nascimento do primeiro potro proveniente de inseminação artificial com sêmen congelado foi 1956, por pesquisadores canadenses da Faculdade de Veterinária de Ontário (BARKER & GANDIER, 1957). Os autores obtiveram fluido do epidídimo rico em espermatozóides, de garanhões que haviam sido recém castrados.

Após o congelamento e descongelamento do sêmen, sete éguas foram inseminadas e uma veio a parir. Aparentemente os primeiros relatos na literatura envolvendo congelamento de sêmen em jumentos foram feitos por POLGE & MINOTAKIS (1963) e KRAUSE & GROVE, (1967).

Posteriormente, a estes relatos pouca tecnologia foi desenvolvida nas duas décadas subseqüentes. Grande parte disso foi devido a substituição da função de força motriz dos eqüídeos pelos veículos automotivos. No início da década de 70, houve um incremento no interesse por eqüídeos, foi então que pesquisadores europeus e japoneses intensificaram experimentos com sêmen congelado de eqüídeos (MERKT *et al.*, 1975; NISHIKAWA, 1972; TISCHNER, 1979; MARTIM *et al.*, 1979).

O trabalho da tese de doutorado do brasileiro José Costa Martim, na Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha ocidental, talvez tenha sido responsável pelo estudo de maior impacto na tecnologia de congelamento de sêmen de eqüídeos. Foi revolucionário no sentido de metodologia de envase, passando da técnica de pellet para macrotubos, sistema de controle folicular e principalmente desenvolvimento do clássico diluidor de congelamento glicose-gema EDTA (MARTIM *et al.*, 1979), e aparentemente

talvez seja até os dias atuais um dos mais utilizados em todo o mundo (KLUG, 1992; SAMPER & MORRIS, 1998; PICKETT *et al.*, 2001).

No Brasil, o congelamento de sêmen de eqüinos foi introduzido pelo professores Romildo Romualdo Weiss da Universidade Federal do Paraná, e Carlos Antonio Mondino Silva da Universidade Federal de Santa Maria, na década de 70, inicialmente nos estados do sul do Brasil e posteriormente São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (VIANNA, 2000).

Quanto ao congelamento de sêmen de jumentos os primeiros estudos conduzidos com a espécie no Brasil são de autoria do Dr. Rogério Viera e do Dr. Rubens Pães de Arruda (VIEIRA *et al.*, 1985, ARRUDA *et al.*, 1986 e 1989), experimentos esses conduzidos na Unidade de Pesquisa Pecuária Sudeste da Embrapa de São Carlos – São Paulo. Sendo que nestes trabalhos iniciais todos os pesquisadores utilizaram a metodologia alemã de congelamento, da Escola Superior de Veterinária de Hanover Alemanha.

Após os trabalhos iniciais de VIEIRA *et al.* (1985) e ARRUDA *et al.* (1986 e 1989), observa-se uma grande lacuna de trabalhos de pesquisa com congelamento de sêmen de jumentos no Brasil, a citar apenas o trabalho de SILVA (1995), PAPA *et al.* (1999) e OLIVEIRA (2005).

Contudo, o primeiro autor não realizou teste de fertilidade de campo, mas sim apenas avaliações laboratoriais, e os segundos autores inseminaram apenas três éguas. O último autor realizou criteriosa e sofisticada avaliação laboratorial, além de adequado número de 53 inseminações em jumentas, contudo apenas 10 éguas foram inseminadas para efeito de comparação com as primeiras.

Segundo VIDAMENT *et al.* (2008), há grande diferença na fertilidade do sêmen congelado de jumento quando utilizado na inseminação de éguas ou de jumentas. E de acordo com VIDAMENT (2005), em revisão dos resultados de 20 anos de congelamento de sêmen da França, concluiu que para uma correta avaliação de um estudo sobre congelamento sêmen, acredita ser o numero ideal de 100 ciclos por tratamento para adequado teste de fertilidade.

Aparentemente, o maior programa de inseminação artificial de eqüídeos com sêmen congelado de garanhões e jumentos, foi realizado no Norte da China, por PIAO e colaboradores (1988), onde os autores descrevem

inseminação de 89.176 éguas e jumentas sem discriminação do número exato entre cada uma das espécies, no período de 1982 a 1987, sendo que o diluidor utilizado foi a base de gema de ovo e glicerol.

Atualmente, a França e Alemanha são os dois países europeus que mais se destacam na utilização rotineira de sêmen congelado de eqüinos para animais de raças de hipismo clássico, principalmente a raça Sela Francesa e Hanoveriana, respectivamente. Os dois países possuem criteriosos programas de seleção de reprodutores por desempenho atlético associado com eficiência reprodutiva (KLUG, 1992; VIDAMENT, 2005; AURICH & AURICH, 2006; VIDAMENT *et al.*, 2008).

Na França, somente em 2004, 6900 éguas foram inseminadas com sêmen congelado sendo que 2200 éguas foram inseminadas com garanhões do Nacional Stud Francês e 4700 éguas com sêmen de garanhões da iniciativa privada (VIDAMENT, 2005).

De acordo com o autor neste país, na raça Sela Francesa, principal raça eqüestre da França, 35% de 7500 éguas, de propriedade privada se tornaram gestantes pelo uso de sêmen congelado. Mundialmente, os Estados Unidos da América é o país, onde a inseminação artificial com sêmen congelado é aplicado em maior número principalmente em animais da raça Quarto de Milha.

Contudo, o congelamento de sêmen em eqüídeos poderia estar sendo empregado em maior escala, como os bovinos, assim de acordo com CURRY (2000) somente 50% das células sobrevivem ao processo de congelamento, quando os indicadores de viabilidade foram motilidade e integridade de membrana, na concepção do autor essa seria uma das grandes razões pelo qual o congelamento de sêmen não vem sendo empregado em larga escala.

O mesmo autor em revisão comenta que existem inúmeras diferenças nos parâmetros biofísicos entre espécies animais, tais como superfície celular, volume celular, volume de água e permeabilidade de membrana a água. Assim os protocolos devem ser desenvolvidos de acordo com as características das espécies, e em asininos a maioria dos protocolos empregados para o congelamento advém de metodologias da espécie eqüina. Neste sentido experimentos com asininos devem ser realizados para que possa mais eficientemente realizada essa biotecnologia na espécie em questão.

Atualmente, no Brasil, o maior interesse no reprodutor jumento é como doador de sêmen para a produção de muares. Os muares são produtos bastante desejáveis no meio rural, pois reúne as melhores características destas duas espécies em um único animal (SANTOS, 1994). Pois são animais dotados de grande força e resistência física, além de alta rusticidade.

Características estas altamente desejáveis para o trabalho agropecuário em tração animal e, principalmente, em grandes fazendas de produção de bovinos de corte no Brasil Central. Observa-se na literatura falta de experimentos conduzidos com adequado delineamento experimental, envolvendo congelamento de sêmen de jumentos que utilize adequado número de inseminações em éguas.

Os objetivos deste experimento foram estudar alguns aspectos envolvidos na criopreservação do sêmen de jumentos, destacando-se: a) Comparar dois diluidores de congelamento de sêmen, tradicionalmente, empregados para outras espécies; b) Avaliar a fertilidade de éguas inseminadas pós-ovulação; c) avaliação do uso da coloração eosina-nigrosina e do HOST.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Inseminação artificial em eqüídeos

A inseminação artificial (IA) nos animais domésticos, supostamente, começou com os eqüídeos, quando em 1322 um chefe árabe determinou que seus empregados esfregassem um chumaço de algodão embebido em urina de uma égua em cio na narina de um garanhão de uma tribo rival, que por sua vez foi o suficiente para excitar o garanhão e induzir a ejaculação em um chumaço de algodão, que foi na seqüência posto no fundo da vagina de uma égua em cio, e deste acasalamento nasceu um grande campeão (AMANN & PICKETT, 1987, SQUIRES *et al.*, 1999).

Contudo, relatos científicos datam o seu primeiro uso pelo fisiologista italiano L. Spallanzani, no final do século XVII. Inicialmente, pesquisou o uso desta biotecnologia em cães e mais tarde em eqüinos, incluindo o estudo do efeito do congelamento sobre os espermatozóides. Já no século XIX, um professor da Universidade da Pensilvânia nos Estados Unidos, reportou o sucesso da utilização da IA em eqüinos (DAVIES MOREL, 1999).

Inicialmente, a IA foi empregada na França para resolver problemas de fertilidade. Após E.I. Ivanoff, chefe de um grande programa de inseminação artificial russo, observou que o resultado das inseminações artificiais, quando realizadas ou supervisionadas por ele, apresentava resultado superior ao da monta natural (31/39 – 71% versus 10/23 – 42%).

Após a Primeira Guerra Mundial, a Estação Experimental dirigida pelo referido veterinário inseminou 120.000 éguas. Deste modo, sequencialmente a IA em eqüídeos começou a se tornar popular em outros países. A China talvez seja o país com o maior programa de IA em eqüídeos, sendo que, aproximadamente, 600.000 éguas foram inseminadas apenas em 1959 (DAVIES MOREL, 1999) e cerca de 90.000 em anos posteriores (PIAO *et al.*, 1988).

BERLINER *et al.* (1938) descrevem um dos programas pioneiros comerciais para a produção de muares, eqüinos e asininos iniciado em 1936 no estado do Mississippi, Estados Unidos.

No Brasil, coincidentemente, a inseminação artificial também começou com eqüídeos, no sul do país, porém após este período inicial, a IA em eqüídeos experimentou severo declínio e desuso, devido grandemente às restrições impostas por muitas associações de criadores de cavalo e pela perda da utilidade como força motriz (MIES FILHO, 1987).

Atualmente, a IA é largamente usada no Brasil por quase todas as raças de eqüídeos, as exceções ficam para o Puro Sangue Inglês, que somente permite uso da monta natural. E a raça Crioula, em que se admite a inseminação artificial em condições especiais, quando o reprodutor se torne incapacitado (fisicamente) de realizar a monta e tenha sido campeão em prova de freio de ouro, e também a Mangalarga Marchador, a maior associação que apenas permite o uso de sêmen resfriado transportado e não do sêmen congelado.

Recentemente a ABCJPêga (Associação Brasileira de Criadores de Jumento Pêga), a mais importante associação de criadores de jumentos, passaram a permitir o uso da IA com em todas em todas as modalidades para a produção de muares e asininos.

A inseminação artificial conjuntamente em todas as suas modalidades (sêmen *in natura*, fresco, diluído, transportado ou congelado) oferece diversas vantagens em relação à monta natural, sendo as principais o melhoramento genético, sanitário e zootécnico.

Além destas, pode-se citar: a possibilidade de fracionamento do ejaculado do reprodutor, de acordo com a qualidade e concentração em várias

doses inseminantes; redução da dose inseminante para éguas/jumentas com resposta uterina exacerbada; maior utilização do sêmen de garanhões e jumentos geneticamente superiores para um maior número de éguas e ou jumentas; permite o armazenamento do sêmen congelado por período de tempo indeterminado; permite a estocagem de material genético de espécies e ou raças ameaçadas de extinção; permite o armazenamento de sêmen de determinadas linhagem de eqüídeos que podem ser utilizadas futuramente para correção de erros de acasalamentos, e assim a retomada de determinadas características favoráveis perdidas na seleção praticada anteriormente; tratamento do sêmen com antibióticos presentes no diluidor e utilização de técnicas de higiene no momento da colheita, do processamento e da inseminação que evitam a transmissão de doenças venéreas e a ocorrência de infecções uterinas; utilização de manequins para a coleta de sêmen, de forma a evitar acidentes com o reprodutor (ganhão e jumento) e com éguas ou jumentas valiosas; permite a produção de muares para jumentos não condicionados a monta natural em éguas; permite que jumentos não condicionados à monta natural em jumentas, mas condicionado em éguas possa ter seu sêmen coletado e empregado na IA em jumentas; permite contornar problemas de grandes distâncias entre reprodutores e fêmeas (jumentos de alto valor genético no sudeste pode ter o seu sêmen resfriado ou congelado, e transportado para os extremos norte e sul do país para produção de asininos e muares); prevenir o sobre - uso de reprodutores a monta natural; evita o stress do transporte de fêmeas (éguas/jumentas) sem/com o produto (potro, luar, asinino) até o reprodutor, minimizando com isso a disseminação de doenças infecciosas; contornar as dificuldades do uso da monta natural em éguas por jumentos não condicionados; a utilização de vagina artificial que possibilita a obtenção de sêmen de melhor qualidade, melhor acompanhamento da qualidade do sêmen após a colheita e descarte de ejaculados de má qualidade; e a utilização de diluidores seminais que tenham fatores protetores e nutritivos para as células espermáticas, que permitam melhorar a viabilidade do sêmen, e com isto a taxa de prenhes (BERLINER *et al.*, 1938; AMANN & PICKETT, 1987; CARVALHO, 1992; SILVA FILHO, 1994; WATSON, 1995; SQUIRES *et al.*, 1999; DAVIES MOREL, 1999, 2008; ROTA *et al.*, 2008).

Contudo, para o sucesso de um programa de inseminação artificial deve ser sempre associadas a ótimos níveis de manejo geral, nutricional e sanitário, mão-de-obra treinada (WATSON, 1995; DAVIES-MOREL, 2008). Os custos do equipamento necessários variam de acordo com a metodologia e modalidade empregadas.

Como fatores limitantes a inseminação artificial estaria a exigência de médico veterinário para a coleta e processamento do sêmen, custos com transporte e/ou estocagem de sêmen e riscos de acidentes dos técnicos envolvidos com o processo, diminuição da fertilidade do sêmen congelado (SQUIRES *et al.*, 1999), especialmente do sêmen de jumentos empregado na inseminação artificial em éguas porém principalmente em jumentas (VIDAMENT *et al.*, 2008). Porém, as vantagens obtidas com o uso da IA, certamente, superam as limitações (CARVALHO, 1992; SQUIRES *et al.*, 1999).

SILVA FILHO (1994), em um experimento sob condições controladas com animais da raça Campolina e Bretã, no Setor de Eqüideocultura DZO–UFV, comparou a IA com a monta natural, obtendo após 49 ciclos com IA e 25 ciclos com monta natural, taxa de prenhes de 78% e 84 %, sem diferenças estatísticas significativas entre os sistemas de cobertura. SQUIRES *et al.* (1999) também reportam a obtenção de melhores resultados com uso da inseminação artificial em relação a monta natural.

A IA pode ser realizada utilizando diferentes formas de processamento do sêmen: *in natura*; diluído; diluído e transportado; diluído, resfriado e transportado; e congelado. Cada uma das tecnologias de processamento apresenta vantagens, limitações e indicações (CARVALHO, 1992; DAVIES MOREL, 1999).

Quanto às técnicas de colheita de sêmen, a mais amplamente utilizada é a da Vagina Artificial (VA) fechada, podendo ainda, ser modificada, utilizando-se a técnica de VA aberta, cuja principal finalidade é a colheita fracionada de sêmen (TISCHNER, 1979).

Há vários tipos de VA fechada como: Hanover, Colorado, Botucatu, Nishikawa ou Japonesa, Missouri, entre outras, sendo que as mais utilizadas em todo território nacional são as do modelo alemão (Hanover), seguidas pelo modelo brasileiro (Botucatu).

Outra modalidade de colheita, utilizada em casos que o reprodutor apresenta incapacidade de monta ou disfunção comportamental, é com a utilização de fármacos (iminaprina e xilazina) indutores da ejaculação, em que razoável sucesso é obtido (MCDONNELL, 2001; SAMPER, 2007).

Quanto à metodologia de IA a ser empregada, diversos fatores devem ser considerados, uma vez que podem ser muitas as variáveis envolvidas no processo como: localização da(s) propriedade(s); momento inseminante (pré e/ou pós-ovulação); número total de espermatozoides; volume; diluidor; temperatura de armazenamento; características individuais de qualidade do sêmen do reprodutor; valor do sêmen; reposta inflamatória uterina da fêmea a ser inseminada; tipo de estro; momento da estação; raça (legislação), entre outros fatores (SILVA FILHO, 1994; VALLE *et al.*; 1999; BRINSKO *et al.*, 2000).

A utilização de sêmen fresco, diluído e resfriado, implica em maior flexibilidade de manejos de controle folicular, momento e local de deposição do sêmen. Em contrapartida, a utilização do sêmen congelado exige um manejo mais rígido, palpções retais mais freqüentes e quanto ao local de deposição, preferencialmente, o mais profundo no corno uterino ipsilateral a ovulação (SAMPER *et al.*, 2007; DAVIES-MOREL, 2008).

### **2.1.1. Sêmen *in natura*, diluído, resfriado transportado e congelado de eqüídeos**

O sêmen *in natura* deve ser colhido e utilizado, imediatamente, no próprio local. Tem como vantagens a economia do uso de diluidor. Contudo, a qualidade espermática não é preservada (KENNEY *et al.*, 1975), e os parâmetros de motilidade e vigor, diminuem rapidamente e o metabolismo espermático se mantém elevado; além de não permitir o resfriamento e a armazenagem.

O local de deposição do sêmen pode ser o corpo ou o corno uterino (SILVA FILHO, 1994), e o volume espermático deve ser de até 3 mL (XAVIER, 2006). O regime de inseminação mais recomendado é de inseminar a cada 48 horas, a partir da detecção de um folículo ovariano de 3,0 a 3,5 cm ou a partir do segundo dia da detecção do cio da égua (CARVALHO, 1992).

Trabalhos comparando a inseminação artificial com sêmen *in natura* e sêmen diluído fresco, utilizando éguas e garanhões de fertilidade normal, não encontraram diferenças entre diluição e não diluição (SILVA FILHO, 1994; VIANNA, 2000). SILVA FILHO (1994) comparou o efeito da inseminação com dose inseminante de 400 milhões de espermatozóides com movimento progressivo, em éguas da raça Mangalarga Marchador, com sêmen *in natura* e sêmen diluído em: leite desnatado-glicose, lactose-gema, e diluidor a base de glicina.

A taxa de concepção ao primeiro ciclo foi de 71,43%; 61,54%; 78,57% e 78,57%, respectivamente, não sendo observada diferença significativa entre o sêmen *in natura* e acrescidos de diluidores.

VIANNA (2000) utilizando a dose inseminante de 400 milhões de espermatozóides, comparou duas modalidades de inseminação em apenas um ciclo em éguas da raça Crioulo, com sêmen *in natura* (n = 160 éguas) e sêmen diluído (n = 142 éguas) com diluidor a base de lactose-gema de ovo, utilizou um esquema de inseminações a cada 36 horas a partir da detecção de um folículo com 3,0 e 3,5 cm com égua em estro, obtendo taxas de prenhes aos 15 dias de 80% e 78,9%, respectivamente, porém não houve diferenças estatísticas entre as técnicas.

BERLINER *et al.* (1938) descrevem um programa de inseminação artificial com uso de sêmen *in natura* para a produção de muares, eqüinos e asininos. Sendo que o sêmen de garanhões e jumentos foi colhido com vagina artificial modelo Mississippi, e imediatamente fracionado em doses de 2 bilhões de espermatozóides, e armazenado por um período de duas horas a temperatura ambiente em seringas, e a seguir empregado na inseminação artificial de éguas em jumentas. Neste pioneiro relato os autores relatam sucesso com a técnica.

O sêmen diluído tem como vantagens o tratamento antibiótico, diminuindo a proliferação bacteriana; diluição de fatores tóxicos presentes no plasma seminal; melhoria da fertilidade do sêmen devido ao aporte de nutrientes para espermatozóides contidos no diluidor; maior flexibilidade de inseminação, em que o sêmen após diluído e armazenado adequadamente, pode ser transportado em curtas distâncias sem necessidade de resfriamento, entre haras próximos e, se devidamente protegido dos raios solares permanece

conservado por até uma hora após a colheita, sem prejuízo a fertilidade; e há possibilidade do fracionamento para utilização em maior número de éguas, devido a expansão do volume diluidor mais o sêmen (CARVALHO, 1992; SQUIRES *et al.*, 1999).

Os diluidores utilizados para sêmen fresco e resfriado de eqüídeos são constituídos por água, tampões, substâncias não iônicas, açúcares, diferentes tipos de macromoléculas e antibióticos.

De maneira geral, os diluidores podem ser divididos em quatro grupos: salinos, acrescidos de gema de ovo, de leite e derivados, e os que apresentam albumina sérica bovina (AMANN & PICKETT, 1987; SILVA FILHO, 1994; MELLO *et al.*, 2000; BOETA).

Um bom diluidor ou extensor para sêmen de eqüídeos, segundo AMANN & PICKETT (1987) e SILVA FILHO (1994) deve proporcionar: pressão osmótica compatível com a célula espermática de acordo com a modalidade de processamento do sêmen; apropriado equilíbrio mineral; combinação adequada de nutrientes; capacidade de neutralizar catabólitos espermáticos; substâncias protetoras para as variações de temperatura, principalmente para o frio; capacidade de estabilização de membranas e sistemas enzimáticos; ausência de microorganismos patogênicos; apresentar baixo custo; fácil aquisição, baixa irritabilidade ao aparelho genital e não oferecer toxicidade ao espermatozóide.

Embora ainda não haja um diluidor ideal, capaz de oferecer alta longevidade espermática, alta taxa de sobrevivência espermática ao congelamento aliado a máxima fertilidade ainda esteja por ser formulado, um grande número de diluidores vem sendo testado ao longo de décadas com esse propósito (KENNEY *et al.*, 1975; MARTIM *et al.*, 1979; SILVA FILHO *et al.*, 1987; PIAO *et al.*, 1988; BURNS & BURNS, 1992; TRIMECHE *et al.*, 1997; BATELLIER *et al.*, 1997; PAPA *et al.*, 2002; PAPA *et al.*, 2005). A maioria dos extensores usados para sêmen de eqüídeos é a base de gema de ovo, leite ou seus produtos derivados (SILVA FILHO; 1994; SQUIRES *et al.*, 1999).

Os diluidores mais utilizados para sêmen de eqüídeos em todo o mundo, assim como no Brasil, são derivados de leite, além de outros diluidores a base de gema e soluções poli-íônicas em menor escala (CARVALHO, 1992; BOETA

& QUINTERO, 2000; VIDAMENT, 2005; VIDAMENT *et al.*, 2008; AURICH, 2008).

Existem diluidores derivados do meio de Kenney, com adição de diferentes tipos de constituintes como: antibióticos, açúcares, gema de ovo, aminoácidos, e outras substâncias com propriedades favoráveis ao sêmen, sendo que os tipos de diluidores variam de acordo com cada país (SAMPER, 2007; DAVIES-MOREL, 2008; AURICH, 2008).

Na França, um dos países que se destaca pela utilização da IA em eqüinos, o principal diluidor utilizado é a base de uma mistura de solução poli-iônica enriquecido com fosfoparacaseinato, fração derivada da caseína do leite, responsável por maior proteção do sêmen eqüino, esse diluente é denominado: INRA96 (BATELLIER *et al.*, 1997; VIDAMENT, 2005).

Os principais diluidores para sêmen de eqüídeos comercializados no Brasil são: EZ – Mixin<sup>®</sup> (CST); Botu-Crio<sup>®</sup>; Botu-Sêmen<sup>®</sup> e Botu-Turbo<sup>®</sup> (Biotech Botucatu, São Paulo, Brasil); FR1<sup>®</sup>, FR4<sup>®</sup>, FR5<sup>®</sup> e Equimix<sup>®</sup> (Nutricell, Campinas-São Paulo), sendo que quase todos possuem leite e/ou derivados em sua composição.

SILVA FILHO *et al.* (1987) adaptaram um diluidor a base de lactose e gema de ovo preconizado por NAGASE & NIWA (1964), tradicionalmente utilizado para o congelamento de sêmen de bovinos. Após a retirada do glicerol, utilizaram como diluidor de sêmen eqüino, para inseminação com sêmen fresco diluído e diluído e transportado. O referido extensor (lactose-gema) vem sendo utilizado no Brasil obtendo, resultados de fertilidade, equiparáveis ou superiores ao extensor de KENNEY *et al.* (1975) composto por leite desnatado-glicose e ao extensor glicina-gema, (CARVALHO, 1992; CARVALHO *et al.*, 1998; SILVA FILHO *et al.*, 1997; 1998; LIMA *et al.*, 2000).

Pesquisas conduzidas por SILVA FILHO *et al.* (1997), comparando sêmen de garanhões diluído (lactose-gema de ovo) e sêmen *in natura*, utilizados no próprio local da colheita ou após serem transportados (container MSP-1) avaliaram a fertilidade em 100 ciclos de 64 éguas da raça Mangalarga Marchador, e obtiveram melhores resultados com o sêmen diluído nas duas situações, transportado e não transportado.

Em condições reais de rotina de campo, WEISS *et al.* (2003) compararam sêmen de garanhões em éguas da raça Crioula, o efeito de inseminações com sêmen fresco diluído no extensor lactose-gema e sêmen *in natura*, através da inseminação de apenas um ciclo de 160 e 142 éguas, para os dois grupos respectivamente, e encontram taxas de fertilidade semelhantes.

Em outro trabalho, SILVA FILHO (1994) comparou as técnicas de IA utilizando sêmen fresco: *in natura* e diluído, com os seguintes meio diluidores: 1) leite em pó desnatado-glicose, 2) lactose-gema e 3) glicina-gema. Para isso, utilizou 42 éguas mestiças (Bretã x Campolina), em 64 ciclos, contudo, não obteve diferenças entre os tratamentos com diluidores e com sêmen *in natura*. Porém, houve uma tendência numérica de melhores resultados para o extensor lactose-gema.

Em outro experimento conduzido em condições reais de campo, CARVALHO (1992) comparou o efeito da inseminação artificial com sêmen a fresco de garanhões Mangalarga Marchador diluído em leite desnatado-glicose, e com sêmen diluído em lactose-gema, transportados a 15-20°C. Para isso, realizou a IA em 79 éguas e potras da mesma raça, obtendo ao final, taxas de concepção semelhantes entre os diluidores.

SILVA FILHO *et al.* (1998) compararam a inseminação artificial em 105 ciclos de 62 éguas da raça Mangalarga Marchador, com sêmen de garanhão da mesma raça diluído e transportado a 20 °C no container MSP-2, e para isso utilizaram dois tipos de diluidores: glicina-gema e lactose-gema. Após as análises de eficiência por prenhes e taxas de gestação, os resultados se mostraram muito semelhantes.

A refrigeração do sêmen pode ser feita em sistemas de resfriamento ativo ou passivo. O primeiro, apresenta curva de decréscimo da temperatura padronizada e não sofre influência da temperatura ambiente, mas não possui aplicabilidade econômica e prática para utilização rotineira no campo (DAVIES-MOREL, 1999; VALLE *et al.*, 1999; RAPHAEL, 2007).

O Brasil é o segundo país no mundo que mais utiliza transporte de sêmen de eqüídeos, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (PAPA *et al.*, 2005). Os sistemas mais utilizados no país e no mundo são de sistemas de

refrigeração e resfriamento passivos, que são realizados em caixas térmicas (container) (SILVA FILHO, 1994).

No Brasil, provavelmente, os primeiros experimentos sobre transporte e refrigeração de sêmen eqüino foram conduzidos por SILVA FILHO *et al.* (1987), onde os autores desenvolveram um container denominado MSP-1, e realizaram a comparação entre sêmen fresco diluído e sêmen fresco diluído e transportado, obtendo taxas de prenhes semelhantes.

As características de um bom container para transporte de sêmen de eqüídeos devem seguir algumas características como: completo isolamento do ambiente; baixo custo; ser inocuidade aos espermatozóides; manutenção da temperatura para o período proposto; permitir a realização de curva de resfriamento lento; aceitabilidade pelos sistemas de transporte aéreo e terrestre; seguro contra violações; entre outras situações adversas (SILVA FILHO, 1994; PALHARES, 1997; BRINSKO *et al.*, 2000).

O declínio da temperatura do sêmen diluído é feito em sistemas de resfriamento passivo, em que é mantido em caixa isotérmica, próximo a uma fonte de frio como o gelo biológico reciclável, que de acordo com o sistema deixará o sêmen resfriado e entre 15 a 20 °C, ou refrigerado a 4 a 6° C (CARVALHO, 1992).

A redução da temperatura auxilia na conservação do sêmen por diminuição do crescimento bacteriano, redução do metabolismo espermático e conseqüente controle da acidificação do meio diluidor, além da diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio, principalmente quando associados baixas temperaturas com redução de oxigênio, favorecendo o metabolismo espermático anaeróbico e não aeróbico (KATILA, 1997; SQUIRES *et al.*, 1999; AURICH, 2008).

Após a diluição, o sêmen pode ser transportado, resfriado ou refrigerado e utilizado em períodos que variam de 1 a 48 horas de acordo com a temperatura final de armazenamento (5°C ou 15 a 20°C) (CARVALHO, 1992; SQUIRES *et al.*, 1999; BOETA & QUINTERO 2000; MELLO *et al.* 2000; AURICH, 2008).

A utilização da temperatura como conservante do sêmen tem sido rotineiramente aplicado na indústria eqüestre (RAPHAEL, 2007; AURICH,

2008). O declínio de 10°C na temperatura do sêmen causa redução de 50 % do metabolismo, sendo que a 5°C, apenas 10% do metabolismo espermático é necessário para que as células se mantenham viáveis (SQUIRES *et al.*, 1999).

As taxas ideais de resfriamento do sêmen eqüino foram demonstradas por VARNER *et al.* (1988), em que os autores observaram que as taxas de resfriamento podem afetar a capacidade de retenção da motilidade. A faixa de temperatura que o espermatozóide eqüino é mais sensível foi demonstrada por KAYSER *et al.* (1992), que observaram que de 37°C a 20°C, o sêmen pode ser resfriado rapidamente sem efeitos adversos para a motilidade, contudo, na faixa de 20°C a 5°C, observaram maior sensibilidade da célula espermática eqüina aos danos induzidos pelo resfriamento, e um resfriamento de - 0,05 °C a - 0,1°C pode maximizar a motilidade. Já MORAN *et al.* (1992) concluíram que a partir de 19°C até 8°C, houve maior sensibilidade da célula espermática eqüina, e que a partir de 8°C até 5°C o resfriamento poderia ser feito rapidamente.

Na faixa de maior sensibilidade, o sêmen deve ser resfriado a uma taxa de -0,05°C / minuto para que haja menores danos induzidos pelo frio (SQUIRES *et al.*, 1999). Existem diversas caixas comercializadas no Brasil, nacionais e importadas, que mantêm a temperatura a 5° C ou entre 15 a 20°C. De modo geral, o sêmen mantido a 5°C, pode ser utilizado por até 48 horas (WATSON, 1995; BOETA & QUINTERO, 2000). Contudo, o pico de fertilidade ocorre entre 24 e 36 horas após a colheita. O sêmen mantido entre 15 e 20°C deve ser utilizado de preferência nas próximas 12 horas após a colheita, e caso seja necessário de se utilizar por 24 horas recomenda-se trocar a fonte de gelo reciclável 12 horas após a colheita.

O transporte do sêmen deve ser feito nas mesmas caixas utilizadas para o resfriamento ou refrigeração, com o cuidado adicional de mantê-las em locais em que as variações de temperatura ambiente não possam intervir na curva de resfriamento do sêmen no interior da caixa, e na conservação do sêmen.

De acordo com o tipo de material que a caixa foi feita, a temperatura ambiente causará maior ou menor variação na temperatura interna, e esses cuidados devem ser considerados na escolha da caixa de transporte, além do custo do equipamento.

Existem inúmeros modelos de caixa de transporte de sêmen, dentre os nacionais destacam-se o Botu-Box<sup>®</sup>; Botutainer<sup>®</sup>; Max Sêmen Express<sup>®</sup>; MSP-1 (UFV); MSP -2 (UFMG); Celle modificado; e os modelos internacionais de containeres de transporte de sêmen eqüídeos: Equitainer I<sup>®</sup> e II<sup>®</sup>; Expecta Foal<sup>®</sup>; Bio Flite<sup>®</sup>; Lane STS<sup>®</sup>; Equine Express<sup>®</sup>; Foal Flight<sup>®</sup>; Celle<sup>®</sup>; Sarstedt<sup>®</sup>; Salsbro Box<sup>®</sup> (SILVA FILHO, 1994; RAPHAEL, 2007; PALHARES, 1997; VALLE *et al.*, 1999; BOETA & QUINTERO, 2000; DAVIES-MOREL, 2008).

CARVALHO (1992), em trabalho realizado em dois haras (distantes 15 km), com animais da raça Mangalarga Marchador, no Estado de Minas Gerais, comparou a inseminação artificial no haras I com sêmen diluído no diluente de mínima contaminação (KENNEY *et al.*, 1975), contra a inseminação no haras II, com sêmen diluído em lactose-gema de ovo, e em seguida transportado resfriado a 20°C do haras I para o haras II. As taxas de prenhes foram 71,05% (27/38) e 68,29% (28/41), respectivamente, ao primeiro ciclo, não sendo observadas diferenças quanto às taxas de prenhes, entre os dois sistemas.

Em estudo com aplicação comercial do sêmen asinino no México, BOETA & QUINTERO (2000) realizaram a comparação do meio diluidor de KENNEY *et al.* (1975) e leite desnatado ultra-pasteurizado para sêmen resfriado a 5°C de um jumento da raça Kentucky em Equitainer<sup>®</sup>. Para isso foram inseminadas éguas no período pré-ovulatório, com 400 milhões de espermatozóides com movimento progressivo armazenado por até 48 horas, sendo que 11 éguas foram alocadas com o meio diluidor de Kenney e 17 éguas com o leite ultra-pasteurizado.

Os resultados de fertilidade aos 15 dias foi de 54,5% e 76,5% para o meio de Kenney e leite ultra-pasteurizado em ordem. Os autores concluíram que o leite ultra-pasteurizado pode ser empregado comercialmente na refrigeração de sêmen de jumentos a 5°C por até 48 horas, para a inseminação artificial de éguas.

Como regra geral, deve-se respeitar às taxas de diluição, com faixa de valor ideal de diluição de 25 milhões de espermatozóides/mL. VARNER *et al.* (1987) demonstraram que os resultados contendo concentrações de 25 milhões de espermatozóides/mL foram superiores aos com 50 milhões ou 100 milhões, para sêmen refrigerado a 5°C, e estocado por 24 horas.

Entretanto, a diluição pode ser de 50 milhões ou 100 milhões de espermatozóide/mL, pode ser utilizada quando boa parte do plasma seminal for removido por centrifugação e quando o sêmen for estocado nas mesmas condições anteriores, sendo que os valores permitidos podem ser de até 100 milhões de espermatozoides / mL, dependendo do tempo e temperatura de transporte (JASKO *et al.*, 1992).

Nem todos os reprodutores eqüídeos possuem sêmen com características adequadas ao resfriamento, pois alguns podem apresentar baixa fertilidade e motilidade espermática progressiva após o procedimento (AURICH, 2008), embora não tem sido reportado na literatura estudo envolvendo sêmen de jumentos, e sua habilidade em refrigeração bem como congelamento.

Neste sentido, uma alternativa foi proposta para sêmen de garanhões por BRINSKO *et al.*, (2000) que antes do resfriamento e estocagem, submeteram o sêmen diluído no diluente E-ZMix<sup>®</sup> (Universidade do Colorado), à taxas leves de centrifugação, com a finalidade de remover 90% do plasma seminal.

Os autores observaram melhorias nas características de motilidade espermática, especialmente para o sêmen de garanhões previamente classificados como produtores de sêmen de “pobre capacidade de resfriamento”, principalmente a partir de 24 horas de estocagem no Equitainer<sup>®</sup>, com motilidade progressiva inferior a 30%.

Já RAPHAEL (2007) realizou centrifugação leve, do sêmen diluído em extensor a base de leite desnatado, refrigerou á 5°C por 72 horas, e realizou diversas avaliações entre os períodos, tais como: características de motilidade, integridade de membrana e funcionalidade mitocondrial.

Neste estudo, houve um aumento da preservação da funcionalidade mitocondrial, porém, não houve diferenças de motilidade e integridade de membranas. Entretanto, observou-se ainda, diferenças intrínsecas aos garanhões. As diferenças entre este e o trabalho de BRINSKO *et al.* (2000) foi que os garanhões haviam sido selecionados e divididos quanto à qualidade de resfriamento do sêmen.

De acordo com BRINSKO (2006) o número de espermatozoides com movimento progressivo contidos por dose inseminante varia na maioria dos trabalhos de 250 a 500 milhões, sendo que o valor do limite superior mais comumente utilizado em todo o mundo é baseado em trabalhos de pesquisadores do Colorado.

No Brasil, em experimento conduzido por BRANDÃO *et al.* (2003), compararam duas diferentes doses inseminantes (200 e 400 milhões de espermatozoides com movimento progressivo/dose) de sêmen fresco diluído em meio de leite desnatado (KENNEY *et al.*, 1975). Para isso utilizaram um ciclo de 31 éguas mestiças em cada grupo, onde se realizou inseminações a partir da detecção de um folículo de 3,0 a 3,5 cm de diâmetro com égua as fêmeas em estro, as inseminações foram realizadas apenas às segundas, quartas e sextas-feiras, de acordo com metodologia proposta por SATURNINO *et al.* (2002), utilizando o sêmen de um mesmo garanhão da raça Brasileiro de Hipismo de fertilidade normal, o volume inseminante foi ajustado para 10 mL com o diluente. As taxas de prenhes ao primeiro ciclo foram de 66,7% e 65,5%, para as dose de 200 e 400 milhões de espermatozoides, respectivamente. Porém, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

XAVIER (2006) comparou o efeito do volume (3 e 15 mL) de sêmen diluído no meio de mínima contaminação (KENNEY *et al.*, 1975), dose inseminante (100 e 500 milhões de espermatozoides com movimentos progressivos/dose) e local de deposição do sêmen (intra-cornual profundo - ipsilateral a ovulação e intra-cornual uterino, para as doses de menor e maior concentração, respectivamente). Para isso, utilizou o mesmo esquema de cobrições proposto por SATURNINO *et al.* (2002) às segundas, quartas e sextas-feiras, utilizou-se 37 éguas mestiças (idade de 4 a 20 anos), por 72 ciclos.

As inseminações foram realizadas pré e pós-ovulação de acordo o modelo proposto. Concluiu-se que as inseminações pré e pós-ovulação, independente do intervalo de 48 ou 72 horas, apresentaram melhor eficiência de prenhez, independente da dose, volume inseminante e local de deposição.

Utilizando 92 fêmeas da raça Mangalarga Marchador, CARVALHO *et al.* (1998), compararam diferentes doses inseminantes (<250; 250 a 350 e >350 milhões espermatozoides com motilidade progressiva), com sêmen diluído no

meio extensor lactose-gema e transportado por um curto período de tempo (2 horas) a 20°C, em um container denominado MSP-2, Entretanto, não observaram diferenças estatísticas entre as doses inseminantes, com tendência numérica inferior para dose com maior número de células espermáticas.

LIMA *et al.* (2000) analisaram dados de eficiência reprodutiva em dois haras da raça Mangalarga Marchador no estado de Minas Gerais, de 125 fêmeas eqüinas de diferentes categorias reprodutivas e idades. As inseminações foram realizadas, com sêmen diluído em lactose-gema de ovo transportado no container MSP-2 a 20°C, com a mesma dose inseminante. De acordo com o comprimento do ciclo, as éguas foram inseminadas com uma IA/ciclo, duas/IA ciclos ou três mais IA por ciclo. Contudo não houve efeito do número de inseminações por ciclo nas taxas finais de gestação.

FÜRST (2006) em estudo conduzido com sêmen congelado no meio de MARTIM *et al.* (1979) para garanhões da raça Mangalarga Marchador e Bretão. Não registraram diferenças estatisticamente significativas entre as doses de 150 e 300 milhões de espermatozóides com movimento progressivo, para éguas Mangalarga Marchador e mestiças Bretão inseminadas até seis horas após a ovulação.

Não são encontrados na literatura estudos avaliando diferentes doses inseminantes para o sêmen de jumentos, independente para o emprego em éguas, jumentas, e para o sêmen congelado ou resfriado, ou *in natura*. Os estudos reportados na literatura apenas empregam a fixa dose inseminante, que varia de 300 a 600 milhões de espermatozóides (TRIMECHE *et al.*, 1996; BOETA & QUINTERO, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006; VIDAMENT *et al.*, 2008).

## **2.2. Congelamento de sêmen de eqüídeos**

A sobrevivência espermática ao processo de congelamento é resultante de uma equação multifatorial de natureza complexa, determinada por diversos fatores. Entre os principais a serem considerados são os vários compartimentos do espermatozóide como membrana plasmática, acrossomo, mitocôndrias, citoesqueleto, núcleo e glicocálix, sendo que cada compartimento

espermático responderá de modo diferente aos procedimentos físico-químicos inerentes as metodologias de congelamento (GRAHAM, 1996, HOLT, 2000).

Outros fatores que influenciam de modo direto ao sucesso do congelamento são: o meio diluidor (como a constituição e propriedades físicas e químicas); taxa de resfriamento, taxa de congelamento, taxa de descongelamento, (GRAHAM, 1996), diferenças entre as espécies (HOLT, 2001; VIDAMENT *et al.*, 2008), diferenças entre raças (GOMES *et al.*, 2002), variações ao longo do ano (AMANN & PICKETT, 1987; VARNER *et al.*, 1991); e entre animais e ejaculados (AMANN & PICKETT, 1987; HAMMERSTED *et al.*, 1990; FÜRST, 2006).

Além disso, existem interações entre estes fatores citados, que apresentam elevada associação e que podem interferir no resultado final como, por exemplo, a taxa de resfriamento e congelamento estão relacionadas com a taxa de descongelamento (SQUIRES *et al.*, 1999).

O congelamento de sêmen não tem sido largamente empregado na produção animal em todas as espécies com exceção da espécie bovina, não somente pelas restrições impostas pelas associações de criadores, mas, em grande parte se deve as baixas taxas de concepção obtidas com sêmen congelado (HOLT, 2001), além de altas taxas de perda embrionária como foi registrado em eqüinos por pesquisadores da Universidade do Estado do Colorado Estados Unidos (SQUIRES *et al.*, 1999).

As baixas taxas de concepção se devem a fato que somente cerca de 50% das células sobrevivem ao congelamento descongelamento (WATSON, 1996), enquanto as elevadas taxas de perda embrionária carecem de mais estudos para melhor elucidação.

De acordo com PICKETT *et al.* (2001), as biotecnologias do sêmen devem ser capazes de preservar alguns atributos essenciais para que o espermatozóide possa desempenhar corretamente suas funções tais como: a) retenção da capacidade metabólica para produção de energia; b) apresentar motilidade progressiva; c) retenção de proteínas necessárias a sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea; d) presença e funcionalidade de enzimas acrossomais essenciais para a penetração e passagem pela estrutura do

ovócito; e e) uma apropriada distribuição de lipídios e proteínas na membrana plasmática para que passível a reação acrossômica, ligação e fusão ao ovócito.

No congelamento de espermatozóide de eqüídeos, o sêmen deve primeiramente ser diluído em um apropriado meio diluidor, centrifugado para remoção do plasma seminal, ressuspendido gentilmente em diluidor de congelamento contendo crioprotetores, resfriado e congelado até  $-120^{\circ}\text{C}$  e estocado a  $-196^{\circ}\text{C}$ . E para que o espermatozóide seja capaz de fecundar o ovócito deverá reter a capacidade de produção de energia, motilidade progressiva, acrossomo preservado e proteínas na membrana plasmática relacionadas à capacidade de fecundação (PICKETT *et al.*, 2001).

Os procedimentos de congelamento e descongelamento podem danificar qualquer um destes componentes espermáticos, e assim reduzir ou abolir a fertilidade, fato que não ocorre ou em menor escala com o sêmen fresco diluído (AMANN & PICKETT, 1987). Assim, para que haja um completo entendimento das alterações causadas pelos procedimentos, se faz necessário considerarmos a estrutura e a composição da célula espermática (GRAHAM, 1996).

### **2.2.1. As membranas espermáticas**

O espermatozóide é subdividido em cabeça, pescoço, peça intermediária, peça principal e peça terminal (DAVIES MOREL, 1999). Porém uma maneira mais apropriada para estudos com biotecnologias do sêmen, seria subdividir o espermatozóide e considerá-lo como uma célula possuidora de: um núcleo altamente condensado, microtúbulos, fibras e membranas biológicas (plasmática, acrossomal interna e externa, nuclear e mitocondrial) (CHENIER, 1999).

Embora os microtúbulos e estruturas das fibras sejam importantes para a motilidade, aparentemente as membranas biológicas são mais importantes para serem alvo de estudos das lesões induzidas pelos procedimentos de congelamento por estarem primordialmente relacionadas aos danos do congelamento (AMANN & PICKETT, 1987). Deste modo, um profundo conhecimento da estrutura e do funcionamento da membrana plasmática dos

espermatozoides é o ponto inicial para o êxito dos procedimentos de manipulação do sêmen (BRAGA, 2007).

A composição básica da bicamada lipídica é de 65 a 70 % de fosfolipídios, sendo o ácido docosahexanóico o principal ácido graxo ligado a estes fosfolipídios (HOLT, 2000). Os lipídios predominantes na membrana plasmática são representados pelos fosfolipídios, colesterol, esfingolipídios e gangliosídeos (AMANN & PICKETT, 1987).

O modelo de estrutura da membrana plasmática para células eucarióticas animais, mais aceito pela comunidade científica é o modelo de “mosaico fluído” proposto por Singer e Nicholson, (1972), segundo a proposta, uma bicamada fosfolipídica encontra se entremeadas por proteínas integrais e com proteínas periféricas e carboidratos ancorados (CHENIER, 1999).

Os lipídios são arranjados de modo que o terminal hidrofóbico esteja voltado internamente, enquanto o terminal hidrofílico se volta internamente no meio intracelular e externamente no meio extracelular. Esse arranjo ocorre em ambas as faces da membrana fazendo com que haja permeabilidade seletiva da membrana (GRAHAM, 1996; DAVIES-MOREL, 1999).

As proteínas representam cerca de 50% do conteúdo da membrana, sendo que as duas classes integrais e periféricas na membrana plasmática possuem funções distintas (CHENIER, 1999). As proteínas integrais somente são removíveis com detergentes, atuam como canais ou poros; enquanto as proteínas periféricas são facilmente removíveis e tem como funções auxiliar na estabilização da membrana (AMANN & PICKETT, 1987; DAVIES-MOREL, 1999).

O modelo de membrana plasmático inicialmente proposto, em verdade é de magnitude mais complexa, uma vez que a distribuição e as interações entre lipídios e proteínas ocorrem de modos bastante complexos e de modo diferente nas diversas partes da membrana, constituindo assim os chamados domínios de membrana (PARKS & GRAHAM, 1992).

Os domínios de membrana podem ser mais bem subdivididos em região acrossomal e pós-acrossomal (CHENIER, 1999). A manutenção dos domínios de membrana é importante para o ocorram os eventos altamente específicos

da manutenção das funções espermáticas, principalmente a capacitação, reação acrossomal e fecundação possam ocorrer (PARKS & GRAHAM, 1992).

Essa compartimentalização de membrana é resultante de vários fatores como: 1) interação lipídio-lipídio que inibe a difusão lateral de lipídios; 2) imobilização de lipídio feita por interações com proteína ancoradas no citoesqueleto; 3) barreiras de proteínas para intra-regional difusão feita por partículas intramembranas estacionárias, que se acredita que sejam feitas pelas proteínas integrais e 4) solubilidade seletiva entre os lipídios e proteínas da membrana.

A compartimentalização de membrana tem uma implicação também na biotecnologia do sêmen uma vez que determinados procedimentos podem induzir variados graus e locais de acometimento de lesões de membrana (CHENIER, 1999).

Durante o processamento de sêmen de eqüídeos alguns eventos físicos e biológicos ocorrem: redução da temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento (SQUIRES *et al.*, 1999). Esses eventos, ao mesmo tempo em que são responsáveis pela conservação espermática, são responsáveis por alterações nas membranas e nos mecanismos funcionais do espermatozóide (AMANN & PICKETT, 1987).

Os procedimentos são responsáveis por lesões celulares em diferentes níveis, devido principalmente a mudanças na temperatura, à formação de cristais de gelo, alterações na membrana espermática e lesões no DNA (ARRUDA, 2000).

As alterações causadas pelo resfriamento (20°C a 1°C), induzidas ao espermatozóide são parcialmente ou incompletamente entendidas, e coletivamente recebe o nome de choque térmico pelo frio, que é caracterizado pela presença de muitos espermatozoides com movimento circular fechado ou retrógrado, perda prematura de motilidade, decréscimo da produção de energia, aumento da permeabilidade de membrana, lesões no acrossomo e perda de moléculas e íons (AMANN & PICKETT, 1987; DAVIES MOREL, 1999; SQUIRES *et al.*, 1999).

Alguns destes danos podem ser causados por inabilidade da regulação do mecanismo de troca de íons cálcio. O maior dano ao espermatozóide

causado pelo choque térmico pelo frio demonstra que a perda de integridade de membrana resulta em aumento da permeabilidade, que pode ser feito pela separação da fase lateral dos lipídios da membrana e com remoção de proteínas dentro dos domínios de membrana (KEITH, 1998).

A ocorrência de choque térmico não é restrita ao espermatozóide, mas ocorre na maioria das células expostas a baixas temperaturas (AMANN & PICKETT, 1987). O resfriamento quando efetuado de modo inadequado induz ao choque térmico o qual causa danos parcialmente irreversíveis ao espermatozóide (FÜRST, 2002).

A extensão das lesões, associadas com o choque térmico, é dependente principalmente das taxas de resfriamento e temperatura final que os espermatozoides são resfriados. Em oposição ao rápido resfriamento, raramente o rápido aquecimento a 37°C é nocivo a sobrevivência espermática (AMANN & PICKETT, 1987).

De acordo com AMANN & PICKETT, (1987) as lesões causadas pelo choque térmico pelo frio podem ser agrupadas em duas categorias: 1) lesões diretas, evidenciadas após curto período de armazenamento a baixas temperaturas, sendo esta dependente principalmente das taxas de resfriamento, e maiores lesões são induzidas pelo rápido resfriamento se comparado ao resfriamento a taxas mais lentas; e 2) lesões indiretas ou latentes, que são evidentes somente tempo depois de período mais prolongado de armazenamento, e também são independentes das taxa de resfriamento. Os autores concluem que ambos os danos diretos e indiretos são manifestações diferentes do mesmo espectro de alterações.

O congelamento de sêmen representa uma interrupção artificial do progresso de maturação do espermatozóide pós-ejaculação e na fertilização. O maior problema com relação à criopreservação de sêmen é que mesmo utilizando as melhores técnicas, o padrão de sobrevivência pós-descongelamento é restrito em cerca de 50% da população espermática (WATSON, 1996). Assim novas metodologias e procedimentos devem ser desenvolvidos para que sejam melhorados estes índices, especialmente para o sêmen de asininos.

## 2.2.2. Crioprotetores

A maioria das células requer a presença de um agente protetor para sobreviver ao processo de congelamento, e agentes que possuem essa capacidade são denominados de crioprotetores (KEITH, 1998). Crioprotetores podem ser adicionados ao meio para parcialmente protegerem o espermatozóide durante o congelamento e descongelamento. (GRAHAM, 1996).

Os crioprotetores são classificados em dois grupos, os penetrantes (permeantes) e não penetrantes (não permeantes), a depender de sua habilidade em adentrar ou não a célula espermática (JASKO, 1994; KEITH, 1998).

Os principais crioprotetores penetrantes empregados para o congelamento de sêmen de eqüídeos são: glicerol, propilenoglicol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido, acetamida, dimetil formamida, metilformamida (KEITH, 1998; ALVARENGA, 2002; GOMES *et al.*, 2002; OLIVEIRA, 2006; VIDAMENT *et al.*, 2008). Crioprotetores não penetrantes são os açúcares, lipoproteína da gema de ovo, proteína do leite (fosfoparacaseínato nativo), metilcelulose, pentoxifilina, entre outros (KEITH, 1998; MOUSSA *et al.*, 2002; MARTIN, 2005).

A maioria dos crioprotetores penetrantes atua como solventes e solutos ao mesmo tempo, por outro lado os não penetrantes são somente solutos, pois apresentam alto peso molecular (GRAHAM, 1996).

Crioprotetores não penetrantes, como a lactose e lipoproteínas encontradas na gema do ovo, atuam somente no compartimento extracelular. Estes crioprotetores desidratam a célula espermática e desta forma diminuem a probabilidade de formação de grandes cristais de gelo intracelularmente. No entanto o exato mecanismo pelo qual, ambos os tipos de crioprotetores atuam ainda permanece desconhecido (GRAHAM, 1996; KEITH, 1998).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado para o congelamento de sêmen de animais domésticos, silvestres e selvagens (HOLT, 2000, 2001; PENFOLD & WATSON, 2001). Aparentemente é um crioprotetor essencial para o congelamento de espermatozóide de eqüídeos (AMANN & PICKETT, 1993).

Provavelmente atue intra e extra celularmente na proteção espermática ao congelamento (GRAHAM, 1996).

Estudos tem identificado uma proteína canal a Aquaporina 7 (AQP7), presente na membrana de células espermáticas, poder ser responsável por uma possível rota pelo qual o glicerol atravessa a membrana espermática. Esta proteína tem sido incriminada com responsável pela maior sensibilidade das células espermáticas aos níveis de glicerol. E está presente na membrana citoplasmática do espermatozóide de diversas espécies de animais domésticos, e a quantidade e ou a falta dela explicaria em parte as diferenças em sensibilidade entre espécies frente ao glicerol como crioprotetor (CURRY, 2000).

O resfriamento e reaquecimento inerentes ao processo de criopreservação, por si só causam variados graus de injúrias nas células espermáticas, danos estes que são potencializados pelo glicerol (PACE & SULLIVAN, 1975). Têm sido relatados que o glicerol exerce efeitos negativos para a fertilidade tanto no sêmen fresco como no sêmen refrigerado, podendo a toxicidade do glicerol ser o resultado da desnaturação de proteínas, como as actinas (FAHY *et al.*, 1990, VIDAMENT *et al.*, 2008).

HAMMERSTEDT & GRAHAM (1992) relataram efeitos nocivos do glicerol as células espermáticas, como sendo causado por mudanças no citoplasma, devido ao incremento na viscosidade celular pela ação intracelular do glicerol, alterando desta maneira a polimerização da tubulina, e também as associações de microtúbulos. Outros efeitos adversos como mudança no balanço bioenergético, alteração da membrana plasmática e mudanças no glicocálix também têm sido relacionadas com o glicerol. Outros autores afirmam que a verdadeira toxicidade do glicerol é devido ao estresse osmótico já que o mesmo penetra as membranas celulares mais facilmente que alguns crioprotetores (GILMORE *et al.*, 1995).

Entretanto, altos níveis de glicerol têm sido incriminados como um dos principais responsáveis pelos resultados de baixas taxas de concepção do sêmen congelado (CURRY, 2000; ALVARENGA *et al.*, 2005).

VIDAMENT *et al.*, 2008, compararam a resistência do espermatozóide de jumentos e garanhões, para sêmen fresco diluído, resfriado e congelado no

meio INRA 82 na inseminação artificial de éguas e jumentas, o sêmen de ambas as espécies demonstrou extrema sensibilidade a altos níveis de glicerol tolerando concentrações máximas de 2,2%, semelhante ao espermatozóide do varrão, que classicamente entre as espécies domésticas apresenta menor tolerância a altos níveis de glicerol (PENFOLD & WATSON, 2001). Porém usualmente diluidores de congelamento para sêmen suíno apresentam concentração final de 2 a 3% (PENFOLD & WATSON, 2001).

Pesquisas recentes com crioprotetores para sêmen de eqüídeos têm sido desenvolvidas, e tem apontado resultados mais favoráveis para a utilização de amidas como crioprotetores, estas providenciam melhores resultados em relação ao uso associado ou isolado do glicerol (ALVARENGA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; SNOECK *et al.*, 2007; VIDAMENT *et al.*, 2008).

ALVARENGA (2002) sugere que as amidas por possuírem peso molecular mais baixo e menor viscosidade se comparado ao glicerol, apresentaria característica favorável para o processo da criopreservação, provavelmente por induzir a um menor estresse osmótico. Testes de fertilidade em éguas têm demonstrado melhora significativa nas taxas de prenhes para garanhões e jumentos que tiveram o seu sêmen congelado com uso de dimetilformamida como crioprotetor, quando comparado ao uso de glicerol (MEDEIROS *et al.*, 2003; VIDAMENT *et al.*, 2005).

O uso das amidas como crioprotetores penetrantes nos diluidores seminais para o sêmen de eqüídeos leva a um incremento na motilidade espermática pós-descongelamento e melhor preservação da integridade das membranas plasmáticas, em relação ao uso do glicerol como crioprotetor, além disto, permite o uso de sêmen de garanhões que têm resultados de baixa congelabilidade com o glicerol como crioprotetor (ALVARENGA *et al.*, 2005; VIDAMENT *et al.*, 2008). MEDEIROS *et al.* (2003) demonstraram que as motilidades total e progressiva após o descongelamento melhoram significativamente quando os espermatozóides são congelados na presença de dimetil acetamida comparado com glicerol a 5%, porém, motilidades similares foram encontradas na presença de dimetil formamida e metil formamida a 5%.

Da mesma forma, GOMES *et al.* (2002) em trabalho conduzido com um ejaculado de 17 garanhões da raça Mangalarga Marchador com idade de 5 a

17 anos, utilizando diluidor de congelamento a base de gema de ovo e leite, com variação do crioprotetor de: (1) 5% glicerol; (2) 5% dimetilformamida; (3) 5% metilformamida; (4) 3% de dimetilacetamida, realizaram análise computadorizada da motilidade total e progressiva após o congelamento/descongelamento, resultando em 16.99% - 6.31%, 44.06 - 15.94%, 37.19.19 - 16.75, 32.5 - 14.37% respectivamente para 1, 2, 3 e 4, demonstrando superioridade da dimetilformamida e metilformamida para o congelamento de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, e péssimo congelamento obtido quando o glicerol foi usado como crioprotetor.

Como reportado por AMANN & PICKETT (1987) apesar de o glicerol apresentar toxicidade, parece ser essencial ao congelamento de sêmen, assim várias pesquisas têm sido desenvolvidas para determinar qual é a concentração mais adequada do crioprotetor ao meio diluidor sem produzir efeitos adversos aos espermatozóides.

O glicerol foi inicialmente utilizado na concentração de 7-10% (SMITH & POLGE, 1950). Embora estudos tenham demonstrado taxas de fertilidades similares em garanhões com sêmen congelado utilizando-se concentrações de glicerol de 2% a 7% (GRAHAM *et al.*, 1978). A concentração de glicerol mais utilizada atualmente nos meios diluidores varia de 2% a 5% (VIDAMENT *et al.*, 2002). A concentração de glicerol de 2,5% para garanhões e de menos de 2,2% para jumentos foi sugerida como sendo a ideal para o congelamento de sêmen destas espécies (VIDAMENT, 2005; VIDAMENT *et al.*, 2008).

Algumas substâncias não propriamente crioprotetores, mas se enquadram na categoria de aditivos, que são substâncias que atuam indiretamente melhorando a sobrevivência espermática ao congelamento (HOLT, 2001).

De acordo com o mesmo autor em revisão, diversos pesquisadores têm concluído que a adição de substâncias com propriedades detergentes em diluentes a base de gema de ovo melhoram a motilidade pós descongelamento, integridade acrossomal e sobrevivência espermática em espécies unguladas, sendo que o surfactante mais empregado para sêmen destes animais é o lauril trietanolamina sulfato de sódio, conhecido como orvus-es-paste que é adicionado ao diluente (0,5 – 1,5%). O Orvus-Es-paste (OEP) lauril-sulfato de sódio tem sido adicionado ao meio diluidor de

congelamento e resfriamento de várias espécies domésticas e proporcionado melhoria na proteção espermática (MARTIM *et al.*, 1979; HOLT, 2001; BRAGA, 2007; BURANAAMNUAY *et al.*, 2008).

É uma substância sintética (função detergente) que tem a capacidade de dispersar os componentes da gema de ovo, em diluidores que essa substância se faça presente, acredita que seja capaz de melhorar a interação com a superfície da membrana plasmática, e assim explicaria os melhores resultados de motilidade e integridades acrossomal obtidos (JONHSON *et al.*, 2000).

Apesar de o mecanismo exato pelo qual o OEP atue não esteja completamente elucidado, especula-se que atue indiretamente via sua propriedade emulsificadora (PETTITT & BUHR, 1998; BURANAAMNUAY *et al.*, 2008), ou poderia favorecer a formação de micro-cristais de gelo de formato angular durante o congelamento (BRAGA, 2007).

PURSEL *et al.* (1978) avaliaram níveis da adição de OEP no diluidor de congelamento de sêmen de varrões, registraram a inclusão de 1% até 1,5% foram superiores para obtenção de melhor integridade acrossômica pós-descongelamento, enquanto concentrações de 0,5 até 1% foram superiores para a manutenção da motilidade independente da velocidade de resfriamento. Entretanto a inclusão de OEP em diluidor sem gema de ovo, demonstrou efeitos nocivos sobre a célula espermática manifestados por diminuição da motilidade.

BURANAAMNUAY *et al.* (2008) em estudo conduzido com sêmen de varrões utilizando o meio diluidor lactose-gema de ovo e com glicerol como crioprotetor, registraram melhoria na viabilidade espermática através de maior integridade acrossomal, motilidade quando o 1,5% de OEP foi adicionado ao meio diluidor, para sêmen congelado em palhetas de 0,25 e 0,5 mL.

O uso de OEP em sêmen equino foi introduzido por MARTIM *et al.* (1979), os autores incluíram 0,08 mL de OEP para cada 20 mL. Estes formularam um diluidor para congelamento de sêmen de garanhões, para isso se basearam em um diluidor russo de resfriamento para suínos a base de solução salina, e um diluidor japonês de congelamento de bovinos a base de gema de ovo, lactose e glicerol. A esses dois diluidores base, os autores adicionaram OEP. Este procedimento resultou em no desenvolvimento do

clássico diluidor alemão utilizado em todo o mundo desde então (MORRIS & SAMPER, 1998).

Para sêmen de ruminantes a inclusão de OEP em diluidor de congelamento de sêmen de bode resultou em melhoria da motilidade e acrossomo intacto preservado (PENFOLD & WATSON, 2001). O OEP foi utilizado por BORGES (2003) ao meio de congelamento de sêmen de touros a base TRIS-gema, com o intuito de adicionar a vitamina E, concluiu que o OEP foi eficiente em sua capacidade de emulsificar o tocoferol, apresentando melhores resultados à preservação da membrana avaliados por ter de fluorescência.

A redução da temperatura tem como conseqüência aumento da permeabilidade de membrana, assim ocorre influxo de íons cálcio, este elemento é importante em momentos próximo a fecundação durante a fase da capacitação, reação acrossômica e hiper-ativação da motilidade espermática, entretanto o influxo de íons cálcios precipita esse momento, neste sentido autores tem utilizado aditivos quelantes de cálcio com a finalidade de inibir o influxo de íons cálcio precoce na criopreservação (HOLT, 2001).

O quelante mais utilizado em meio diluidor de sêmen de eqüídeos e varrão é o ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA). Possui propriedades de se ligar fortemente a íons metálicos bivalentes como o  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , deixando-os indisponíveis no meio extracelular e conseqüentemente não ocorrerá o influxo de cálcio prevenindo assim o inicio da capacitação espermática e da reação acrossômica (JONHSON *et al.*, 2000).

### **2.2.3. Alguns dos principais diluidores de sêmen para o congelamento**

Os diluidores utilizados para sêmen eqüídeos são constituídos por água, tampões e substâncias não iônicas, açúcares e diferentes tipos de macromoléculas e antibióticos (AMANN & PICKETT, 1987). De maneira geral os diluidores podem ser divididos e agrupados em: gema de ovo e os com leite (FÜRST, 2006; SAMPER, 2007).

Um bom diluidor segundo PICKETT (1993) e SILVA FILHO, (1994) idealmente deve proporcionar: 1) Pressão osmótica compatível com a célula espermática, 2) Adequado balanço mineral 3) Adequada combinação de

nutrientes, 4) Capacidade de neutralização de substâncias produzidas pelo espermatozóide 5) Proteção contra mudanças de temperatura, principalmente pelo frio 6) Capacidade de estabilizar sistemas enzimáticos e garantir estabilidade de membrana 7) Livre de agentes infecciosos 8) Baixo custo 9) Não oferecer toxicidade ao espermatozóide 10) Baixa irritabilidade ao aparelho genital 11) Fácil aquisição.

O diluidor ideal, capaz de oferecer alta proteção espermática aos processos de manipulação aliado com a máxima fertilidade, ainda esteja por ser formulado (SILVA FILHO, 1994; DAVIES MOREL, 1999), um grande número de diluidores tem sido formulado, ao longo de décadas com esse propósito (PALMER, 1984; BURNS & BURNS, 1992; TRIMECHE *et al.*, 1996, 1997, 1998 BATELLIER *et al.*, 1997; PAPA *et al.*; 2005; OLIVEIRA, 2006).

Segundo SQUIRES *et al.* (1999), para que o espermatozóide seja capaz de desempenhar suas funções corretamente, ele deve reter alguns atributos após o processamento, quais sejam: metabolismo para a produção de energia, motilidade progressiva, reter enzimas acrossomais, que são essenciais para penetração em estruturas ao redor do ovócito além de apropriada estabilização e distribuição dos lipídios ao redor das membranas até o momento da fecundação, proteínas de membrana que interagem com genital feminino assim formando o reservatório espermático em inseminações pré-ovulação.

A gema de ovo como componente de meio diluidor de congelamento tem demonstrado efeitos benéficos ao longo de décadas de sua utilização para o sêmen de várias espécies de animais domésticos e de zoológico (HOLT, 2001). PHILLIPS (1939) foi o primeiro a relatar o uso da gema de ovo em extensores para sêmen de touros e LARDY & PHILLIPS (1939), foram os primeiros a citar a gema de ovo como componente de diluidor seminal para eqüinos.

Aparentemente, BERLINER (1942), baseado nos dois trabalhos anteriores, foi quem primeiro a utilizou a gema de ovo para extensores seminais de jumento e garanhão na rotina de uma central de reprodução eqüídea no estado do Mississippi nos Estados Unidos.

Desde então muitos trabalhos de pesquisa foram desenvolvidos, bem como citações da utilização na rotina de reprodução eqüídea, da gema de ovo

como constituinte do meio diluidor de sêmen resfriado e congelado para garanhões (NAGASE *et al.* 1966; OSHIDA *et al.*, 1967; MERKT *et al.*, 1975; MARTIM *et al.*, 1979; COCHRAN *et al.*, 1983; SILVA FILHO *et al.*, 1987; PAPA, 1987; CARVALHO, 1992; KLUG, 1992; CARVALHO *et al.*, 1998) bem como para o sêmen de jumentos (VIEIRA *et al.*, 1985; PIAO *et al.*, 1988; ARRUDA *et al.*, 1989; SANTOS, 1994; SILVA, 1995; MELLO, 1998 SILVA, 1995; PAPA *et al.*, 1999; MELO *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2006; VIDAMENT *et al.*, 2008).

BOGART & MAYER (1950) realizaram experimentos pioneiros sobre a elucidação dos fatores de proteção da gema de ovo ao espermatozóide eqüino, em relação ao choque pelo frio, e capacidade de preservação prolongada em sêmen resfriado em meio diluidor contendo gema de ovo e soluções tamponantes.

Sabe-se que a gema de ovo melhora a proteção da membrana espermática durante o procedimento de criopreservação, no entanto faltam estudos detalhando sobre qual seria realmente o mecanismo de ação da gema de ovo e de seus componentes no congelamento e descongelamento (HOLT, 2001). Provavelmente pela natureza complexa da gema de ovo, pode ser difícil para se elucidar com detalhes sobre quais seriam realmente os fatores responsáveis pelos efeitos da proteção espermática ao resfriamento e congelamento de sêmen de diferentes espécies (KAMPSCHMIDT *et al.*, 1953; PACE & GRAHAM, 1974; MOUSSA *et al.*, 2002).

De acordo com BOGART & MAYER (1950) e HOLT, (2001), em experimentos conduzidos em animais domésticos e selvagens, indicam evidências de que os efeitos da gema de ovo possam ser modulados pelo sistema tampão utilizado, porém nem todos os diluentes utilizam sistema tampão para controle de pH, pois são baseados em alta concentração de açúcares. Outros autores indicam que a substância responsável pela proteção espermática seja a lipoproteína de baixa densidade (LDL) (BERGERON *et al.*, 2004).

A gema de ovo apresenta algumas desvantagens na constituição do meio diluidor, como a turvação do meio diluidor dificultando a avaliação seminal pelos processos convencionais de microscopia, além de causar inibição da respiração celular (PACE & GRAHAM, 1974). Algumas tentativas foram feitas para realizar o clareamento da gema de ovo através de diferentes técnicas,

como a centrifugação, contudo sem obtenção do mesmo sucesso da gema na condição natural (PICKETT, 1993; SILVA FILHO; 1994; SQUIRES *et al.*, 1999).

Em outras espécies, o uso da gema de ovo tem suas limitações peculiares, como para sêmen de caprinos, a inclusão de gema de ovo em diluidores de modo geral não pode apresentar valores superiores a 2,5%. Isto porque o bode expressa em seu plasma seminal a enzima fosfolipase A2, que degradam os fosfolipídios da gema de ovo tornando o meio impróprio para a proteção espermática (PENFOLD & WATSON, 2001).

A gema de ovo de galinha é mais empregada na formulação de diluidores para eqüídeos. Embora tenha sido registrado melhoria do congelamento de sêmen com uso de gema de ovo de codorna por TRIMECHE *et al.* (1997) para sêmen de jumentos e da gema de ovo de patas para sêmen de garanhões por (CLULOW *et al.*, 2007).

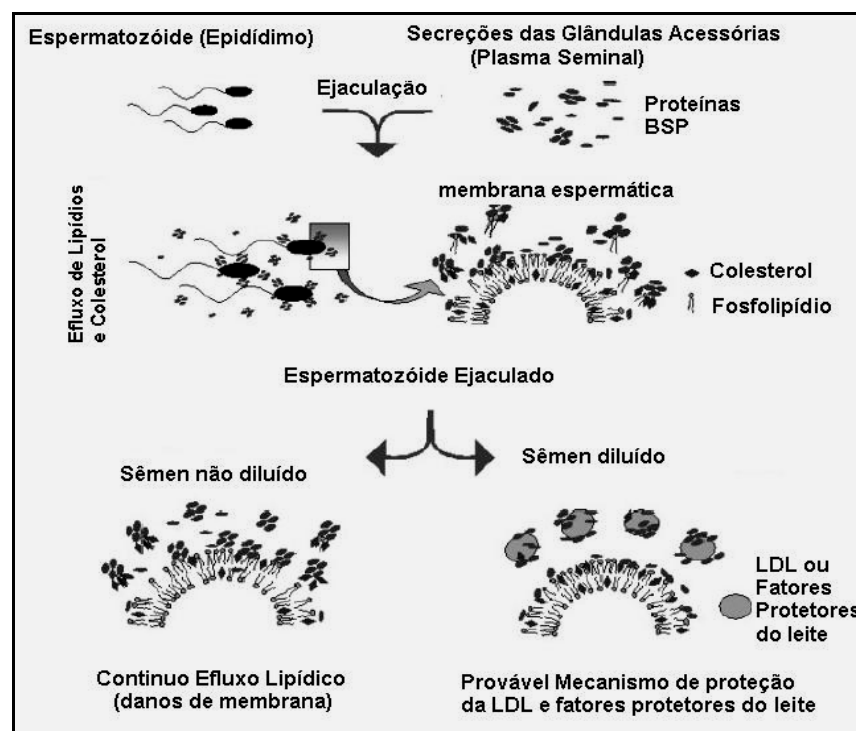
A composição da gema de galinhas alimentadas com milho e soja, apresenta cerca de 35% de ácidos graxos saturados, 45% de ácidos monosaturados e 20% ácidos graxos poli-insaturados (ANTON & GANDEMER, 1997). Os lipídeos são os componentes primários da gema de ovo correspondendo 65% da matéria seca. Eles são compostos de 65% de triglicerídeos, 29% de fosfolipídios (sendo que 86% destes é de fosfatidilcolina e 14% fosfatidiletanolamina), e 5% de colesterol, e <1% ácidos graxos livres (ANTON *et al.*, 2007).

A LDL é porção da gema como maior capacidade emulsificação, representando por volta de 2/3 do conteúdo sólido desta e faz parte da fração solúvel da gema, denominada de plasma (DAUPHAS *et al.*, 2007). Apresenta densidade média de 0.982g/ml, e disposição em formato esférico com 17 a 60 nm de diâmetro, com uma camada lipídica composta por triglicerídeos e colesterol, que são rodeados por um filme de fosfolipídios e proteína. Os fosfolipídios desempenham papel essencial na estabilidade da estrutura da LDL, devido às forças de associação entre as moléculas ser essencialmente hidrofóbicas (ANTON *et al.*, 2006; DAUPHAS *et al.*, 2007).

A LDL contém entre 83 - 89% de lipídeos e 11 a 17% de proteínas. Lipídeos da LDL são compostos de aproximadamente 69% de triglicerídeos, 26% fosfolipídios e 5% de colesterol (ANTON & GANDEMER, 1997).

A LDL tem sido incriminada como responsável pelos fatores de proteção contra o choque frio levantados por BOGART & MAYER (1950) e reafirmados por PACE & GRAHAM, (1974). Não se sabe ao certo o mecanismo pelo qual a LDL protege o espermatozóide a baixas temperaturas, porém de acordo com MANJUNATH *et al.* (2002) e BERGERON *et al.* (2004) em recentes estudos deste grupo, com sêmen de bovinos criopreservado, apontam para uma interação entre proteínas que o touro expressa em seu plasma seminal e a LDL (BERGERON *et al.*, 2003).

O touro expressa no plasma seminal proteínas ligadoras de lipídeos (Lipid-binding-protein/BSP: BSP-A1/A2, BSP –A3 and BSP-30-kDa). Essas BSPs induzem a remoção do colesterol e fosfolipídios da membrana espermática, desta forma induzem a capacitação do espermatozóide (BERGERON *et al.*, 2003). Com adição da gema de ovo e ou leite no diluidor de congelamento, ocorre interação entre a LDL e as BSPs, desta forma tornando a membrana estável ao processo de resfriamento e congelamento (BERGERON & MANJUNATH, 2006). Provavelmente, mecanismo de proteção semelhante ocorre para eqüídeos como descrito no Esquema 1 para touros.



**Esquema 1:** Provável mecanismo de ação da proteção da LDL e dos fatores protetores do leite, proposto para sêmen de touros. Adaptado: BERGERON & MANJUNATH (2006).

A concentração de gema de ovo nos diluidores de congelamento para todas as espécies de animais domésticos e silvestres e selvagens e varia de 2% a 20% (MARTIM *et al.*, 1979; PAPA 1987; HOLT, 2001; PAPA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; VIDAMENT *et al.*, 2008). Poucos autores têm avaliado os efeitos de diferentes concentrações dos níveis de gema de ovo (HOLT, 2001).

#### **2.2.4. Processamento do sêmen**

De forma geral, os procedimentos utilizados para o congelamento de sêmen de eqüídeos envolvem: o exame andrológico, a colheita de sêmen, avaliação seminal, diluição, centrifugação, desprezo do sobrenadante, ressuspensão do pellet com o diluidor de congelamento, envase, resfriamento, estabilização do sêmen, congelamento e, após o descongelamento, avaliação seminal (PAPA, 1987; FÜRST, 2006).

Até o momento não existe um procedimento unificado para cada uma das etapas descritas anteriormente, sendo muito variáveis tanto com os resultados de pesquisas como com os procedimentos desenvolvidos na rotina de campo (KLUG, 1992; SQUIRES *et al.*, 1999; VIDAMENT, 2005; AURICH & AURICH, 2006).

Em grande levantamento feito por SAMPER & MORRIS, (1998) envolvendo Argentina, Austrália, Bélgica, Brasil, Canadá, França, Finlândia, Alemanha, Itália, Países Baixos, Polônia, África do Sul, Suécia e Estados Unidos, considerados no momento do estudo, países onde a inseminação em eqüídeos com sêmen congelado era praticada com maior relevância, surpreendentemente os autores registraram 35 recomendações diferentes entre todos os procedimentos.

A colheita de sêmen, preferencialmente, deve ser utilizada com vagina artificial, devidamente preparada (KENNEY *et al.*, 1983; VARNER *et al.*, 1991), sendo que as atuais recomendações é que não se utilize mais a lubrificação, devido aos potenciais efeitos nocivos, principalmente osmóticos, dos lubrificantes (LIMONE *et al.*, 2002; SAMPER, 2007).

Melhores resultados de congelamento de sêmen são obtidos quando o reprodutor tiver suas reservas espermáticas extragonadais esgotadas através de coletas ou coberturas freqüentes, uma vez que esse procedimento permite que as mesmas sejam renovadas e haja padronização das concentrações espermática por ejaculado (AMANN & PICKETT, 1987).

Para a coleta do sêmen de jumentos podem se utilizar como manequim de coleta éguas, jumentas, jumentos castrados ou manequim artificial (tipo: "phantom" ou "dummies") (KREUCHAUF, 1984; THOMSPON, 1992; ROTA *et al.*, 2008). Porém, de acordo com KRECHAUF (1984), menores tempos de coleta podem ser obtidos quando se utiliza jumentas em estros. Contudo, para jumentos condicionados a cobertura de éguas melhores tempos são obtidos quando esse tipo de fêmea.

Após ou durante a coleta, o sêmen deve ser filtrado e a fração gelatinosa ser devidamente separada da fração rica em espermatozóides (KENNEY *et al.*, 1983; PAPA, 1987; GASTAL, 1991). Após separação das frações devem ser iniciados os procedimentos de avaliação espermática de forma subjetiva, com microscópio de luz, ou objetiva, através das análises computadorizadas (DAVIES MOREL, 1999; MIRÓ *et al.*, 2005). No caso da análise objetiva do sêmen o mesmo deve obrigatoriamente ser diluído, e no caso de análises subjetivas as análises podem ser feitas sem diluição.

As avaliações rotineiras usadas no pré-congelamento de sêmen de eqüídeos são: motilidade total, motilidade progressiva, vigor espermático, concentração espermática, volume sêmen sem gel, aspecto seminiais, além da retirada de amostras para análise de morfologia espermática (KREUCHAUF, 1984; DAVIES MOREL, 1999; FÜRST *et al.*, 2005).

Na seqüência, após as avaliações seminiais, o sêmen deve ser diluído em um meio extensor que esteja à mesma temperatura (DAVIES MOREL, 1999). A diluição do sêmen de eqüídeos, após a coleta, pode ser realizada a 37°C, imediatamente após a colheita, ou após um resfriamento do sêmen da temperatura corporal a temperatura de 22°C, conforme o protocolo francês de congelamento (VIDAMENT, 2005).

Os diluidores utilizados na centrifugação seminal para eqüídeos são variáveis de acordo com a localidade no país e mundo, facilidades de aquisição de uso de determinado produto, além de outros.

Os principais diluidores são: solução sacarose 11% (PIAO, *et al.*, 1988), solução glicose EDTA (MARTIM *et al.*, 1979; KLUG, 1992); solução de Ringer com lactato (PAPA *et al.*, 1981); solução de ringer lactato acrescido do meio de Kenney (D'LLAQUA JR *et al.*, 2001), meio diluidor de Kenney (SERRES *et al.*, 2002; MIRÓ *et al.*, 2005), os meios INRA 82, 96, ou leite desnatado ultra-pasteurizado (VIDAMENT, 2005; VIDAMENT *et al.*, 2005; VIDAMENT *et al.*, 2008; ROTA *et al.*, 2008).

A maioria dos diluentes utilizados para centrifugação de sêmen de eqüídeos em muitos países do mundo são diluentes comerciais de resfriamento, principalmente a base de leite em pó desnatado, variantes do diluente de mínima contaminação proposto por KENNEY e seus colaboradores em 1975 (SQUIRES *et al.*, 1999; MIRÓ *et al.*, 2005; PAPA *et al.*, 2005; RAPHAEL, 2007; ROTA *et al.*, 2008).

A taxa de diluição seminal utilizada ao longo dos anos foi bastante variável (AMANN & PCIKETT, 1987). Porém, aparentemente a diluição seminal mais adequada deve ser de uma parte de sêmen para uma parte de diluidor (DAVIES MOREL, 1999; PAPA, 1987; SQUIRES *et al.*, 1999; ARRUDA, 2000; ALVARENGA, 2002; PAPA *et al.*, 2005; LOOMIS, 2006; SAMPER *et al.*, 2007).

A centrifugação do sêmen visa concentrar os espermatozóides, para permitir uma adequada diluição posterior e remover grande parte do plasma seminal que tem efeitos nocivos aos espermatozóides quando em alta quantidade, como diminuição da motilidade espermática (LOVE *et al.*, 2002; AURICH, 2008).

Experimentos indicam que de acordo com a metodologia empregada, a centrifugação poderá induzir danos e a peroxidação lipídica das membranas espermáticas (RAPHAEL, 2007; AURICH, 2008). Os estudos sobre as forças de centrifugação para sêmen de eqüídeos apontam resultados mais favoráveis para forças de centrifugação mais leves (400 a 600 g), por curtos períodos de tempo (extremos de 10 a 20 minutos) com um tempo médio de 15 minutos (PAPA, 1987; AMANN & PICKETT, 1987; ARRUDA, 2000; ALVARENGA,

2002; SERRE *et al.*, 2002; MIRÓ *et al.*, 2005; PAPA *et al.*, 2005; AURICH, 2008).

O sêmen contido em tubos de ensaio após a centrifugação estará fracionado em duas porções, sendo ambas formadas por plasma seminal, espermatozóides, células de descamação do trato reprodutivo e diluidor; sendo que na porção superior do tubo estará a fração sobrenadante rica em plasma seminal, diluidor usado para a centrifugação e algumas poucas células; e na porção inferior do tubo encontra-se o pellet que é uma espécie de agregado de espermatozóides, plasma seminal e diluidor. Nesta última fração permanecerão cerca de 85% de todos os espermatozóides que iniciaram o processo de centrifugação (PAPA, 1987; SQUIRES *et al.*, 1999; PICKETT *et al.*, 2001; AURICH, 2008).

Após a retirada da maior parte da fração sobrenadante o sêmen deve ser gentilmente ressuspenso com o diluente de congelamento, através de suaves movimentos de sucção e ejeção do diluente de congelamento em relação ao pellet (VARNER *et al.*, 1991; SQUIRES *et al.*, 1999; AURICH, 2008).

O volume de diluidor a ser acrescentado deve ser o suficiente para desagregação do pellet, sem, contudo, torná-lo diluído demasiadamente, impossibilitando o ajuste da concentração para o congelamento (LOOMIS, 2006).

Atualmente é quase unânime que a taxa ideal de diluição seminal após a centrifugação deva ser de 200 milhões de células espermáticas/mL (ARRUDA, 2000). NASCIMENTO (2006), através de citometria de fluxo e análise computacional com o uso do programa CASA, obteve melhores resultados em suas avaliações com sêmen congelado de garanhão em palhetas de 0,25 e 0,5 mL com a concentração de 100- 200 milhões de espermatozóides/mL, em relação ao sêmen congelado com 400 milhões de espermatozóides/mL.

Após a adequação da concentração espermática final, o sêmen deve ser envasado. Ao longo dos anos, baseados em trabalhos de pesquisa e rotina de reprodução com a espécie bovina, as descobertas nessa espécie foram extrapoladas para o sêmen de garanhões e jumentos, infelizmente, a uma velocidade mais lenta. Inicialmente, o sêmen de eqüídeos foi congelado em ampolas de vidro (BARKER & GANDIER, 1957; POLGE & MINOTAKIS, 1963),

posteriormente o sêmen foi congelado na forma de pellets (NAGASE *et al.*; 1966 OSHIDA *et al.*, 1967; MERKT *et al.*, 1976); macrotubo ao final da década de 70 (MARTIM *et al.*, 1979) e em alguns países do leste europeu, no mesmo período, o sêmen era congelado em espécies de tubos de alumínio (TRISCHINER, 1979); na década seguinte, de 80, e permanecendo até os dias atuais prevalece o uso da palheta francesa de 0,5 ml (LOOMIS *et al.*, 1983; AMANN & PICKETT, 1987; ARRUDA *et al.*, 1989; PICKETT *et al.*, 2001; ALVARENGA, 2002; LOOMIS, 2006; NASCIMENTO, 2006). OLIVEIRA (2005) trabalhando com sêmen de jumentos, não obteve diferenças significativas, entre o congelamento de sêmen em palhetas francesas de 0,5mL ou em macrotubo de 2,5 mL.

A metodologia de envase em palhetas oferece vantagens em relação aos demais dados à praticidade proporcionada no envase e vedação, identificação permanente, congelamento homogêneo e ser de fácil aquisição, entre outras (ARRUDA *et al.*, 1986; PICKETT *et al.*, 2001).

No processamento do sêmen para o congelamento, inicialmente o mesmo deve ser resfriado da temperatura corporal a temperatura ambiente (37°C para 20°C). Este resfriamento, aparentemente, tem pouco efeito ou nenhum dano sobre a célula espermática desde que um adequado diluidor seja utilizado. No entanto, a temperatura de 19°C a 8 °C, é uma temperatura crítica para o espermatozóide eqüino (KEITH, 1998), provavelmente seja também para sêmen de jumentos. Esta temperatura ocorre quando a membrana espermática está sob a fase de transição do estado líquido cristalino para o estado gel (GRAHAM, 1996).

Caso o sêmen não esteja adequadamente diluído, protegido e resfriado com taxas adequadas, quando estiver sendo resfriado e passando por essa faixa de temperatura, ocorrerá o fenômeno do choque térmico pelo frio caracterizado por perda da motilidade, fertilidade e movimento circular fechado (ALVARENGA, 2002).

Os danos causados pelo choque frio incluem: danos na membrana plasmática em diversos pontos, redução do metabolismo de carboidratos, desbalanço cátio-iônico, perda do conteúdo intracelular como enzimas e lipídios. O acrossomo parece ser essencialmente afetado pelo choque frio,

podendo exibir aumento de volume ou vesiculação e se destacar do segmento equatorial (KEITH, 1998).

O resfriamento do sêmen induz a uma série mudanças na composição e na organização da bicamada lipídica (SQUIRES *et al.*, 1999). Deste modo, quando a temperatura é reduzida, a movimentação lateral dos fosfolipídios se torna mais restrita, exibindo uma transição da fase fluida para gel com formação de arranjos hexagonais (WATSON, 1996).

Alterações físico-químicas das membranas espermáticas, causadas pelo resfriamento, podem ser irreversíveis como: a diminuição da fluidez e aumento na permeabilidade da membrana, danos acrossomais, liberação de enzimas e fosfolipídios, redução na atividade metabólica e no consumo de ATP (FARSTAD, 1996).

As taxas ideais de resfriamento do sêmen eqüino foram demonstradas por VARNER *et al.* (1988), onde os autores observaram que as taxas de resfriamento podem afetar a capacidade de retenção da motilidade.

A faixa de temperatura que o espermatozóide eqüino é mais sensível foi demonstrada por KAYSER *et al.* (1992), onde a equipe demonstrou que nas taxas de resfriamento de 37°C a 20°C, o sêmen pode ser resfriado a altas taxas sem efeitos adversos para a motilidade, contudo, a faixa de 20° a 5°C demonstrou-se como faixa de maior sensibilidade da célula espermática eqüina aos danos induzidos pelo resfriamento, e uma taxa de resfriamento de – 0.05 a – 0.1°C pode maximizar a motilidade.

Em adição ao experimento anterior, MORAN *et al.* (1992) acrescentam que a partir de 19°C a 8°C como sendo realmente a faixa de maior sensibilidade da célula espermática eqüina, e que a partir de 8°C até 5°C o resfriamento pode ser feito rapidamente. Para sêmen de jumentos não encontramos na literatura estudo semelhante de qual seria a faixa de temperatura ao qual o espermatozóide de asinino é mais sensível ao choque térmico pelo frio.

Na faixa de maior susceptibilidade ao choque térmico o sêmen deve ser resfriado gradativamente, as taxas de resfriamento podem ser agrupadas dentro de três categorias: lentas (<0,33°C/min); médias (0,33°C/min a 1,0°C/min) e rápidas (>1,0°C/min) (DOUGLAS-HAMILTON *et al.*, 1984). Porém,

baseados no experimento de FERREIRA (1993), as melhores curvas de resfriamento para asininos em sêmen mantido a 5°C, foram as taxas de - 0,6°C e - 1°C/min, em relação a - 0,3°C/min.

FÜRST (2002) desenvolveu um sistema de resfriamento artesanal ao qual o sêmen de garanhões foi resfriado de 22°C até 8°C, durante 35 minutos, proporcionando uma taxa média de queda de -0,5°C/min, contudo, o sêmen deve, após o resfriamento, permanecer por 25 minutos em geladeira para estabilização prévia ao início do congelamento.

A curva do autor foi utilizada para sêmen de garanhões da raça Bretão e Mangalarga Marchador e apresentou bons resultados de fertilidade em éguas inseminadas até seis horas após a ovulação (FÜRST; 2006).

As células são desafiadas a passar por uma faixa crítica do congelamento após atingirem 8°C, elas serão resfriadas até atingirem a faixa de -15°C para -50°C (MAZUR, 1980). As mudanças celulares que ocorrem durante o congelamento não estão associadas a sua habilidade de se armazenarem em temperaturas muito baixas, mas sim aos efeitos nocivos da passagem por uma faixa de temperatura intermediária (-15°C a -60°C) que a célula atravessa duas vezes, uma durante o congelamento e outra durante o descongelamento (SQUIRES *et al.*, 1999).

Uma vez atravessada esta faixa de temperatura, a atividade metabólica e as reações cessam e as células se tornam dormentes. A viabilidade não é alterada após a célula atingir a temperatura de -196°C (MAZUR, 1980).

O espermatozóide atinge um estágio de anabiose na temperatura do nitrogênio líquido (-196°C). Uma provável explicação para isso é que não existe água líquida ao redor da temperatura de -130°C, pois o estado físico da água está na forma de cristais e nesse estado a viscosidade é alta e a difusão praticamente não ocorre, e em - 196°C não há energia térmica para reação química (KEITH, 1998).

Para os protocolos de congelamento não têm sido estabelecida a curva ideal de congelamento, provavelmente devido à composição extremamente variável do meio diluidor, tipos e concentração de crioprotetores (HEITLAND *et al.*, 1996).

Na maioria dos protocolos atualmente disponíveis para o congelamento é utilizada uma curva de congelamento rápida de  $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , sendo obtida pela exposição das palhetas horizontalmente, três cm acima do vapor de nitrogênio (PAPA, 1987; FÜRST, 2006). Após esta fase o sêmen deve ser então mergulhado no nitrogênio líquido onde pode ser armazenado por período de tempo indeterminado (SQUIRES *et al.*, 1999).

De acordo com FÜRST *et al.* (2005) o protocolo mais largamente empregado para o congelamento de sêmen de garanhão constitui-se da utilização de uma raque, dispositivo ao qual as palhetas são depositadas a 3 cm acima do nível do nitrogênio líquido. Assim, neste sistema o vapor de nitrogênio causará o congelamento do sêmen a uma taxa média de  $-70^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ .

CRISTANELLI *et al.* (1985) demonstrou não haver diferenças significativas nas percentagens de motilidade progressiva nos espermatozoides eqüinos congelados no vapor de nitrogênio a altura de quatro cm, quando comparados com congelamento em congelador automatizado com curvas programadas, utilizando para isto diferentes taxas de congelamento. As curvas realizadas pelo congelador programável foram de  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , da temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  até  $-15^{\circ}\text{C}$ ; e outra curva de  $-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  de  $-15^{\circ}\text{C}$  até  $-120^{\circ}\text{C}$ , quando as palhetas eram mergulhadas no nitrogênio líquido.

Após o congelamento o sêmen deve ser submetido ao descongelamento, que atualmente é feito em banho-maria com água, em temperaturas que variam de acordo com o recipiente de envase utilizado e com a disponibilidade de equipamento.

Para sêmen congelado em palhetas francesas de 0,5 mL, duas recomendações têm sido mais preconizadas: descongelamento a  $37^{\circ}\text{C}/30$  segundos ou de  $75^{\circ}\text{C}/7$  segundos, seguida de imersão em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  (ARRUDA, 2000). Contudo, os resultados de experimentos são contraditórios em qual seriam a melhor temperatura e tempo (DAVIES MOREL, 1999).

Porém, a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  se mostra mais apropriada pela facilidade e menor probabilidade de erros ao descongelamento, além de maior agilidade no descongelamento de múltiplas palhetas (SAMPER *et al.*, 2007). FÜRST *et al.* (2005) avaliaram duas temperaturas de descongelamento para sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, e não observaram diferenças nas

motilidades total e progressiva para a temperatura de 37°C/30 segundos e 75°C/7segundos; porém o vigor espermático médio ao descongelamento foi favorecido na ultima temperatura.

### **2.2.5. Procedimentos utilizados para o congelamento de sêmen de jumentos**

Aparentemente, o primeiro trabalho envolvendo o congelamento de sêmen de jumentos foi realizado por POLGE & MINOTAKIS (1963), em que os autores se utilizaram de diluidor a base de gema de ovo, glicerol e ampolas de vidro como sistema de envase baseados na metodologia de congelamento de sêmen de touros.

KRAUSE & GROVE (1967) avaliaram três meios diluidores no congelamento de sêmen de jumentos e garanhão contendo 1) glicose-gema-de-ovo-glicerol; 2) lactose-gema-glicerol; 3) rafinose-gema-de-ovo-glicerol. Utilizaram a metodologia de pellets baseados em trabalhos de pesquisadores japoneses com sêmen de bovinos (NAGASE & NIWA, 1964).

Após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade e os aspectos macroscópicos e, então, cerca de 10 a 15 minutos após, o sêmen foi diluído e congelado em um dos diluidores a base de gema de ovo e glicerol, sendo que somente a fonte do açúcar foi alterada. Relataram que a motilidade pós-descongelamento variou de 50 a 70%, sendo que no pré-congelamento foi de 70 a 80%. Os autores realizaram a inseminação de duas éguas (cinco serviços) com sêmen de jumento, sendo que uma égua se tornou gestante, enquanto para o sêmen de garanhões duas éguas se tornaram prenhes, após treze serviços, em um total de quatro éguas inseminadas com o sêmen de garanhão.

KREUCHAUF (1984) comparou a metodologia de MARTIM *et al.* (1979), em criotubo alemão do tipo macrotubo com capacidade de 5 mL, com a metodologia de armazenamento na forma de pellet. Para a metodologia do macrotubo o sêmen foi diluído no meio diluidor glicose-gema EDTA, até obter uma concentração final de  $60 \times 10^6$  espermatozoides por mL, então o sêmen foi centrifugado em tubos com capacidade de 10 mL, durante cinco minutos a 500 g em temperatura ambiente. A seguir 9 mL do sobrenadante foram removidos e

3 mL do meio diluidor lactose-gema de MARTIM et al, (1979) foi adicionado ao pellet formado.

Subsequentemente, o sêmen foi envasado em macrotubos e congelado em posição horizontal a 3 cm do nível do nitrogênio líquido. Com a segunda metodologia de pellet, o sêmen foi colhido com vagina aberta adaptado do modelo polonês (TRISCHNER, 1979), empregando os dois primeiros jatos do ejaculado. E a cada 1 mL de sêmen colhido, foi adicionado 3 mL do diluente de NAGASE e GRAHAM (1964) (solução lactose 11% -75,3 mL; gema de ovo 20 mL; e glicerol 4,7 mL).

A seguir gotas de sêmen diluído com capacidade 0,5 mL, foram colocadas em uma placa através de uma pipeta, e foi então congelado em vapor de CO<sub>2</sub> a -79°C, sendo armazenado em um recipiente plástico com capacidade de 100 mL em nitrogênio líquido a -196°C. Seguindo os protocolos de descongelamento preconizados pelos dois métodos, o autor avaliou a motilidade pelos dois métodos e obteve  $44 \pm 7,0\%$  para o primeiro método e  $50 \pm 10,3\%$ , porém sem diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos.

O primeiro estudo com congelamento de sêmen de asininos no Brasil foi descrito por VIEIRA *et al.* (1985). Os autores selecionaram um jumento reprodutor da raça Pêga e um garanhão Puro Sangue Árabe. Os dois reprodutores foram selecionados segundo um critério pré-estabelecido por eles em que o ejaculado deveria apresentar: 300 milhões de espermatozoides por mL, tendo > 70% de motilidade progressiva e patologia espermática total abaixo de 10 a 20% no sêmen fresco, e após todos os procedimentos de congelamento o sêmen deveria apresentar no mínimo 40% de motilidade progressiva para ser considerado aprovado.

Após a coleta, o sêmen foi diluído no meio lactose-gema-EDTA, e em seguida centrifugado a 1000 g durante 5 minutos. Logo após, o pellet foi ressuspenso no mesmo meio utilizado para a centrifugação a uma concentração final de 250 milhões de espermatozoides por palheta francesa de 0,5 mL, e a seguir foi realizado o congelamento.

Os autores realizaram teste de fertilidade em nove éguas na estação de reprodutiva de 1984/1985. O controle folicular foi feito às sete horas e às 18

horas, e com a realização da inseminação artificial real após a ovulação detectada. Momentos antes da inseminação o sêmen foi descongelado a 75°C por sete segundos, e re-diluído em 10 mL, do meio lactose-gema-EDTA, sem o glicerol, e a seguir mantido em banho-maria a 38°C.

E ainda estabeleceram como dose inseminante o número de 400 a 500 milhões de espermatozóides com movimento progressivo, e com a deposição do sêmen realizada intraocornual profunda, ipsilateral a ovulação. Dos 20 ciclos utilizados, uma se tornou gestante no primeiro ciclo, duas se tornaram gestantes no segundo ciclo e três se tornaram gestantes no terceiro ciclo. A taxa de concepção final foi de 66,7%, porém a fertilidade por ciclo foi de 30 %.

ARRUDA *et al.* (1986) utilizaram o diluidor de MARTIM *et al.* (1979), e palhetas francesas de capacidade de 0,5 mL, com um total de 250 milhões de espermatozóides por palheta. Para avaliação da metodologia os autores realizaram a inseminação artificial em 16 ciclos, e ao final foi obtido taxa de prenhes de 44% (7/16 ciclos).

Aparentemente, o maior programa de inseminação artificial de eqüídeos com sêmen congelado de garanhões e jumentos, foi realizado na China, por PIAO *et al.* (1988), onde os autores descrevem inseminação de 89.176 éguas e jumentas sem discriminação do número exato entre cada uma das espécies, no período de 1982 a 1987, sendo que o diluidor utilizado foi a base de gema de ovo e glicerol. A descrição dos procedimentos neste relato retrospectivo está ligeiramente confuso, entretanto os autores relatam altas taxas de fertilidade, porém não precisado por ciclo apenas ao final da estação reprodutiva.

ARRUDA *et al.* (1989) realizaram o congelamento de sêmen de 05/1982 a 09/1985, com um jumento da raça Brasileira, após a colheita o sêmen foi avaliado quanto aos aspectos físicos e de morfologia espermática. O sêmen foi então diluído no meio lactose EDTA gema de ovo e centrifugado a 1000g/ 5 minutos e então novamente ressuspendido e congelado no mesmo diluidor e envasado em palhetas francesas de 0,5 mL, em concentrações que variaram ao longo dos diferentes anos de 250 a 600 milhões de espermatozóides por criotubo.

Os autores obtiveram motilidade média de  $44,26 \pm 10,92\%$  e vigor médio de  $3,85 \pm 0,41$ , em um total de 54 congelamentos/descongelamentos.

ARRUDA *et al.* (1989b) trabalhando com seis garanhões da raça Puro Sangue Árabe e um jumento da raça Brasileira, mantidos como doadores de sêmen para o congelamento na Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos - São Paulo, Brasil, em análise de 148 ejaculados de reprodutores das duas espécies, sendo 29 ejaculados para o jumento e as demais 119 coletas de garanhões, propuseram como sendo valores ideais mínimos para bons resultados de congelamento como: concentração espermática  $\geq 300 \times 10^6$  espermatozoides/mL, motilidade progressiva  $\geq 70\%$  e patologia espermática total  $\leq 25\%$ . Entretanto, apenas o reprodutor asinino e um garanhão atingiram esses níveis mínimos.

SILVA *et al.* (1997) utilizaram seis jumentos da raça Nordestina e mestiços, com idades variando de 3 a 12 anos (cinco ejaculados/reprodutor), sendo o sêmen diluído na proporção de 1:1 no meio glicose-EDTA, e, então, centrifugado a 600 g durante 10 minutos.

O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspendido com o meio diluidor lactose-gema de MARTIM *et al.* (1979). A seguir o sêmen foi igualmente dividido em dois sistemas de criotubos, o macrotubo com capacidade para 4 mL proposto pelos autores anteriores e uma espécie de tubo retangular do tipo creme dental com capacidade de 10 mL. Ambos os criotubos tiveram a concentração espermática ajustada para 100 milhões de espermatozoides/mL.

Os autores realizaram a comparação entre os criotubos através da motilidade e vigor, no teste de termo-resistência longo de 240 minutos e através da morfologia espermática. Os autores não observaram diferenças, estatisticamente significativas, entre os dois criotubos.

Na França TRIMECHE *et al.* (1996) realizaram o congelamento de sêmen de jumentos da raça Poitou, com o meio INRA 82 (PALMER, 1984) modificado, contendo 2 % de gema de ovo de codorna e 4% de glicerol. Os autores realizaram a adição do aminoácido glutamina ao meio diluidor modificado nas concentrações de 80, 120 ou 240 mM.

A seguir, os autores realizaram avaliação computadorizada da motilidade após o descongelamento, e os resultados foram que a adição de glutamina na concentração de 80 mM melhorou significativamente, a motilidade

pós-descongelamento e que a medida que se aumentou a concentração de glutamina piores foram os resultados de motilidade pós-descongelamento.

Na hipótese formulada pelos autores a glutamina atuaria aumentando a osmolaridade do meio e também atuando em processos metabólicos da célula espermática asinina diferente do mecanismo de ação de crioprotetores convencionais.

Análises e comparações na composição química entre a gema de ovo de galinha (GOG) e gema de ovo de cordona (GOC) foram feitas por TRIMECHE *et al.* (1997). Neste estudo, os autores observaram que a GOC e GOG, possuem composição semelhantes, entretanto, a primeira possui maior proporção de fosfatidilcolina e menor proporção de fosfatidiletanolamina, além de menor taxa de ácidos graxos poli-insaturados.

Embasados nestas diferenças os autores realizaram o congelamento de sêmen de jumentos da raça Poitou, no meio INRA 82 contendo 4% de glicerol e diferentes concentrações de gema de ovo dos dois tipos. Após feitas às avaliações objetivas de motilidade pelo programa CASA, registraram os melhores resultados para o sêmen congelado contendo 10% de GOC.

Em trabalho relevante na literatura TRIMECHE *et al.* (1998) relataram o nascimento do primeiro jumento nascido no mundo proveniente de sêmen congelado. Para isso os autores utilizaram uma série de procedimentos ligeiramente diferentes para os preconizados na época. O sêmen de quatro jumentos da raça Poitou (4 a 8 anos) foi colhido com vagina artificial três vezes por semana. Após a coleta o sêmen foi filtrado e diluído a temperatura de 34°C com solução crioprotetora em um dos meios descritos na seqüência, até se obter uma concentração final de 60 milhões de espermatozóides por mililitro.

Os diluidores usados foram: 1) meio basal (contendo 126,2 mM de glicose; 4,2 mM lactose; 2,5 mM rafinose; 1 mM de citrato de sódio; 1,3 mM citrato de potássio; 4% de glicerol ; 2% de gema de ovo de cordona; 83,3 mg de penicilina e 100 mg de gentamicina, 1 litro de leite desnatado e 1 litro de água destilada), este meio apresentou uma osmolaridade média de 288 mOsm/Kg; 2) meio basal adicionado de 80 mM de L-glutamina, com osmolaridade final no diluidor de 370 mOsm/kg; 3) meio basal mais 10% de gema de ovo (centrifugada 15.000 g/15 minutos) com osmolaridade final no diluidor: 290 mOsm/Kg; e 4) meio basal mais a adição de 80 mM de L-

glutamina, acrescido de 10 % de gema de ovo (centrifugada 15.000 g/15 minutos) sendo a osmolaridade final neste diluidor de 375 mOsm/Kg.

O sêmen após a diluição foi resfriado de 34°C até 4°C em tubos de capacidade 30 mL em um refrigerador programável a uma taxa de - 0,5°C por minuto. O sêmen foi então envasado em palhetas francesas de 0,5 mL e congelado a 10 cm do vapor de nitrogênio por 10 minutos, e então submergido no nitrogênio líquido a -196°C. Os autores avaliaram a viabilidade espermática através da integridade de membrana e dos parâmetros de motilidade. Na combinação dos resultados obteve-se os melhores resultados com o diluidor de numero 4 ao qual foi denominado por eles de T2-94.

A seguir no mesmo estudo o referido diluidor T2-94, foi utilizado para teste de fertilidade em 13 jumentas divididas em dois grupos, um grupo com seis e outro com sete jumentas. Cada grupo foi inseminado com o meio T2-94 com a remoção do glicerol pós-descongelamento ou sem a remoção do glicerol pós-descongelamento a cada ciclo.

No total quatro ciclos foram usados, e ao final de cada ciclo as jumentas de cada grupo foram alternadas entre os dois tratamentos do sêmen e à medida que se tornavam gestantes foram retiradas do experimento. Imediatamente antes da inseminação o sêmen foi descongelado a 37°C por 30 segundos, em banho-maria. As jumentas foram inseminadas diariamente com 600 milhões de espermatozoides, a partir da detecção de um folículo de 30 mm até a detecção da ovulação.

No total 38 ciclos foram usados, sendo 21 ciclos usados com o grupo que o glicerol havia sido removido (adição de 10 mL do próprio T2-94- grupo desglicerolização) e 17 ciclos com o glicerol (sem desglicerolização), no grupo onde o glicerol não foi removido não foram obtidas gestações (0/17 ciclos). A taxa de concepção final por ciclo foi de 21,05%, enquanto se considerarmos somente os tratamentos a taxa de concepção do grupo ao qual o glicerol foi removido obteve-se uma taxa de fertilidade de 38,09% (8/21 ciclos).

VIDAMENT *et al.* (2005), relata que em 1997, o sêmen de quatro jumentas da raça Baudet du Poitou foi congelado com bons resultados de motilidade utilizando a técnica francesa de congelamento de sêmen de eqüinos preconizada por VIDAMENT *et al.* (2000). O sêmen foi então utilizado na inseminação artificial de éguas e jumentas, e os resultados de fertilidade foram

considerados muito baixos, de um total de 34 jumentas inseminadas somente 12% se tornaram gestantes, enquanto que em 48 ciclos de éguas, somente 35% se tornaram gestantes.

PAPA *et al.* (1999) congelaram sêmen de um jumento da raça Pêga, comparando a metodologia descrita por MARTIM *et al.* (1979), com uma nova metodologia desenvolvida pelo grupo através do uso de um diluidor denominado M9H.

O referido novo meio consistia de uma mistura do meio proposto por MARTIM *et al.* (1979), acrescido do meio de KENNEY *et al.* (1975) e do meio de cultivo celular BME (Basal Medium Eagle). Após a coleta, o sêmen foi diluído a uma proporção de 1:1 com uma solução contendo (50% KENNEY *et al.* 1975 e 50% de Ringer lactato), e em seguida centrifugado a 600 g durante cinco minutos.

Após o desprezo do sobrenadante o pellet foi ressuspenso em um dos dois diluidores descritos e então congelado, contendo 100 milhões de espermatozoides a cada palheta francesa de 0,5 mL. A seguir, foi realizado o teste de fertilidade e somente amostras com motilidade superior a 50%, 70% de retenção de acrossoma e vigor três foi utilizado. Os autores realizaram a inseminação de três éguas da raça Mangalarga as 36 e 48 horas após a indução com 2500 UI de hCG, a partir da detecção de um folículo ovulatório de 35 mm. Aos 14 e 21 dias realizaram o diagnóstico de gestação e duas éguas se tornaram gestantes.

ALVAREZ *et al.* (2004), em trabalho com jumentos da raça Zamorano-Leonés, avaliaram diferentes concentrações de dimetilformamida e metilacetamida, variando de 2,5 a 5% de concentração final, sendo que o grupo controle foi feito pelo grupo contendo 2,5% glicerol.

Por análises dos parâmetros de motilidade com o programa CASA e a integridade de membrana, avaliado com o teste hiposmótico (HOST), e integridade de acrossoma por citometria de fluxo com uso da sonda fluorescente (FITC-PSA), os autores concluíram que dimetilformamida ao nível de 5% apresentou os melhores resultados conjuntamente para todos os testes.

Estudos com sêmen de jumentos Zamorano-Leonés do mesmo grupo anterior foram conduzidos por SERRES *et al.* (2004), neste ensaio os autores

compararam duas concentrações de glicerol 2,5% e 5% de glicerol no diluidor de BURNS & BURNS (1992) e no diluidor de MARTIM *et al.* (1979).

O primeiro diluidor é feito à base de uma mistura do segundo diluidor com o diluidor de mínima contaminação de KENNEY *et al.* (1975). Para avaliação dos diluidores e diferentes concentrações de glicerol os autores realizaram avaliação da motilidade espermática pelo programa CASA, integridade acrossomal (FITC-PSA) por citometria de fluxo e integridade de membrana pelo HOST.

Independente do diluidor, a concentração de 2,5% de glicerol demonstrou melhores efeitos sob os parâmetros avaliados, enquanto que o diluidor de MARTIM *et al.* (1979) demonstrou-se superior ao primeiro diluidor.

OLIVEIRA (2005) conduziu um amplo experimento para avaliar o efeito de dois sistemas de envasamento de sêmen (macrotubo de 2,5 ml e palheta francesa 0,5 mL) e diferentes crioprotetores. Com esses dois sistemas o autor utilizou o diluente MP 50 (PAPA *et al.*, 2002) e variou 10 diferentes combinações de crioprotetores (1: 2% dimetilsulfóxido e 2% dimetilformamida; 2: 3% de dimetilformamida; 3: 2% de metilformamida; e 2% de glicerol; 4: 2% de dimetil acetamida e 2% de glicerol; 5: 3% de metil formamida; 6: 3 % de dimetil acetamida; 7: 3% de glicerol e 2% de dimetil acetamida; 8: 3% de glicerol e 2% de dimetil formamida; 9: 3% de dimetil sulfóxido e 2% de glicerol; e 10: 1% de etilenoglicol + 3% dimetil sulfóxido e 1% dimetil formamida).

Para as avaliações de motilidade o autor utilizou análise objetiva pelo Hamilton Thorne e teste de microscopias com fluorescência, e para o teste de fertilidade foram inseminadas 53 jumentas e 10 éguas. Nas avaliações *in vitro* não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) entre os dois sistemas de envase.

Feitas as avaliações pós-descongelamento de análise objetiva da motilidade com o programa CASA, o autor observou que a melhor formulação de crioprotetor foi a base de acetamida. Nos testes de fertilidade quatro das 10 éguas inseminadas se tornaram gestante, enquanto no grupo de jumentas nenhuma se tornou gestante.

VIDAMENT *et al.* (2005) conduziram experimento com dois jumentos da raça francesa Baudet du Poitou na Central Francesa de Reprodução da raça. Para isso utilizou o protocolo francês de congelamento, com uso do meio

diluidor INRA 82 acrescido de 2% de gema de ovo, para o resfriamento até 22°C e centrifugação por 10 minutos.

Após a centrifugação o sêmen foi ressuscitado em meio INRA 82 acrescido de 2% de gema de ovo dividido em dois tratamentos, um diluidor acrescido de 2,5 % de glicerol e a outra parte com o mesmo diluidor, porém com 2,5% de dimetilformamida.

A partir da ressuspensão o sêmen foi resfriado por 1 hora e 15 minutos a 4°C e somente então envasado em palhetas francesas de 0,5 mL, e então congelado em congelador programável a - 60°C/min. O descongelamento foi realizado a 37°C/30 minutos. A motilidade pós-descongelamento foi de 54 e 74% para o diluidor com glicerol e dimetilformamida, respectivamente ( $p>0.05$ ). Foram realizadas inseminações com 400 milhões de espermatozóides com movimento progressivo, pré e pós-ovulação. A fertilidade por ciclo foi muito baixa e similar entre os dois crioprotetores, 0/16 e 2/19, respectivamente ( $p>0.05$ ) (jumento 1: 0/7 e 1/10 respectivamente, jumento 2: 0/9 e 1/9 respectivamente).

ALVAREZ *et al.* (2006) realizaram estudos para avaliar o efeito da adição de colesterol carregado por ciclodextrina para congelamento de sêmen de jumentos da raça espanhola Zamorano-Leonés. Os autores incubaram o sêmen por 15 minutos a 20 ou 37 °C, em concentrações que variaram 0; 1,5; 2,0; 2,5; ou 3 mg ciclodextrina-glicerol/120x10<sup>6</sup> espermatozóides. A seguir o sêmen foi congelado em meio diluidor de MARTIM *et al.* (1979) contendo 2,5% de glicerol. Para a avaliação do congelamento os autores utilizaram análise de objetiva da motilidade pelo programa CASA; pelo HOST; e pela coloração com iodeto de propídio e FITC-PSA e avaliação em citometria de fluxo. Baseados nos valores obtidos nos testes o autores concluíram que a melhor temperatura para a adição de colesterol com uso de ciclodextrina foi de 20°C e a melhor concentração de ciclodextrina glicerol foi de 2,0mg/120 milhões de espermatozóides.

Em recente estudo VIDAMENT colaboradores (2008) avaliaram diferentes concentrações de crioprotetores sobre a fertilidade de sêmen congelado de jumentos das raças Baudet du Poitou, Grand Noir du Berry e Pyénéen, baseados na metodologia francesa de congelamento de sêmen de garanhões descrita por VIDAMENT *et al.* (2000). No experimento 2 deste

estudo os autores utilizaram sêmen de seis jumentos Poitou, utilizando o meio INRA 82 contendo 2,2% de volume de glicerol e glutamina (sêmen de 4 jumentos) e sem glutamina (sêmen de 2 jumentos).

Para avaliação da fertilidade de campo 25 éguas (50 ciclos) e 22 jumentas (38 ciclos) foram inseminadas duas vezes, 24 e 48 horas antes da ovulação, com 800 milhões de espermatozóides moveis totais. Após 50 ciclos de éguas e 38 ciclos de jumentas somente 36% (18/50) e 11% (4/38) dos ciclos resultaram em prenhes, foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, nas taxas de concepção entre espécies.

No experimento de número 8 do mesmo estudo os autores utilizaram sêmen de cinco jumentos da raça Poitou em meio INRA 82 contendo glicerol e glutamina, e o sêmen de outros dois jumentos da mesma raça contendo glicerol e sem glutamina.

Neste experimento após o descongelamento 10 mL de leite desnatado foi adicionado ao conteúdo de 8 palhetas (400 milhões de espermatozóides/mL), ainda neste experimento, para o teste de fertilidade, os autores realizaram a inseminação de 11 jumentas Poitou, por um ou dois ciclos.

Como grupo controle para o experimento 8 os autores utilizaram sêmen de um reprodutor Poitou e um Grand Noir Berry, congelado em meio diluidor INRA 82 contendo glicerol (grupo controle). O sêmen dos dois últimos reprodutores foi diluído em 11 mL de leite a 35°C (9 palhetas-400 milhões/mL), após a diluição o sêmen foi centrifugado em dois tubos de ensaio com capacidade de 15 mL, após a centrifugação o pellet foi ressuspensionado em 4mL de leite a 22°C e a seguir seis jumentas mestiças (2 a 3 ciclos/fêmea) foram inseminadas com 400 milhões de espermatozóides, 24 e 48 horas, antes da ovulação com o volume referido. Neste experimento as taxas de gestação registradas foram 0% (0/15); 0% (0/8) e 13% (1/8) respectivamente para os grupos ressuspensão com leite, grupo controle e grupo com centrifugação e ressuspensão em leite.

No experimento de número 9 o sêmen de dois jumentos Poitou, foi dividido em duas porções e congelados em meio diluidor contendo 2,1% de glicerol ou com 2,2% de dimetilformamida. A seguir após o descongelamento somente partidas contendo acima de 35% de espermatozóides com velocidade rápida foram utilizados para a inseminação de sete jumentas mestiças (3

ciclos) e doze jumentas Poitou (1 ou 2 ciclos), as taxas de concepção registradas foram 0% (0/16) e 11% (3/28), respectivamente, para os grupos contendo 2,1% de concentração de glicerol e 2,2% de dimetilformamida.

Em conclusão, os autores sugerem que a alta concentração de glicerol tem efeito deletério sobre espermatozoides de jumentos e que os níveis altos foram marcadamente mais nocivos quando o sêmen congelado de jumento foi utilizado na inseminação pré-ovulação. Os autores ainda consideram que uma possível interação glicerol diluidor, a base de leite, e aparelho genital da jumenta possam ter ocorrido.

### **2.3. Fertilidade e perda embrionária em eqüídeos**

Para que o processo de fecundação ocorra é necessário que os espermatozoides e ovócito(s), se encontrem na ampola da tuba uterina, e para isso é de crucial importância que ambos tenham completado seu processo de maturação (CURRY, 2000, SENGER, 2003).

De acordo com o mesmo autor para determinadas espécies cujas fêmeas são ovuladoras induzidas como a gata e a coelha, a deposição do sêmen e ovulação ocorrem de modo sincronizado, permitindo assim a maturação do gameta feminino e masculino, entretanto para fêmeas como a égua que apresenta longos intervalos de estro e a cobertura pode ocorrer antes ou após a ovulação, e assim não ocorre sincronismo e desta forma a deposição espermática no genital feminino e os estágios de maturação gamética poderão estar diferentes, fazendo com que a fecundação não ocorra.

A ampla variação possível entre o momento ovulatório e a deposição no genital, demanda que o espermatozoide permaneça viável no aparelho genital por um período de tempo prolongado para que no momento da ovulação seja possível o encontro de duas células a masculinas e a feminina viável (CURRY, 2000).

O mesmo autor em revisão comenta que uma estratégia utilizada por espécies que apresentam longos períodos de estro, seria apresentação de populações heterogêneas no ejaculado ou seja populações espermáticas em diferentes estágios, que estariam aptas a fecundação no genital feminino em diferentes momentos, o que poderia propiciar maior oportunidade para a

fecundação, desta maneira o ejaculado de um único reprodutor atua como ejaculado heterospérmico, como se fosse provenientes de ejaculados diferentes. MIRRÓ *et al.* (2005) em estudos conduzidos com sêmen de jumentos da raça Catalã, identificaram quatro sub-populações espermáticas com diferentes padrões de motilidade, fato confirmado recentemente em estudo conduzido com sêmen congelado de jumentos espanhóis por FLORES *et al.* (2008).

O processo de criopreservação reduz a diversidade das populações espermáticas, e ela pode tanto causar a seleção de populações resistentes ao congelamento, como pode eliminar a população mais sensível, sem que isso seja necessário que haja promoção da fertilidade (CURRY, 2000).

Inúmeros fatores afetam o sucesso da IA com sêmen congelado em eqüídeos, tais como variabilidade entre ganhões que pode ser incriminado como uma das maiores fontes de variação; mas também as metodologias de processamento, técnicas de avaliação, protocolos de descongelamento, sistemas de envase e tempo de inseminação (SAMPER & MORRIS, 1998).

O congelamento de sêmen trás consigo uma redução nas taxas de fertilidade quando comparado ao sêmen fresco (KLOPPE *et al.*, 1988). A redução na taxa de fertilidade está relacionada com danos e alterações funcionais induzidos pelo congelamento descongelamento principalmente nas membranas espermáticas (PARKS & GRAHAM, 1992).

O congelamento de sêmen segundo CURRY (2000), reduz a fertilidade do sêmen não somente pelos efeitos nocivos diretos a célula espermática, mas por induzirem a perda de proteínas importante para a fixação da célula espermática ao reservatório espermático, portanto isto seria responsável pela menor longevidade da célula espermática no genital feminino proveniente de sêmen congelado.

Porém, de acordo com SAMPER & MORRIS, (1998), o sucesso nas taxas de prenhes não é apenas dependente das alterações induzidas ao descongelamento, mas sim da interação entre três grandes fatores: 1) qualidade do sêmen após o congelamento e descongelamento; 2) fertilidade inerente das éguas e 3) manejo das éguas utilizadas no programa de inseminação.

O garanhão tem sido incriminado por alguns estudos como a mais importante fonte de variação, e o manejo da égua submetida a um programa de IA com sêmen congelado foi considerado como o segundo fator mais importante apontado por diversos laboratórios do mundo (SAMPER & MORRIS, 1998).

Além disso, SAMPER e colaboradores (2007) comentam que embora teoricamente todas as éguas possam ser utilizadas para IA com sêmen congelado, sugere como mais apropriado que somente éguas reprodutivamente normais I ou II-A na classificação de KENNEY & DOIG (1986) deveriam ser usadas para essa finalidade. Citam ainda que éguas no cio do potro, éguas que sabidamente tem atraso na limpeza uterina, éguas que estão a alguns anos sem parir, éguas com baixo escore de condição corporal e idosas, devem ser evitadas seu uso para receberem sêmen congelado e de preferência não utilizadas.

Em um amplo em um estudo de campo retrospectivo utilizando sêmen congelado, com 2289 inseminações simples em 1161 éguas, e com 213 garanhões, obtido de quatorze centrais IA de eqüinos pelo mundo (Canadá, Chile, Inglaterra, Finlândia, França e Estados Unidos), foi evidenciado que doadoras com idade igual ou superior a oito anos apresentam as mais baixas taxas de prenhes (SAMPER *et al.*, 2002).

A IA com sêmen congelado, seis horas após, resultou em mais alta concentração de neutrófilos intra-uterino em relação ao sêmen fresco (médias: 59 versus 5 milhões neutrófilos/MI,  $p < 0.05$ , respectivamente) (KOTILAINEN *et al.*, 1994). O mesmo grupo de autores também encontrou mais alta contagem de neutrófilos com o uso de sêmen fresco concentrado, e concluíram que a contagem de neutrófilos é mais dependente da concentração espermática elevada do que propriamente o congelamento.

A fertilidade é uma equação multifatorial dependente do estado reprodutivo da fêmea (idade, fertilidade intrínseca, doenças uterinas), do macho (coleta e processamento do sêmen, manejo a monta, fertilidade intrínseca) e do manejo ao qual os mesmos foram submetidos (AMANN & PICKETT 1987; GRAHAM, 1996; KEITH, 1998; AMANN, 2006).

A espécie eqüina é conhecida por apresentar as piores taxas de eficiência reprodutiva (BOYLE, 2001; PYCOCK, 2005). As perdas embrionárias são grandes responsáveis pela baixa eficiência reprodutiva na maioria dos haras (SOUZA, 2007; RICKETTS, 2005). Apesar de não haver uma definição universal do termo perda embrionária em éguas, a melhor definição seria aquelas perdas gestacionais que ocorrem até 40 dias após a fecundação, correspondendo ao período de transição do estágio embrionário para o fetal (GINTHER, 1992).

Diversos fatores podem contribuir para a perda embrionária, e de acordo com VANDERWALL & NEWCOMBE (2007) de modo geral podem ser agrupados em fatores intrínsecos, extrínsecos e embrionários.

Estes mesmos autores consideram como sendo fatores: 1) intrínsecos: doenças endometriais, deficiência progesterônica, idade maternal avançada, lactação, serviços no cio do potro e tempo de inseminação em relação à ovulação; 2) extrínsecos: estresse, nutrição materna, estação e efeitos climáticos, manipulação do gameta feminino e do sêmen; e 3) Fator embrionário: anomalias cromossômicas e outras características inerentes ao embrião. Éguas idosas, assim como subnutridas são mais propensas a apresentarem perdas gestacionais; embora ocorram perdas durante a gestação avançada, a maior parte das perdas gestacionais ocorre na gestação inicial (BALL, 2000; PYCOCK, 2005).

De acordo com os estudos registrados na literatura a incidência de perda embrionária varia entre 5% e 75% (BALL, 1993). Sob condições de campo, a detecção de perda embrionária entre o 12º e 40º dia de gestação ocorrem na ordem de 10 a 15% em éguas jovens, e 25% a 30% em éguas idosas (VANDERWALL & NEWCOMBE, 2007). WOODS *et al.* (1990) demonstraram que inseminações realizadas após a ovulação resultam em maiores taxas de perdas embrionárias.

Em éguas híidas com ciclos normais, após a chegada no útero, o embrião encontrará um ambiente adequado a sua sobrevivência e ao estabelecimento da gestação (GINTHER, 1992). Em oposição, éguas ditas susceptíveis, o embrião poderá encontrar ambiente uterino desfavorável a sua sobrevivência devido ao processo inflamatório instalado.

Desta forma, se esse processo não for suficientemente letal ao embrião, poderá ocasionar atraso no desenvolvimento embrionário após a chegada ao útero e deficiente mecanismo de sinalização endometrial e, assim, consequentemente retorno ao estro em média 16 dias após a ovulação (LEBLANC, 2003). Neste caso, ao ser realizado o diagnóstico de gestação aos 13 dias a vesícula embrionária será visualizada, entretanto haverá perda desta gestação com o retorno ao estro dois a três dias após o diagnóstico de gestação (PYCOCK, 2007).

Após a chegada do embrião ao útero, é necessária a sua participação ativa para realizar o reconhecimento materno da gestação para evitar que a égua retorne ao estro, e para que isto aconteça se faz necessário que o mesmo detenha a capacidade de produzir estrogênio (ALLEN, 2000) e ou inibir a ciclooxigenase 2 (COX -2) (BOERBOOM *et al.*, 2004).

A produção de estrogênio pelo embrião eqüino é importante, pois de acordo com a hipótese a produção a partir do 10º dia pós-ovulação, promove a luteostase por redirecionamento do fluxo endometrial de  $PGF_{2\alpha}$  para longe dos vasos venosos de drenagem uterina e, assim, poderia constituir o sinal do reconhecimento materno da gestação em eqüinos (ALLEN, 2005; KENNEDY *et al.*, 2007).

Outra teoria registrada na literatura é que o embrião tem a capacidade de regular a expressão de receptores de ocitocina entre os dias 10 e 16 pós-ovulação, isto faria com que a produção de prostaglandina fosse diminuída (ALLEN, 2000). BOERBOOM *et al.* (2004) questionam a última teoria, na concepção dos autores o mecanismo de luteostase estaria mais correlacionado com o bloqueio da produção de prostaglandina ao nível da enzima COX2, do que pela diminuição da expressão de receptores de ocitocina.

Os efeitos inibitórios do concepto sobre a produção de prostaglandinas endometriais são transitórios, o que exige que a interação seja repetida ou contínua com todo o endométrio para suprimir a sua produção (EVANS *et al.*, 2007). Devido ao fato da  $PGF_{2\alpha}$  uterina atingir o corpo lúteo da égua, principalmente, via circulação sistêmica, o embrião precisa interagir com a superfície de ambos os cornos e com o corpo uterino para garantir a manutenção do corpo lúteo (GINTHER, 1992).

A interação do embrião com o epitélio endometrial materno ocorre através da mobilidade embrionária. Acredita-se que a mobilidade embrionária seja possível graças a ação de duas prostaglandinas, PGF2alfa e PGI2, produzidas e liberadas no meio uterino pelo embrião.

A PGF2alfa e PGI2 possuem atividade estimulatória antagônica. Enquanto a primeira determina a contração, a segunda determina o relaxamento, assim à alternância da secreção destes dois hormônios, relaxando e contraindo, permitiria a mobilidade embrionária, especialmente mais intensa e provavelmente mais importante entre os dias 11 e 16 pós-ovulação, sendo que durante este período o embrião muda de local 10 a 20 vezes/dia (GINTHER, 1995, 1998; ALLEN, 2000).

Após o 16º dia depois da ovulação a vesícula embrionária inicia o processo de fixação na base da junção corpo/corno uterino. Isto ocorre pelo aumento de diâmetro do tônus uterino próximo a esta data e pelo aumento de diâmetro da vesícula a partir deste momento (GINTHER, 1992).

Ao dar início ao processo de fixação a vesícula estará em contato íntimo com o endométrio, assim muitas substâncias produzidas pelo trofoblasto embrionário como fatores mitogênicos e de crescimento (IGF-I e II), se acumulam nas células epiteliais do endométrio.

Desta forma, estes fatores parecem serem capazes de regular o crescimento endometrial e/ou embrionário, auxiliando na captação de glicose, estimulando a síntese protéica, diminuindo a apoptose e estimulando a proliferação celular (HERRLER *et al.*, 2000). Além disto, neste estudo, demonstrou-se que o conceptoo eqüino expressa IGFBP-3 a partir do 10º dia pós-ovulação, e a secreção deste tipo de proteína ligadora pode ser importante na regulação de IGF-I e, conseqüentemente, regulação do crescimento embrionário.

Diferente das outras espécies mamíferas, devido à necessidade do reconhecimento materno da gestação na espécie, o embrião eqüino apresenta cápsula embrionária. Inicialmente, esta é baseada em células da granulosa e zona pelúcida. Por volta do 6º dia pós-ovulação se inicia a formação de nova cápsula glicoprotéica mucinosa anti-adesiva, derivada de produtos do conceptoo que se desenvolve entre a zona pelúcida e o trofoblasto (GINTHER, 1992).

Estudos conduzidos por STOUT *et al.* (2008) demonstraram que esta cápsula é importante para a sobrevivência embrionária, pois a remoção desta estrutura esteve associada com perda embrionária. Esta cápsula aumenta entre o 10º e 18º dia pós-ovulação cerca de 20 vezes em volume e começa a desintegrar a partir do 20º dia, vindo a completar o processo ao 21º dia pós-ovulação (GINTHER, 1998).

A presença de IGBP-3 foi demonstrada por HERRLER *et al.* (2000) na cápsula embrionária de concepto eqüino entre o 10º e o 16º dia pós-ovulação. A presença deste fator na cápsula modularia o crescimento embrionário e conseqüentemente a sinalização materna da gestação poderia ser melhor realizada.

Após o processo de fixação iniciado no 16º dia pós-ovulação, o embrião se manterá em íntimo contato com o endométrio, contudo o processo de implantação embrionária somente ocorrerá ao redor do 40º dia pós-ovulação e, durante este período de fase embrionária, ou seja, na pré-implantação, a vesícula é unicamente dependente da secreção trofoblástica, denominada “leite uterino” (GINTHER, 1998).

É provável que durante este período caso a égua seja submetida a condições de subnutrição ocorra menor produção de leite uterino, assim conseqüentemente menor captação de glicose e menor desenvolvimento embrionário, assim aumentando a probabilidade de ocorrência de perda embrionária (HERRLER *et al.*, 2000; PYCOCK, 2007).

De acordo com ALLEN & SHORT (1997) o ambiente uterino também desempenha papel relevante no desenvolvimento do concepto mular, pois além deste fator o embrião dependente do seu genótipo para crescimento. Estudos têm demonstrado inúmeras diferenças do crescimento embrionário e fetal de acordo com o ambiente uterino bem como com suas inter-relações entre as espécies e o genótipo.

O produto mular de acordo com ALLEN & SHORT (1997) e BOETA & ZARCO (2005), possui uma menor capacidade de produção de eCG, devido ao menor número e diâmetro dos cálices endometriais, o que pode explicar as maiores probabilidades de perdas gestacionais no terço inicial da gestação por ser essa característica ser dependente do genótipo; além disto nos estágios

iniciais o embrião híbrido apresenta menor diâmetro, podendo esta característica ser uma das responsáveis pela não sinalização endometrial que poderá ocasionar perda embrionária.

Inseminações realizadas após a ovulação têm como conseqüências embriões de tamanho reduzido, provavelmente vesículas de menor dimensão teriam menor capacidade para bloquear a luteólise, menor produção hormonal e reduzida mobilidade embrionária (HUHTINEN *et al.*, 1996). Justificando os achados de WOODS colaboradores (1990), que demonstraram que coberturas ou inseminações realizadas após a ovulação causariam maiores taxas de perdas embrionárias.

Conjuntamente aos fatores inerentes ao ambiente uterino, o plano nutricional quantitativo e qualitativo exerce papel fundamental na eficiência reprodutiva e perda embrionária (HENNEKE *et al.*, 1984; VAN NIERK & VAN NIERK, 1998). GINTHER (1992) aponta a subnutrição como responsável pela diminuição da produção de histiotrofos pelas células endometriais.

O mesmo autor relata que no período correspondente da fecundação até 40º dia pós-ovulação, o embrião depende para sua sobrevivência, das secreções do aparelho genital, e caso a nutrição materna seja alterada, haverá uma diminuição na produção deste fluido histiotrófico. A subnutrição poderia afetar a expressão de IGF-I pelo tecido endometrial, uma vez que conforme demonstrado por GENTRY *et al.* (2002) éguas com baixo plano nutricional por um período curto como seis semanas, apresentam menor concentração de IGF-I, prolactina, leptina e glicose circulante. O IGF-I é importante para o crescimento embrionário inicial (HERRLER *et al.* 2000).

Outros autores demonstraram que a restrição alimentar com oferecimento de 50% das exigências nutricionais dentro de 24 horas foi responsável pela diminuição de IGF-I circulante (STICKER *et al.*, 1995). Da mesma forma, éguas mesmo em boas condições corporais, após uma restrição tão curta quanto 12 horas apresentam diminuição na concentração de insulina, GH, glicose e leptina circulantes (BUFF *et al.*, 2006).

A subnutrição pode afetar a liberação de LH. Esse hormônio na égua, assim como em outros mamíferos, é de relevância para a nutrição do corpo lúteo e secreção adequada de progesterona. Desta maneira, a nutrição

deficitária poderá causar a diminuição da secreção deste hormônio pela adenohipófise (GINTHER, 1992; ALLEN, 2005).

A literatura aponta a nutrição como sendo um fator extrínseco de relevância para a reprodução, assim para que seja maximizada a eficiência reprodutiva e minimizada a perda embrionária se faz necessário que a alimentação seja fornecida quantitativa e qualitativamente em níveis adequados (VANDERWALL & NEWCOMBE, 2007).

Um estudo clássico da importância da nutrição na fertilidade e perda embrionária foi conduzido por HENNEKE e colaboradores (1984), com éguas da raça Quarto de Milha. Eles dividiram igualmente 32 éguas prenhes, e para cada grupo de oito éguas foi designado um tratamento de condição nutricional diferente que proporcionou um incremento ou decréscimo ou manutenção no escore de condição corporal (ECC) seja no pré ou no pós-parto.

As éguas foram assim dispostas: T1) Manutenção de alto ECC de 90 dias pré-parto até 90 dias pós-parto; T2) Manutenção de alto ECC de 90 dias pré-parto até o parto, e a seguir manutenção de baixo ECC até 90 dias pós-parto; T3) Manutenção de baixo ECC 90 dias pré-parto até 90 dias pós parto; e T4) baixa condição corporal 90 dias pré-parto e dieta de incremento do ECC até 90 dias pós-parto. Para a classificação de ECC os autores utilizaram uma classificação previamente proposta por eles (HENNEKE *et al.*, 1983), que varia de uma escala de 1 a 9 para eqüinos.

Ao início do experimento o ECC de todas as éguas estivera entre 6,0 a 6,7. Ao parto o ECC do T1 foi de 5,5; T2 de 7,5; do T3 de 3,4 e do T4 de 3,8. Aos 90 dias pós-parto os ECC foram de: 7,1; 4,7; 3,7; e 6,8 respectivamente para T1 a T4. As éguas não foram inseminadas no cio do potro, somente no estro subsequente, até no máximo de três ciclos até os 90 dias pós-parição.

Os resultados do estudo demonstraram profundo efeito da nutrição na fertilidade e perda embrionária. As éguas do T3 mantiveram baixa ECC, e apresentaram as mais baixas taxas de prenhez e as mais altas taxas de perda embrionária entre 30 e 90 dias (75%) se comparado com os outros três grupos, que foi de 0 a 12%. Além disso, éguas que apresentaram ECC abaixo de 5, nenhuma se tornou prenhe até os 90 dias pós-parto.

VAN NIERK & VAN NIERK (1998) conduziram um estudo no intuito de averiguar o efeito do consumo total e da qualidade de proteína dietética em éguas lactante e não lactantes. Éguas pertencentes ao grupo alimentado com proteína de baixa qualidade apresentaram 35,7% de taxa de perda embrionária (5/14) entre os dias 14 e 40 da gestação se comparado com apenas 7,31% (3/41) do grupo de éguas que receberam proteína de boa qualidade.

O jejum pode interferir no perfil endócrino-metabólico e, conseqüentemente, com a eficiência de manutenção da gestação. VAN NIEEKERK (1965) constatou elevadas taxas de perda embrionária em éguas submetidas à restrição alimentar pós-concepção dentro de um período crítico de tempo, compreendido entre 25 e 31 dias pós-concepção.

Um dos pontos críticos do manejo reprodutivo da égua que corrobora juntamente a higidez uterina e o plano nutricional para o aumento da taxa de perda gestacional é o momento da cobertura da égua (SOUZA, 2007).

As inseminações realizadas após a ovulação, independente do tipo de sêmen utilizado (fresco, resfriado ou congelado), levam ao aparecimento de embriões de tamanho reduzido (VANDERWALL & WOODS, 1990; NEWCOMBE, 2000) que possuem menor capacidade de sinalização embrionária materna e conseqüentemente, estão associados com maiores taxas de perda embrionária (WOODS *et al.*, 1990).

Além disto, a inseminação artificial realizada após a ovulação é uma metodologia que deve ser evitada, pois propicia elevados custos com o emprego da inseminação de uma determinada égua, além de elevado número de manejos, pois a égua deve ser palpada frequentemente (BOYLE, 2001; VIDAMENT, 2005).

A inseminação artificial com sêmen congelado deve ser realizada o mais próximo possível ao momento ovulatório uma vez que o sêmen congelado apresenta tempo médio de viabilidade no genital reduzido, se comparado a sêmen fresco (*in natura* ou diluído) ou resfriado (BOYLE, 2001), ocasionado pela perda de proteínas da capacidade de ligação as células da tuba uterina, responsáveis pela formação do reservatório espermático (DOBRINSKI *et al.*, 1995).

O congelamento de sêmen pode afetar adversamente o DNA do espermatozóide (LOVE & KENNEY, 1998), e quando o embrião atingir a fase de 25 a 35 dias, na qual depende de determinado grupo de genes paternos para expressar seu pleno desenvolvimento e dos envoltórios embrionários, pode ocorrer perda gestacional, uma vez que o desenvolvimento placentário é determinado por alelos paternos (PERECIN, 2007).

A criopreservação pode também afetar genes associados com a produção de IGFBP-3; uma vez que esta proteína teve sua importância determinada no embrião eqüino por ser relevante à sobrevivência embrionária, pois se expressa na cápsula embrionária, que é responsável pela captação de IGF-1, importante para o crescimento embrionário durante este período pré-implantação (ALLEN, 2000; 2005).

A idade da égua é um aspecto fundamental a ser considerado no estudo da perda embrionária. SAMPER *et al.*, (2002) em estudo retrospectivo com resultados de inseminações com sêmen congelado em 11 países, registraram que éguas com idade igual ou superiores há oito anos devem, se possível, não ser utilizadas para receberem sêmen congelado, uma vez que apresentaram os piores resultados de eficiência reprodutiva. Igualmente, HEARN *et al.* (1993), em estudos retrospectivos de três estações reprodutivas com 700 éguas da raça Puro Sangue de Inglês (PSI) nos Estados Unidos, registraram que éguas idosas (12 a 23 anos) têm duas a três vezes maiores probabilidades de apresentarem perda embrionária.

Da mesma forma, na avaliação da fertilidade de 1988 a 2002, de 178 éguas pôneis da raça Jeju (idade média 2 a 28 anos), registrou-se declínio da fertilidade para éguas com idade superior a oito anos, e resultados ainda mais baixos foram registrados em éguas idosas, com média superior a 19-20 anos (JEONG *et al.*, 2004).

Em estudo de campo da eficiência reprodutiva de 1144 éguas (1911 ciclos) da raça Puro Sangue Inglês em 21 haras do Reino Unido, sob condição de manejo reprodutivo intensivo, registrou-se que éguas com idade igual ou superior a 14 anos requereram maior número de coberturas para cada prenhez, maior percentual de tratamento uterino por cada ciclo estral, maior taxa de perda embrionária e apresentaram menores taxas de gestação ao final da estação reprodutiva (MORRIS & ALLEN, 2002).

ALLEN *et al.* (2007) conduziram amplo estudo retrospectivo da eficiência reprodutiva em éguas PSI na Inglaterra, foram avaliadas 3373 éguas pertencentes a diferentes categorias reprodutivas e idades por 5005 ciclos. Após o agrupamento por idade registrou-se que éguas com idade superior a 13-14 anos apresentaram os piores resultados de eficiência reprodutiva (maior taxa de perda embrionária, maiores perdas fetais, maior número de serviços por concepção, piores taxas de prenhes ao final da estação reprodutiva).

Na maioria dos programas de transferência de embriões observa-se alto percentual de éguas idosas, e nestas éguas registram-se os piores resultados reprodutivos devido a distúrbios na ovulação, maturação oocitária e/ou endometrite crônica (LOSINNO & ALVARENGA, 2006).

EIGENHEER-MOREIRA *et al.* (2007) realizaram estudo comparativo da histologia endometrial em éguas (3-23 anos) das raças Mangalarga Marchador e Campolina envolvidas em programas de transferência de embriões, classificadas com base no histórico reprodutivo como repetidoras de cio (n = 25) sendo 15 doadoras e 10 receptoras de embrião; e não repetidoras de cio (n = 11) sendo quatro éguas doadoras e sete receptoras.

Os autores registraram correlação entre o histórico de sub-fertilidade (perda embrionária) e os achados histopatológicos. Houve uma correlação positiva entre a idade e a subfertilidade, assim, quanto mais velha a égua, maior a subfertilidade, e correlação entre a categoria da biópsia e a subfertilidade, ou seja, quanto mais alterações histológicas, maiores as chances da égua ser sub-fértil.

As raças eqüinas de médio-grande porte, apresentam maiores dimensões de aparelho genital, e assim tem maior probabilidade de acumularem fluido intra-uterino (LEBLANC, 2003), principalmente no local de fixação (16ºdia) e implantação embrionária (40ºdia) (GINTHER, 1998). Éguas da raça Campolina apresentam útero pendulosos e de grande volume se comparados a outras raças como Mangalarga Marchador e Quarto de Milha.

Aparentemente ocorre deslocamento da cavidade pélvica para abdominal mais precocemente, mesmo em éguas jovens, em relação às outras raças onde esse processo está mais relacionado com o envelhecimento e com manifestação mais tardia.

Éguas em condições nutricionais insatisfatórias perdem a capacidade de sustentação de tecidos do aparelho reprodutivo caudal e, assim, maior frequência de útero penduloso. Corroborando com estes achados, ZÚCCARI (1990) em estudo de campo conduzido com éguas da raça Campolina no estado de Minas Gerais, registrou em suas avaliações baixa eficiência reprodutiva. Quando este mesmo autor contrastou seus resultados com relatos da literatura, utilizando fêmeas de outras raças, constatou baixas taxas de prenhes no plantel de estudo, além de elevadas taxas de éguas acíclicas e baixa eficiência da prenhes por inseminação.

Juntamente ao que fora supracitado, a degeneração vascular endometrial também contribui para o atraso na limpeza uterina. Esclerose das veias, arteríolas e artérias como elastose, fibrose, fibroelastose, fibrose perivascular e processos de calcificação têm sido notadas em biópsias endometriais obtidas de éguas com acúmulo anormal de fluído intrauterino.

A angiose parece reduzir, indiretamente, a fertilidade por meio da menor perfusão endometrial e por distúrbio na drenagem uterina, causadas pela reduzida função das veias e dos vasos linfáticos (linfangiectasia endometrial) que, conseqüentemente, levam à persistência do edema endometrial, formando as lacunas linfáticas (LEBLANC, 2003; RICKETTS, 2005).

A fixação da vesícula embrionária comumente ocorre na junção corpo-corno uterino (GINTHER, 1992), e este local coincide com a localização mais comum para a ocorrência de cistos, o que pode causar inadequada implantação embrionária resultante de insuficiente fluxo sanguíneo e oferta de nutrientes, conduzindo a perda embrionária (STANTON *et al.*, 2004). A severidade das lesões aumenta com a idade e com o número de partos e por conseqüência o aumento de probabilidade de perdas embrionárias (LEBLANC, 2003; RICKETTS, 2005; WATSON, 2005).

#### **2.4. Avaliação do sêmen congelado de eqüídeos**

As avaliações padrões quando utilizadas isoladamente apresentam valor limitado para a predição da qualidade seminal. Neste sentido, clínicos e pesquisadores têm buscado inovações e testes laboratoriais que apresentem boa capacidade de predição da fertilidade real do sêmen, e que possam ser

utilizados conjuntamente com as análises padrões e de preferência que seja facilmente exeqüível (AMANN, 1989).

Ao longo das décadas, diversas tem sido as metodologias utilizadas para a avaliação do sêmen, numa tentativa de predizer a qualidade entre estes, sendo que atualmente as análises padrões são: motilidade espermática total e motilidade progressiva, vigor espermático, morfologia espermática, concentração espermática e como variantes tem sido utilizados: integridade membranas (acrossoma, mitocondrial, citoplasmática, nuclear) através de sondas fluorescentes, análise computacional e morfológica e de movimento espermático, teste de termo resistência, coloração eosina nigrosina, teste hiposmótico e teste de fertilidade (PAPA, 1987; ARRUDA, 2000; NEID *et al.*, 2000; FÜST, 2002; AVARENGA, 2002).

A integridade funcional da membrana plasmática da célula espermática é de relevância para que haja o desencadeamento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na fecundação (capacitação, reação acrossômica, fusão do espermatozóide com ovócito) (MAFFILI *et al.*, 2003; SIQUEIRA *et al.*, 2007), e para a manutenção e sobrevivência espermática no genital feminino (SQUIRES *et al.*, 1999).

Na tentativa de avaliar a funcionalidade de membrana plasmática de células espermáticas JEYENDRAN *et al.* (1984) propuseram o uso do teste de estresse hiposmótico (HOST). Após o trabalho inicial este teste tem sido usado com sucesso na avaliação do sêmen de garanhão (NEILD *et al.*, 1999; FÜRST, 2002; MELO *et al.*, 2005), bode (FONSECA *et al.*, 2004) touros (ROTA *et al.*, 2000) e jumentos (TRIMECHE *et al.*, 1996). É considerado um método simples e acessível que pode ser utilizado em adição as avaliações rotineiras (NEID *et al.*, 2000).

O HOST é usado para avaliar a integridade de membrana, baseado no fato que ocorre a passagem e transporte semi-seletivo de substâncias através da membrana, e que o mesmo ocorre com a passagem de água até que haja equilíbrio no gradiente de pressão osmótico (DAVIES-MOREL, 1999; MELO, 1999).

Se uma célula espermática é colocada em uma solução hiposmótica menor que 290 mosm, ocorrerá a passagem de fluido do meio externo para o

meio intracelular até que sejam igualadas a osmolaridade, o que resulta em ingurgitamento da cabeça e principalmente na região das fibras na cauda resultando em dobramento da mesma. Espermatozóides com membrana intacta ocorre o dobramento da cauda. Quanto maior o número de espermatozóides reagidos melhor e mais funcionalmente estarão as membranas (DAVIES-MOREL, 1999; SIQUEIRA *et al.*, 2007).

De acordo com MELO (1999) HOST é um teste simples de fácil execução, mas alguns pontos devem ser levados em consideração para torná-lo um teste de alta confiabilidade e de maior praticidade de execução tais como: soluto, osmolaridade da solução, cálculo das caudas reagidas, incubação em estufa ou banho-maria, fixação ou não do material e tipo de fixador, aumento do contraste de fase em que foram realizados os exames e o número de células contadas.

Os estudos com HOST em diversas espécies de animais domésticos têm apresentado resultados contraditórios em testes de correlação com fertilidade de acordo com os diversos autores: SIQUEIRA *et al.* (2007) encontraram correlação média baixa ( $r^2=0,23$ ) para sêmen de touros congelado/descongelado; enquanto REVELL & MRODE (1994) encontraram correlação de 0,79 entre HOST e taxa de gestação em bovinos; NIE *et al.* (2002) encontrou correlação de 0,33 entre o HOST e os resultados de fertilidade de campo para sêmen de garanhão.

Na literatura, poucos trabalhos com HOST tiveram seu foco sêmen de jumentos, TRIMECHE *et al.* (1998) trabalhando com uma solução de 150 mOsmol de frutose citrato registrou um percentual de espermatozóides reagidos variando de 47,6 a 64,8 % para sêmen congelado e 73,8 % para sêmen fresco de animais da raça francesa Poitou. Já SERRES *et al.* (2002) trabalhando com sêmen resfriado de jumentos da raça espanhola Zamorano-Leonés, registraram percentual de espermatozóides reagentes ao HOST variando de 20 a 65%, em solução hiposmótica de acordo com os autores anteriores.

MIRÓ *et al.* (2005) trabalhando com jumentos da raça espanhola da raça Catalão utilizou o HOST como teste complementar em um complexo estudo sobre características de sub-populações espermáticas no ejaculado. Para isso os autores utilizaram uma diluição em uma solução base de frutose e citrato de

sódio em duas etapas a primeira diluição isosmótica (solução 300 mOsm) e a segunda solução hiposmótica (150 mOsm).

O tempo de incubação dispendido pelos autores foi de 20 minutos, e ao final obtiveram apenas 24 % de células reagindo ao teste, não registrou correlação significativas entre o teste e avaliação da motilidade subjetiva e computacional. Concluíram que o HOST não foi capaz de prever características de viabilidade de membrana espermática com a metodologia empregada.

ALVAREZ *et al.* (2006) utilizaram o HOST para avaliação de sêmen congelado de jumentos da raça Zamorano-Leonés, o sêmen foi congelado em diluidor a base de MARTIM *et al.*, (1979) e os autores realizaram a adição de colesterol ao meio diluidor pela incorporação com uso de ciclo-dextrina, e concluíram que o HOST não foi um bom teste para avaliação da integridade de membrana, para o tipo de metodologia empregada.

NEID *et al.* (2000) em trabalho com duas populações de garanhões com histórico reprodutivo de boa e sub-fertilidade, observaram grandes diferenças entre morfologia espermática, motilidade espermática e resposta ao HOST. Concluem que o referido teste pode ser empregado e para como método auxiliar para a avaliação do sêmen fresco de garanhões.

VIDAMENT *et al.* (1998) em estudo conduzido com sêmen de garanhões registrou uma série de vantagens e correlações do uso do HOST para a espécie e concluíram que o HOST pode ser representativo entre ejaculados de um mesmo garanhão, em oposição a motilidade do sêmen fresco que somente é representativa de um determinado ejaculado. O HOST pode ser utilizado como preditor da capacidade de congelamento de sêmen.

A coloração de eosina nigrosina, conhecida como uma das colorações denominadas de coloração supravital, e ou coloração vivos e mortos, consiste a utilização de corantes derivados da fluoresceína, sendo que a eosina é o mais utilizado e pode ser adicionada de um corante de fundo como a nigrosina (FÜRST, 2002; BJÖRNDAHL *et al.*, 2004).

De acordo com SWANSON & BEARDEN (1951) citam que diversos corantes foram utilizados para sêmen animal desde o final da década de 30 início da década de 40. Entretanto, BLOM (1950) desenvolveu trabalho diferencial na literatura sobre o uso de corantes para avaliação da viabilidade

de sêmen de touros, o autor empregou a eosina como corante, e a nigrosina como corante contraste.

A mistura destes dois corantes resultou em um preparado uniforme e com colorações homogêneas para células mortas, e não coradas células vivas consideras células vivas. O autor registrou que a nigrosina foi superior ao outros corantes por se distribuir mais homoganeamente e se misturar menos ao plasma seminal, por esta razão pode ser utilizado para sêmen em meio a base de gema de ovo sem se misturar.

A solução de eosina nigrosina foi avaliada pelos autores quantos aos níveis de cada um dos componentes e quanto ao uso de tampões por SWANSON & BERDERN (1951) e os autores concluíram que a solução mais estável e que melhor avaliou a integridade de membrana foi composta de 1 grama de eosina, 5 mg de nigrosina, e 3% de citrato de sódio em 100 mL de água destilada estéril.

Na avaliação do sêmen a motilidade fornece informações sobre as células vivas que estão móveis, enquanto com o uso de colorações diferenciais entre vivos e mortos pode providenciar informações de células que estejam vivas, mas sem apresentarem motilidade (BJÖRNDAHL *et al.*, 2004).

FÜRST e colaboradores (2005) em estudo de uma curva de resfriamento para o congelamento de sêmen de garanhões, e duas temperaturas de descongelamento de sêmen, verificaram que o teste de eosina nigrosina foi capaz de indicar diferenças entre as metodologias de congelamento com e sem curva de resfriamento, entretanto se mostrou semelhantes entre as duas temperaturas de descongelamento.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Animais

O experimento foi realizado em dois locais, no haras 1 em Guaraciaba e no setor de eqüideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa – Haras 2 em Viçosa, ambas as cidades estão próximas e localizadas na Zona da Mata de Minas Gerais.

O estudo foi realizado em três períodos: 1) fase pré-experimental: maio a agosto de 2006, no haras 1, com período de adaptação dos reprodutores ao regime de coleta de sêmen; 2) Fase de congelamento de sêmen e avaliação laboratorial dos procedimentos (setembro-dezembro/2006); e 3) Teste de fertilidade, realizado em duas fases distintas: haras 2 (novembro-dezembro/2006) e haras 1 (janeiro-fevereiro/2007).

Para o congelamento foi utilizado cinco ejaculados de cinco jumentos da raça Pêga (J1; J2; J3; J4; J5;) com idades de 16 e 14 para J1 e J2 e 3.5 anos os três demais reprodutores, respectivamente, pesando em média  $278 \pm 34,97$  kg (244 – 326 kg), pertencentes ao haras 1.

Previamente ao início, todos os animais foram submetidos a exame andrológico de acordo com o preconizado por KENNEY *et al.* (1983), para garantões, sendo que todos foram classificados como aptos à reprodução. A seguir realizou-se o esgotamento das reservas espermáticas extra-gonadais, através de seis coletas diárias ou monta natural em égua.

Os jumentos foram mantidos em baias de alvenaria individuais com cama de serragem. Foram fornecidos ad libitum água, sal mineral comercial

para eqüinos e fenod de capim (*Cynodon dactylon* cv. Tifton 85). Além disto, foram oferecidos 20 kg/animal de capim fresco picado (*Pennisetum purpureum* cv Elefante), divididos em dois tratos diários.

### 3.2. Procedimentos

Para as coletas de sêmen foi utilizada vagina artificial modelo, com égua em estro como manequim conforme descrito no capítulo I. Imediatamente após a colheita realizou-se a filtragem e separação das frações do sêmen, e a seguir procedeu-se a avaliação física do sêmen (motilidade total, progressiva, vigor espermático, concentração) de acordo com KENNEY *et al.* (1983) e CBRA (1998) além da retirada de amostra para análise da morfologia espermática posta em solução de formol salina tamponada HANCOCK (1957) aquecida a 37°C, para posterior análise em câmara úmida, sendo na seqüência os defeitos espermáticos arranjados de acordo com a classificação de BLOM (1973).

Na seqüência o sêmen foi diluído, na proporção de igual volume, de uma parte de sêmen para uma parte do meio diluidor de KENNEY *et al.* (1975), e igualmente dividido em tubos de ensaio graduados de 15 mL (fundo cônico), centrifugado a 600g por 15 minutos.

Após a centrifugação o sobrenadante foi removido, e o pellet formado foi cuidadosamente ressuspenso em dois diluidores de congelamento de sêmen: diluidor 1 (Meio diluidor de MARTIM *et al.* (1979)) e diluidor 2 (Meio diluidor de NAGASE & NIWA (1964), modificado com adição de orvus-es-paste (OEP) (lauril sulfato de sódio) na proporção de 0,08 mL, para cada 20 mL de gema de ovo) (Quadros 1 e 2).

O sêmen foi ressuspenso gentilmente com auxílio de uma pipeta automática (1000 µL). O volume de diluidor acrescentado foi o suficiente para atingir uma concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Em seguida, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL.

As palhetas foram depositadas em um dispositivo especial, resfriadas a 5°C e estabilizadas de acordo com a metodologia descrita por FÜRST *et al.* (2005). Imediatamente antes do congelamento, uma palheta de cada diluidor foi retirada para realização da avaliação subjetiva da motilidade (total e progressiva), vigor espermático, coloração de eosina nigrosina e teste

hiposmótico. Antes da realização destas avaliações as palhetas foram mantidas por 5 minutos em banho-maria a 37 °C.

O congelamento foi feito pela técnica manual em caixa de isotérmica de isopor (FÜRST *et al.*, 2005). O descongelamento para as avaliações seminais e da inseminação artificial foram realizadas a 37°C/30 segundos.

Foi utilizada a coloração espermática diferencial de eosina nigrosina citrato com a solução de BLOM (1950) modificado por SWANSON & BEARDEN (1951) (Quadro 3), para o sêmen fresco antes da diluição, para o sêmen resfriado e para o sêmen congelado. A técnica empregada consistiu da contagem de 200 células em esfregaço e quantificação em percentual, sendo que os espermatozoides com membrana íntegra não se coraram com a eosina, enquanto os mortos apresentaram núcleos vermelhos (FÜRST *et al.*, 2005).

**Quadro 1:** Meio Diluidor de MARTIM *et al.* (1979)

<b>Solução I</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
D(+) glicose mono hidratada	6,0g
Citrato de Sódio	0,375g
EDTA	0,370 g
Bicarbonato de Sódio	0,125 g
Penicilina procaína	50 UI
H <sub>2</sub> O bidestilada deionizada (q.s.p.)	100 mL
<b>Solução II: Diluidor de Martim et al, (1979)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Solução Lactose 11%	50 mL
Solução I	25 mL
Gema de Ovo	20 mL
Orvus-Es-paste	0,08 mL
Glicerol	5,0 ml
Volume Final	100,08 mL

**Quadro 2:** Meio Diluidor de Congelamento NAGASE & NIWA, (1964) modificado

<b>Solução Lactose 11%</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Lactose	11g
H <sub>2</sub> O bidestilada deionizada (q.s.p.)	100 mL

<b>Solução Final Diluidor de Nagase &amp; Niwa (1964) modificado</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Solução de Lactose 11%	75 mL
Gema de Ovo	20 mL
Glicerol	5,0 mL
Orvus-Es-paste	0,08ml
Penicilina	50 UI
Volume Final	100,08 mL

Para o teste HOST, utilizou-se uma gota de 10 $\mu$ L de sêmen em 1 mL solução de sacarose 100 mosml (Quadro 4), incubados por 60 min/37°C e fixado com 0,5 mL de solução de formol salino de HANCOCK (1957) para posterior avaliação, baseado nas metodologias de MELO (1999) e FÜRST, (2002).

Na interpretação dos resultados utilizou-se o diagrama utilizado para sêmen caprino extraído de FONSECA *et al.* (2005). O cálculo da reação de HOST foi feito por intermédio da seguinte fórmula: HOST= (% Caudas dobradas pós teste) – (% Caudas dobradas prévio ao Teste).

**Quadro 3:** Solução hiposmótica

<b>Solução I: Sacarose 300 mOsm/kg</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Sacarose	10,2g
H <sub>2</sub> O bidestilada deionizada (q.s.p.)	100 mL

<b>Solução II: Sacarose 100 mOsm/kg</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Solução I	100 mL
H <sub>2</sub> O bidestilada deionizada	200 mL
Volume Final	300 mL

Para o teste de fertilidade foram utilizadas 30 éguas (39 ciclos) da raça Campolina pertencentes ao haras 1 e 20 éguas (21 ciclos) mestiças pertencentes ao haras 2 com peso médio de 392 kg. Em ambos os haras as éguas pertenciam a diferentes categorias reprodutivas (em lactação, falhadas de estações anteriores e potras).

No haras 2 as foram manejadas sob condições de pastagens nativas e semi cultivada de *Melinis multifloras* (cv Gordura), com quantidade e qualidade variáveis, e suplementadas com mistura mineral específica para eqüinos.

Nos momentos de incremento da freqüência de acompanhamento do crescimento folicular, receberam suplementação com capim fresco picado de *Pennisetum purpureum* (cv Cameron). No haras 1 as éguas foram alimentadas sob condições de pastagens cultivadas de *Cynodon dactylon* (cv Tifton 85), com qualidade e disponibilidade variáveis, e suplementadas com suplemento mineral comercial específico para eqüinos.

O controle folicular foi realizado através de rufiações, palpação trans-retal e exames ultra-sonográficos (probe linear de 5MHz - Scan Pie Medical® 480) do genital, com intervalos de 48 a 72 horas de acordo com as características apresentadas nestas avaliações iniciais. Quando da constatação do estro e de um ou mais folículos de 25mm de diâmetro, o intervalo entre exames (ultra-sonografico e palpação trans retal) foi reduzido para 24 horas. Na presença de um folículo de 35 mm em um dos ovários, os intervalos de acompanhamento do desenvolvimento folicular foram reduzidos para seis horas até a detecção da ovulação.

Detectada a ovulação, a égua foi contida em tronco específico para eqüinos, e preparada para receber a IA até 6 horas após a ovulação. Neste momento, procedeu-se o descongelamento das palhetas de sêmen a 37°C.

De acordo com cada partida de sêmen um número mínimo de palhetas foi descongelado, no intuito de atingir a dose de 300 milhões de espermatozóides com movimento progressivo e vigor espermático 3.

A inseminação artificial foi feita com uso de pipeta longa de 75 cm semi-flexível com auxílio de haste metálica específica para IA em eqüinos com palheta de 0,5 mL. A deposição do sêmen foi intra-cornual profunda ipsilateral

a ovulação. Apenas uma única inseminação artificial foi realizada a cada ciclo, e apenas o sêmen de três jumentos (J3, J5 e J6) foi empregado.

As inseminações foram igualmente divididas, sendo 20 inseminações para cada reprodutor, com 10 para cada diluidor (Diluidor 1 e 2). No haras 2 os acasalamentos entre jumentos e éguas foram realizados de modo aleatório, enquanto no haras 1 o esquema de acasalamento utilizado foi o da propriedade sem interferência da equipe do estudo. Após a IA se realizou o diagnóstico de gestação aos 13, 25 e 35 dias com palpação trans-retal e aparelho de ultra-sonografia com probe linear de 5 MHz (Scan Pie Medical 480).

### **3.3. Análises estatísticas**

Para as análises estatísticas empregaram-se o programa estatístico SAEG 9,1 (Sistema de Análises Genéticas e Estatística – UFV) (SAEG –UFV, 2007). Foram efetuados cálculos da média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação dos resultados obtidos para cada variável avaliada, por reprodutor e para o grupo experimental.

Correlações simples e de Pearson foram realizadas entre todas as variáveis estudadas. Para as variáveis qualitativas, efetuam-se os testes de Lillinfors e Cochran e Bartlett para verificar a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias dos grupos, respectivamente.

Aqueles dados que não atenderam a premissa da ANOVA, foram submetidos à análise não paramétrica e as médias comparadas pelos testes de Kruskal Wallis ou Wilcoxon com probabilidade de erro de 5%. As variáveis que atenderam a pelo menos uma premissa, foram submetidos a análise de variância por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro. Para as comparações das taxas de gestação foi empregado o teste qui-quadrado.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores registrados para as características seminais e testes complementares do sêmen encontram-se na tabela 1.

A motilidade total (MOTT) (média  $\pm$  desvio padrão) para o sêmen fresco foi de  $85,20 \pm 6,84\%$ , e para o sêmen resfriado foi de  $78,00 \pm 6,12\%$  e  $80,00 \pm 6,45\%$  para o diluidor 1 e diluidor 2 respectivamente.

Observou-se ligeiro decréscimo da motilidade total em relação ao sêmen fresco de 2 a 7%, o que pode ser um indicativo que todos os procedimentos precedentes como: diluição inicial (meio de Kenney), centrifugação (600g/15 minutos), resuspensão nos meios diluidores de congelamento, envasamento (palheta 0,5 mL), resfriamento (35 minutos, - 0,5°C/minuto) e a estabilização (25 minutos) com o dispositivo desenvolvido por FÜRST *et al.* (2005), foram eficientes em preservar a motilidade total, uma vez que este decréscimo foi considerado baixo, do mesmo modo como foi registrado pelos mesmo autores em estudos com sêmen de garanhões.

Nas comparações entre os estágios do sêmen a MOTT variou com as fases de processamento (fresco, resfriamento, congelamento), porém não houve diferenças entre os diluidores, para sêmen resfriado e congelado/descongelado ( $P > 0,05$ ).

Os resultados para a motilidade total progressiva (MOTP) (média  $\pm$  desvio padrão) foi de  $75,60 \pm 6,6\%$  para sêmen fresco. Para o sêmen resfriado foi de  $70,40 \pm 5,93\%$  e de  $71,20 \pm 6,81\%$  para o diluidor 1 e 2 respectivamente;

e para o sêmen descongelado, na mesma ordem de  $30,80 \pm 4,25$  e  $32,00 \pm 3,22\%$ .

De forma semelhante à MOTT, a motilidade progressiva no sêmen resfriado teve redução de 4 a 5% em relação ao sêmen fresco, demonstrando que os procedimentos realizados, provavelmente foram capazes de proteger a célula espermática na faixa de choque térmico pelo frio preconizado para o espermatozóide de garanhões (KAYSER et al., 1992).

KREUCHAUF (1984), utilizando criotubos de 5mL, compararam o sêmen congelado no diluidor de MARTIM et al. (1979) com o sêmen congelado em micro-pellets (técnica empregada para sêmen de touros) em placas com uso do diluidor de NAGASE & GRAHAM (1964) de formulação muito próxima ao diluidor original de NAGASE & NIWA (1964).

As taxas de motilidade observados foram de 44 e 50 % ( $p>0,05$ ) e não foram diferentes entre o diluidor de MARTIM et al. (1979) e o de NAGASE & GRAHAM (1964) respectivamente. Estas taxas foram superiores às encontradas no presente estudo onde as motilidades total e progressiva foram: de  $37,40 \pm 3,57$  e  $32,00 \pm 3,22$ ; e de  $37,32 \pm 5,91$  e  $30,80 \pm 4,25$  para o diluidor de Martim et al., (1979) e NAGASE & NIWA (1964) modificado em ordem respectivamente.

Além disto, no presente estudo, não foi praticado nenhum tipo de seleção de ejaculados e nem de reprodutores o que pode explicar os menores valores encontrados para o sêmen congelado e descongelado.

Os valores médios de MOTT e MOTP foram semelhantes aos registrados por SILVA et al. (1997) ao redor de 40% no congelamento de sêmen jumentos empregando o meio diluidor de MARTIM et al. (1979), com dois sistemas de criotubos: macrotubo (5mL) e sistema adaptado (10 mL).

O valor médio do vigor espermático para sêmen fresco foi de  $4,08 \pm 0,49$ , enquanto para o sêmen resfriado estabilizado foi de  $4,00 \pm 0,50$  no meio diluidor 1 e de  $4,00 \pm 0,50$ , para o diluidor 2 ( $p>0,05$ ). Para o sêmen congelado o vigor espermático obtido foi de  $3,49 \pm 0,79$  E DE  $3,32 \pm 0,28$  ( $p>0,05$ ) na mesma ordem anterior. Como é esperado, em ordem, o vigor espermático no sêmen fresco foi maior que o vigor espermático médio para sêmen resfriado (porem muito semelhantes) e para o sêmen congelado/descongelado.

**Tabela 1:** Valores Médios  $\pm$  Desvio Padrão da variação da Motilidade Total, Motilidade Progressiva, Percentual de espermatozóides reagidos no HOST, e do percentual da coloração eosina-nigrosina em diferentes fases do processamento do Sêmen (fresco, resfriado e congelado/descongelado) em dois diluidores seminais no ejaculado de cinco reprodutores asininos da raça Pêga.

Fase	<b>Varição (%) de acordo com a fase de processamento do sêmen e diluidor</b>				
	MOTT (%)*	MOTP (%)*	VIG (1-5)**	HOST (%)*	EOS (%)*
SF	85,20 $\pm$ 6,84A	75,60 $\pm$ 6,66A	4,08 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	51,16 $\pm$ 6,89A	85,00 $\pm$ 4,86A
SRM	78,00 $\pm$ 6,12B	70,40 $\pm$ 5,93B	4,00 $\pm$ 0,50 <sup>abc</sup>	44,69 $\pm$ 5,14AB	81,16 $\pm$ 5,11B
SRN	80,00 $\pm$ 6,45B	71,20 $\pm$ 6,81B	4,00 $\pm$ 0,50 <sup>ab</sup>	45,16 $\pm$ 5,95A	83,24 $\pm$ 5,00B
SCM	37,32 $\pm$ 5,91C	30,80 $\pm$ 4,25C	3,49 $\pm$ 0,79 <sup>abcd</sup>	42,56 $\pm$ 5,04C	75,96 $\pm$ 5,69B
SCN	37,40 $\pm$ 3,57C	32,00 $\pm$ 3,22C	3,32 $\pm$ 0,28 <sup>abcd</sup>	42,62 $\pm$ 5,11BC	77,48 $\pm$ 4,83B

SF: Sêmen Fresco; SRN: Sêmen Resfriado Estabilizado no Diluidor de Nagase e Niwa (1964) modificado; SRM: Sêmen Resfriado Estabilizado no Diluidor de Martim et al, (1979); VIG: Vigor espermático; HOST: Percentual de células reagidas ao Teste de Estresse Hiposmótico; EOS: Percentual de Células Reagidas a Percentual de células vivas pela Coloração Diferencial de Eosina Nigrosina; MOTT: Motilidade Espermática Total (%); MOTP: Motilidade Espermática Progressiva (%); VIG: Vigor espermático (1-5); EOS: Coloração diferencial Eosina Nigrosina (%); HOST: Teste de Estresse Hiposmótico (%). \*P>0,05 com ANOVA e teste de TUKEY com probabilidade de erro de 5%. \*\*Diferentes letras na mesma coluna indicam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis (P>0,05).

O vigor espermático de acordo com PAPA (1987) é um dos pontos fundamentais para avaliação de sêmen congelado de garanhões. Os valores para o vigor espermático médio registrados, no presente estudo, para o sêmen congelado/descongelado foram muito similares ao observado por outros autores em trabalhos conduzidos com sêmen congelado/descongelado de garanhões em diferentes metodologias (MARTIM *et al.*, 1979; PAPA, 1987; FÜRST *et al.*, 2005; FÜRST, 2006) e para o sêmen de jumentos

congelado/descongelado no meio diluidor de MARTIM *et al.*, (1979) envasado em macrotubo e tubo de creme dental adaptado (SILVA *et al.*, 1997). Os valores de vigor espermático médio também foram semelhantes aos valores registrados por MELLO *et al.* (2000) com sêmen resfriado de jumentos, quando estes autores somente utilizaram a fração rica em espermatozóides ou com o sêmen total.

Baseado nos achados do presente experimento para os valores de vigor espermático médio, pode se fazer inferência sobre a maquinaria do metabolismo energético, que a mesma foi provavelmente preservada.

Os resultados registrados para o teste hiposmótico (HOST) (tabela 1). Foi de  $51,16 \pm 6,89\%$  para o sêmen fresco. Para o sêmen resfriado foram de  $44,69 \pm 5,1\%$  diluidor 1 e de  $45,16 \pm 5,95\%$  diluidor 2. Os valores para o sêmen congelado foram de  $42,56 \pm 5,04\%$  e  $42,62 \pm 5,11\%$  respectivamente para o diluidor 1 e 2.

Não foram registradas diferenças ao HOST entre sêmen fresco e resfriado/estabilizado para os meios diluidores, e nem entre os dois diluidores ( $P > 0,05$ ). A variação da resposta percentual de células espermática reagidas ao HOST do sêmen fresco até sêmen congelado/descongelado foi muito baixa, em torno de 11%. Esta resposta foi provavelmente por consequência das diferentes sub-populações espermáticas presentes no ejaculado de jumentos, que apresentaram melhor taxa de sobrevivência ao congelamento/descongelamento.

De acordo com estudos recentes, estão presentes no ejaculado diferentes sub-populações com características distintas de sobrevivência ao congelamento (Flores *et al.*, 2008). MIRRÓ *et al.* (2005) e FLORES *et al.* (2008) registraram a presença de 4 sub-populações em ejaculados de jumentos da raça Catalã, no sêmen fresco e resfriado e congelado.

A importância do HOST foi demonstrada por VIDAMENT *et al.* (1998) e MELO (1999). Esses pesquisadores registraram alta correlação entre espermatozóides reagidos ao HOST com motilidade espermática para garanhões. No presente estudo a correlação com HOST e motilidade progressiva para o sêmen congelado/descongelado foi média e positiva ( $r = 0,53$  e  $r = 0,51$ , para o diluidor 1 e 2 respectivamente).

Com relação à fase do processamento, não foi observado correlação ( $r = 0,038$ ) entre o vigor espermático e fase do processamento do sêmen. Para as demais características MOTT, MOTP, EOS, e HOST registraram-se correlações negativas de médias a alta conforme variou o processamento do sêmen fresco, resfriado/estabilizado e congelado/descongelado ( $r$ : -0,87; -0,87, -0,55, e -0,43 respectivamente). Ou seja, como era esperado à medida que se evolui na fase de processamento do sêmen de fresco/resfriado-estabilizado/congelado-descongelado, piores foram as respostas aos parâmetros como: diminuição da motilidade (total e progressiva), aumento de células coradas pela eosina (células lesadas) e menor percentual de células reativas ao HOST, indicando lesões na membrana espermática.

O parâmetro HOST apresentou média correlação ( $r = -0,43$ ) com a fase de processamento do sêmen, provavelmente ocasionado pela menor variação observada no HOST, em média a variação das células reagidas variou em 8,6% do sêmen fresco até o sêmen congelado/descongelado, evidenciando que a população espermática que reagiu no sêmen fresco se manteve constante, viável até o descongelamento.

A correlação entre a coloração de eosina nigrosina e o estágio de processamento do sêmen foi baixa, a variação das motilidades foi maior em relação ao número de células coradas, indicando que a metodologia não foi adequada para avaliação do sêmen de jumentos congelado/descongelado com os dois diluidores ( $r=0,13$  e  $0,11$ ).

O percentual de células coradas pela coloração de eosina nigrosina foi semelhante aos observados por GEBERS (1995) e GASTAL *et al.* (1997) em estudos conduzidos com sêmen fresco de jumentos da raça Pêga e Nordestina, respectivamente. Enquanto que os resultados registrados para o HOST, foi semelhante ao descrito por TRIMECHE *et al.* (1998) em sêmen fresco e congelado de jumentos da raça Poitou, porém resultados conflitantes a estes, foram registrados por SERRES *et al.* (2002) e MIRRÓ *et al.* (2005) em estudos conduzidos com sêmen de jumentos de raças espanholas.

De acordo com estes estudos o HOST não se mostrou um exame complementar adequado para a avaliação de sêmen congelado de jumentos, pois apresentou resultados inconstantes. Entretanto, a comparação entre os demais estudos e o presente, não apresentam fundamentos em sua

comparação em relação ao HOST e a coloração de eosina nigrosina, pois houve diferenças nos demais estudos e o presente em relação às soluções corantes, diluidores de congelamento, soluto das soluções hiposmóticas, osmolaridade final dos meios diluidores, tempo de incubação, interações entre estes dois testes de funcionalidade de membrana e os constituintes do meio diluidor.

Os valores registrados de defeitos espermáticos (tabela 2) observados e em os diluidores estiveram dentro dos limites considerados normais para sêmen congelado/descongelado de garanhões de acordo com as normas do CBRA (1998).

A morfologia espermática não tem sido incluída por muitos estudos como critérios de avaliação do congelamento de sêmen em jumentos. Os percentuais de defeitos espermáticos registrados no presente estudo foi semelhantes a outros estudos (VIEIRA *et al.*, 1985; ARRUDA *et al.*, 1989; SILVA *et al.*, 1997).

Os percentuais de alterações na morfologia espermática devem ser utilizados como mais um critério auxiliar na seleção de ejaculados, conjuntamente com outros para a determinação da qualidade seminal.

**Tabela 2:** Valores Médios e Desvios Padrão da variação da morfologia espermática para o sêmen fresco e congelado agrupados de acordo com a classificação de BLOM (1973).

<i>Anomalias Espermáticas</i>			
Fase	Defeitos Maiores	Defeitos Menores	Defeitos Totais
Sêmen Fresco	7,51 ± 3,05	7,82 ± 4,02	15,32 ± 4,32
Diluidor 1	7,72 ± 2,49	9,23 ± 6,02	16,95 ± 5,04
Diluidor 2	8,13 ± 2,01	9,01 ± 5,06	17,14 ± 4,21

Os resultados agrupados de taxas de gestação por ciclo aos 13, 25 e 35 dias pós-ovulação, em éguas inseminadas com uso dos dois diluidores são sumarizados na tabela 3.

As taxas de concepção obtidas no presente experimento aos 13 dias de 50 % (15/30) e de 53,33% (16/30) para o diluidor 1 e 2 respectivamente, foram altas quando comparadas a outros autores (VIEIRA *et al.*, 1985; ARRUDA *et al.*, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 2006; VIDAMENT *et al.*, 2008). As taxas de concepção aos 13 dias foram inferiores as registradas por TRIMECHE *et al.* (1998) na inseminação artificial de jumentas em quatro ciclos (66%), entretanto foi superior ao valor registrado por esses autores na taxa de concepção por ciclo, que foi de 30% no grupo onde foi obtido gestações. As taxas de concepção obtidas aos 25 dias foram semelhantes aos resultados registrados por outros autores com emprego de diferentes metodologias de IA em éguas (VIEIRA *et al.*, 1985; ARRUDA *et al.*, 1986; OLIVEIRA *et al.*, 2006; VIDAMENT *et al.*, 2008).

Nos três momentos de diagnóstico de gestação em éguas inseminadas com os dois diluidores 1 e 2, não foram observadas diferenças nas taxas de concepção ( $P>0,05$ ).

As taxas de perdas embrionárias para éguas inseminadas com o diluidor 2 foram de 18,75% (3/16 gestações) e 61,53% (8/13 gestações) em relação ao diagnóstico de gestação feito entre 13 para 25 e 25 para 35 dias, respectivamente. Enquanto que as taxas de perdas embrionárias para éguas inseminadas com o diluidor 1 foram de 6,67% (1/15 gestações) e 78,57% (11/14 gestações) para os diagnósticos realizados entre 13 para 25 e 25 para 35 dias, respectivamente.

As taxas de perdas embrionárias foram similares entre os dois diluidores ( $p>0,05$ ). Os valores registrados no presente experimento foram elevados para todos os momentos. Contudo, os valores de perda embrionária foram mais elevados entre 25 e 35. Agrupando se os dados para éguas inseminadas com ambos os diluidores, as perdas ocorridas nesta fase foram de 62%. De acordo com BALL (1993) e HENNEKE *et al.*, (1984) as taxas de perda embrionária em éguas podem atingir 75% em condições insatisfatórias de nutrição e manejo.

**Tabela 3:** Taxas de concepção por ciclo em éguas mestiças e da raça Campolina inseminadas até 6 horas após a ovulação, intra-cornual ipsilateral a ovulação, com sêmen congelado de três jumentos da raça Pêga (*Equus asinus*).

<b>Diluidores</b>	<b>Numero de gestações por ciclos</b>		
	13 dias	25dias	35dias
Diluidor 1	50,00% (15/30)	46,66% (14/30)	10,00% (3/30)
Diluidor 2	53,33% (16/30)	43,33% (13/30)	16,6% (5/30)

Os dados do presente estudo dificilmente podem ser comparados com outros estudos com sêmen congelado de jumentos, uma vez que poucos foram os estudos que realizaram teste de fertilidade (VIEIRA *et al.*, 1985; ARRUDA *et al.*, 1986; TRIMECHE *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006; VIDAMENT *et al.*, 2008).

Contudo, estes estudos não mencionam por quanto tempo a gestação foi acompanhada e se houveram altas taxas de perdas embrionárias no período correspondente ao do presente estudo.

Aparentemente, não há dados na literatura mencionando as perdas embrionárias em éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos. Por outro lado, de acordo com VIDAMENT (2005) a comparação de taxas de gestação e perda embrionária por estudos diferentes é no mínimo inválida. Uma vez que a fertilidade é uma equação multifatorial dependente da fertilidade da égua (idade, fertilidade intrínseca, doenças uterinas), da fertilidade do sêmen (coleta, processamento, fertilidade intrínseca) e do manejo ao qual a égua foi submetida (AMANN & PICKETT 1987; AMANN, 2006).

Diversos fatores podem ter contribuído para as perdas embrionárias neste estudo, tais como a idade das éguas; as condições de manejo nutricional que foram inadequadas; os fatores relacionados ao embrião; momento da inseminação e fatores não determinados.

A inseminação artificial realizada após a ovulação de acordo com VIDAMENT (2005) é uma metodologia que deve ser evitada, pois propicia elevados custos com o emprego da inseminação de uma determinada égua, além de elevado número de manejos, pois a égua deve ser palpada frequentemente. No presente estudo não foi empregado indutores de ovulação, portanto os intervalos do início do aparecimento de um folículo com 35 mm até a inseminação foram naturais.

Outra razão pela qual a inseminação artificial pós-ovulação deve ser evitada, é devido a associação deste tipo de inseminação com perda embrionária registrado por WOODS e colaboradores (1990). As inseminações realizadas após a ovulação como no presente estudo levam ao aparecimento de embriões de tamanho reduzido, (VANDERWALL & NEWCOMBE, 2007, NEWCOMBE, 2000), possuindo menor capacidade de sinalização embrionária materna e, conseqüentemente, associados com maiores taxas de perda embrionária.

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com os reportados e discutidos, aqui expostos, concluiu-se que: 1) a coloração de eosina e nigrosina citrato se mostrou inadequada para a avaliação do sêmen de jumentos em diferentes etapas do processo de criopreservação; 2) o HOST se mostrou adequado para identificação da população espermática sobrevivente ao processo de congelamento, independente do meio diluidor; 3) os parâmetros físicos do sêmen criopreservado em ambos os diluidores se mostram inclusos dentro da faixa registrada por outros estudos com diluidores semelhantes à base de gema de ovo e glicerol; 4) ambos os diluidores de NAGASE & NIWA (1964) modificado e o diluidor de MARTIM et al. (1979) pode ser empregados na criopreservação de sêmen de jumentos; 5) as taxas de gestação apresentadas aos 13 e aos 25 dias foram elevadas e satisfatórias e as taxas de perda embrionária entre 13 e 25 dias e 25 e 35 dias foram elevadas.

Novos estudos devem ser conduzidos enfocando novas metodologias de congelamento, bem como novos testes complementares devem ser avaliados e estudos de teste de fertilidade em éguas sob boas condições de manejo e associado a um acompanhamento do período gestacional por período de tempo mais prolongado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, W.R.; BROWN, L.; WRIGHT, M.; WILSHER, S. Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mare and stallions in England. **Equine Veterinary Journal**, v.39,n. 5, p.438-445, 2007.

ALLEN, W. R. Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 4, p. 209-223, 2005.

ALLEN, W. R. The physiology of early pregnancy in the mare. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 46, 2000, San Antonio, Texas, USA. **Proceedings...** American Association of Equine Practitioners, Lexington, KY, p. 338-354.

ALLEN, W.R.; SHORT, R.V. Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes. **Journal of Heredity**, v.88, n.5,p. 384-392, 1997.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS. A.S.L.; Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**. v.89, p. 105–113, 2005.

ALVARENGA, M.A. **Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões**. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual Paulista, 2002. 87p. Tese (Livre Docência em Reprodução Animal) FMVZ – Universidade Estadual Paulista, 2002.

ALVAREZ, A.L.; SERRES, C.; TORRES, P.; CRESPO, F.; MATEOS, E.; GÓMEZ-CUÉTARA, C. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. **Animal Reproduction Science**., v.95, p.89-91, 2006.

ÁLVAREZ, A.L.; SERRES, C.; CRESPO; MATEOS, E.; GÓMEZ-CUÉTARAL. Cryopreservation of Zamorano-Leonés Donkey Sperm using different amides. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39 n.4, pp267, 2004.(Abstract).

AMANN, R.P. The fertility dilemma: perception vs actuality. **Equine Veterinary Education**, v.18, p.159-164, 2006.

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal samples be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v.10, n.2, p.89-98, 1989.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Eds.), **Equine reproduction**. Malvern: Lea & Fabiger, 1993. p.715-745.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D., JEANNEAU, C.T.; GERARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M.. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**. v. 61, p.895 – 907, 2004.

ANTON M, NAU F, NYS Y. Bioactive egg components and their potential uses. **Worlds Poultry Science Journal**, v.62, p. 429 – 438, 2006.

ANTON M, GANDEMER G. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma egg yolk. **Journal Food Science**, v.62, p.484 – 487, 1997.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo, 2000. 120p. Tese (Tese de Livre Docência em Reprodução Animal) FMVZ – Universidade de São Paulo, 2000.

ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; BARBOSA, R.T.; MANZANO, A. Congelação do sêmen de jumentos: características reprodutivas de um doador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** (Supl. 1), p. 215, 1989.

ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; MANZANO, A. Inseminação artificial de eqüídeos com sêmen congelado em palhetas de 0,5 ml. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 20., 1986, Cuiabá. **Anais...Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso**, 1986, p. 181.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, n.3-4, p. 268-275, 2008.

AURICH, J.; AURICH, C. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p.275 – 279, 2006.

BALL, B. Reduced reproductive efficiency in the aged mare: role of early embryonic loss. Recent Advances In: BALL, B.(Ed.) **Recent Advances in Equine Reproduction**, 1 ed. 2000. Disponível em: International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)). Acesso em: 05 ago. 2008.

BALL, B. Embryonic death in mares. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Eds.), **Equine reproduction**. Malvern: Lea & Fabiger, 1993. p. 517-531.

BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal Compendium on Medical Veterinary Science**, v. 21, p.47-51,1957.

BATELLIER F, MAGISTRINI M, FAUQUANT J, PALMER E. Effect of milk fractions survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.48, p.391- 410, 1997.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p. 1338-1344, 2006.

BERGERON, A.; CRÊTE, M.H., BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.70, p.708 -717, 2004.

BERLINER, V.R. Dilutors for stallion and jack semen. **Journal of Animal Science**, v.1, p.314– 319, 1942.

BERLINER, V.R.; COWART, F.E.; MEANS, R.H.; WRIGHT, J.B. Artificial insemination of horses and jennets for horse, mule and jack-stock production. **American Society of Animal Production**, v.1, 233-237, 1938.

BJÖRNDAHAL, L.; SÖDERLUND, I;JOHANSSON, S.; MOHAMMADIEH, M.; POURIAN, M.R.; KVIST, U. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. **Journal of Andrology**, v. 25, n.5, 2004.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, p.383-391, 1973.

BLOM, E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. **Fertility and Sterility**, v.1, n.3, p.223-228, 1950.

BOERBOOM, D.; BROWN, K.A.; VAILLANCOURT, D.P.;GOFF, A.K.; DORE, WATANABE, .K; DORE, M.; SIROIS, J. Expression of key prostaglandin synthetases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.70, p.391-399, 2004.

BOETA, M.; ZARCO, L. Progesterone and Equine Chorionic Gonadotropin Concentrations Around the Time of Pregnancy Loss in Mares Impregnated by Donkeys or Stallions. **Equine Veterinary Science**, v.25,n.12, p.531-538, 2005.

BOETA, M.; QUINTERO, L.Z. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. **Veterinaria México**, v. 31, n.1, p. 67-69, 2000.

BOGART, R.; MAYER, D.T. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. **Journal of Animal Science**, v.9, p.143-152, 1950.

BORGES, J.C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino.** Viçosa: Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, 2003. 73p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa, 2003.

BOYLE, M. **Code for practice: the use of artificial insemination in horse breeding**, 2. ed. Newmarket: British Equine Veterinary Association, 2001, 47p.

BRAGA, C.R. **Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído em diferentes diluidores e armazenado a 17°C ou a 5°C, em container especial, por 24 horas.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 198p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária –UFMG, 2007.

BRANDÃO, F.Z.; SILVAFILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; SATURNINO, H.M.; VIANA, W.S.; DANTAS, M. S.; OLIVEIRA, H.N. Efeito da concentração espermática e do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1,2003.

BRINSKO, S.P. Insemination doses: how low can we go? **Theriogenology**, v.66, n.3,p.543-550, 2006.

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

BUFF, P.R.; SPADER, B.R.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H. Endocrine responses in mares undergoing abrupt changes in nutritional management. **Journal of Animal Science**, Savoy,v.84,p. 2700-2707, 2006.

BURANAAMNUAY, K.; TUMMARUK, P.; SINGLOR, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TECHAKUMPHU, M. Effects of straw volume and Equex-STM on boar sperm quality after cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals** (In press), 2008.

CARVALHO GR, SILVA FILHO JM, LIMA MC, OLIVEIRA HN., PALHARES MS. Efeito de diferentes concentrações espermáticas na fertilidade de éguas inseminadas com sêmen eqüino diluído, resfriado a 20°C e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 1998; 27:695-699.

CARVALHO GR. **Fertilidade do sêmen eqüino diluído, resfriado a 20°C e transportado.** Viçosa: Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1992. 87p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – DZO -UFV, 1992.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2ed. Belo Horizonte, MG, 1998. 54p.

CLULOW, J.R.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; MORRIS, L.H.A. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 6, p.232 -235, 2007.

CNA: **Estudo do complexo do agronegócio cavalo no Brasil**: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada ESALQ-USP/Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2006. 70p (coletânea estudos gleba, 40).

CRISTANELLI, M.J.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effects of egg yolk and glycerol level in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 234, p.25–38, 1985.

COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5o C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology**, v.22, p. 25-38, 1984.

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**.v.5; p.46-52, 2000.

DAVIES-MOREL, MCG. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management**. 3.ed. Oxfordshire: CAB International, 2008, 378p.

DAVIES-MOREL, MCG. **Equine Artificial Insemination**. 1. ed. Wallingford-Oxon: CAB International,1999. 406p.

DAUPHAS, S.; BEAUMAL, V.; GUNNING, P.; MACKIE, A.; WILDE, P.; VIE, V; RIAUBLANC, A.; ANTON, M. Structures and rheological properties of hen egg yolk low density lipoprotein layers spread at the air – water interface at pH 3 and 7. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.57, p.:124-133, 2007.

DELL` AQUA JUNIOR, J. A. ; PAPA, F.O., Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelação de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, .n.3, p. 460-462, 2001.

DOBRINSKI, I.; THOMAS, P.G.A; BALL, B.A. Cryopreservation reduces the ability of equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cells and zonae pellucidae in vitro. **Journal of Andrology**, v.16, n.6, 1995.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.A. field study of the fertility of transported equine semen, **Theriogenology**, v. 22, p. 291-303, 1984.

EIGENHEER-MOREIRA, J. F.; FERNANDES, F. T.; QUEIROZ, F.R.; PINHO, T.G.; FERREIRA, A.M.R. Estudo comparativo de éguas repetidoras ou não de cio através da avaliação histológica do endométrio e das concentrações plasmáticas de progesterona. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 12,p. 506-512, 2007.

EVANS, T.J.; CONSTANTINESCU, G.M.; GANJAM, V.K. Clinical reproductive anatomy and physiology of the mare. In: YOUNGQUIST, R.S.; THREFALL, W.

R. (Ed) **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. 2. ed. Saint Louis: Saunders-Elsevier, 2007, p.47-67.

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGLAS, M.S.J.; MERYMAN, H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v. 27, p. 247–268, 1990.

FERREIRA, M.F.L. **Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e a fertilidade do sêmen de jumento(Equus asinus)**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária –Universidade Federal de Minas Gerais,1993. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária – UFMG, 1993.

FLORES, E.; TABERNER, E.; RIVERA, M.M.; PENA, A.; RIGAU, T.; MIRO, J.; Rodriguez-Gil, J.E. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. **Theriogenology**, v. 70, p.936-945, 2008.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; MAFFILI, V.V.; BORGES, A.M.; SANTOS, A.D.F.; RODRIGUES, M.T.; OLIVEIRA, R.F.M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**. V.2.,n.2., p.139-144, 2005.

FÜRST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas nas fertilidade do sêmen eqüino**.Viçosa: Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 2006, 96p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – DZO-UFV, 2006.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; Efeito do resfriamento do sêmen sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5,p.599-607,2005.

FÜRST, R. **Efeito do resfriamento no sêmen eqüino sobre sua congelabilidade**.Viçosa: Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 2002, 56p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – DZO-UFV, 2002.

GASTAL, M.O.; HENRY, M.; BEKER, A.R.; GASTAL, E.L. Effect of ejaculation frequency and season donkey jack semen, **Theriogenology**, v. 47, p. 627-638, 1997.

GASTAL, M.M.F.O. **Estudo das características seminais e do comportamento sexual de jumentos**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1991. 105p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária - UFMG, 1991.

GENTRY, L.R.; THOMPSON-JR, D.L.; GENTRY, G.T.; DAVIS, K.A.; GODKE, R.A.; CARTMILL, J.A. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. **Journal Animal Science**, v.80, p.2695-2703, 2002.

GEBERS, A. M. **Emissão diária de espermatozoides e algumas características reprodutivas de jumentos da raça Pêga**. Viçosa: Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1995. 90p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) DZO – UFV, 1995.

GILMORE, J.A.; MCGANN, L.E.; LIU, J.; GAO, D.Y.; PETER, A.T.; KLEINHANS, F.W.; CRITSER, J.K. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 985–995, 1995.

GINTHER, O.J. Equine Pregnancy: Physical interactions between the uterus and conceptus. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 44, 1998, Baltimore, Maryland, USA. **Proceedings...** American Association of Equine Practitioners, Lexington, KY, 1998, p.73 -104.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. , 2. ed. Cross Plains: Equiservices, Publishing 1992, 642p.

GOMES, G. M.; JACOB, J. C. F.; MEDEIROS, A. S. L.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p. 277-79, 2002.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America - Equine practice**, v.12, p.131-147, 1996.

GRAHAM, J. K.; CRABO, B. G.; PACE, M. M. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. **Journal of Animal Science**, (*Suppl.* 2) v. 47, p. 80-119, 1978.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal Reproduction Microscopy Science**, v.76, p.84-97, 1957.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v.29, p.26-28, 1992.

HEARN, P.; BONNETT, B.; SAMPER, J.C. Factors influencing pregnancy and pregnancy loss on one Thoroughbred farm. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 39, 1993, Orlando, Florida, USA. **Proceedings...** American Association of Equine Practitioners, Lexington, KY, 1993, p. 161-163.

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J.K.; PICKETT, B.W.; HAMILTON, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v.28, n.1 p.47-53, 1996.

HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L. Body condition during pregnancy deficiency and lactation and reproductive efficiency of mares. **Theriogenology**, , v. 21, p.897-909, 1984.

HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L.; YEATES, B.F. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.15, p.371-372, 1983.

HERRLER, A.; PELL, J.M.; ALLEN, W.R.; BIER, H.M.; STEWART, F. Horse conceptuses secrete insulin-like growth factor binding protein. **Biology of Reproduction**, v.32,p.804-1811, 2000.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p.3–22, 2000.

HUHTINEN, M.; KOSKINEN, E.; SKIDMORE, J. A. et al. Recovery rate and quality of embryos from mares inseminated after ovulation. **Theriogenology**, v.45, n.4, p.719-726, 1996.

KAMPSCHMIDT RF, MAYER DT, HERMAN H. Lipid and liprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. **Journal Dairy Science**, v.36 p.733-742., 1953.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, n.7, p. 1217-1227, 1997.

KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K.; SQUIRES, E.L.; JASKO, D.J.; PICKETT, B.W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38,n.4,p.601-614, 1992.

KEITH, S.L. **Evaluation of new cryoprotectans for the preservation of equine spermatozoa**. Fort Collins, Colorado, USA: Colorado State University, 1998. 104p. Thesis (Master of Science), CSU, 1998.

KENNEDY, T.G.; MEINA, C.G.; PHANG, S.H. Prostaglandins and initiation of blastocyst implantation and decidualization. **Reproduction**, v.134, p.635-643, 2007.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D.A. (Ed.) **Current therapy in Theriogenology**. 2ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986, p. 723-729.

KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion**. Hastings: Journal Society Theriogenology, v.9, 1983.100p.

KENNEY RM, BERGMAN RV, COOPER WL, MORSE GW. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 21, 1975, Lexington, KY, USA. **Proceedings...** American Association of Equine Practitioners, Lexington, KY, 1975, p. 327-335.

KLOPPE, L.H.; VARNER, D.D.; ELMORE, K.N.; BRETZLAFF, J.W.; SHULL, J.W. Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.29, n.2; p. 429-439, 1988.

KLUG, E. Routine AI application in Hannoverian Sport Horse Breeding Association. **Animal Reproduction Science**, v.28, p.39 – 44, 1992.

- KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v.41, n.3, p.629-636, 1994.
- KRAUSE, D.; GROVE, D. Deep freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.14, p. 139 - 141, 1967.
- KREUCHAUF, A. Reproductive physiology in the jackass. **Animal Research Development**.v.20, p.51-78, 1984.
- JASKO, J.D. Procedures for cooling and freezing equine semen. **Ars. Veterinaria**, v.10, n.2, p.156-165, 1994.
- 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.
- JEONG, R.; ROBERT, S.; JAE, C. Age-specific fertility of the Jeju pony (*Equus caballus*). **Journal of Ethology**, v. 22, n.1,p.113-117, 2004.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VER, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al, Development o fan assay the funcional integrity of the human sperm membrana and its relationship t oto other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62 n.1-3,p.143-172, 2000.
- LEBLANC, M. M. Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. In: BALL, B.(Ed.) **Recent Advances in Equine Reproduction**, 1 ed. 2000. Disponível em: International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)). Acesso em: 05 ago. 2008.
- LIMONE, L.E.; SHAUGHNESSY, D.W.; GÓMEZ-IBÁÑEZ, S.; MCDONNELL, S.M.; BEDFORD, S.J. The effect of artificial vagina lubricants on stallion sperm motion measures and semen pH during cooled storage. **Theriogenology**, v.58, p.333-336, 2002.
- LOSINO, L.; ALVARENGA, M.A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em eqüinos no Brasil e Argentina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, n.34 (Suppl1), p.39-49, 2006.
- LOVE, C.C.; KENNEY, R.M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. **Theriogenology**, Amsterdam, n.50, p.955-972, 1998.
- LARDY, H.A.; PHILLIPS, P.H. Preservation of spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.1, p.219 - 221. 1939.
- LIMA MCC, SILVA FILHO JM, CARVALHO GR., PALHARES MS. Efeito do número de inseminações artificiais por ciclo sobre a fertilidade de éguas

- inseminadas com sêmen eqüino diluidor, resfriado a 20°C e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p.1649-1653, 2000.
- LOOMIS, P.R. Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. In: CARNEVALE, E.M. **Veterinary Clinics North America - Equine Practice**, 2006; 22: 663-676.
- LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs, **Theriogenology**, v. 64, p. 480-491, 2005.
- LOOMIS, P.R.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PCIKETT, B.W. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. **Journal of Animal Science**, v.56, p.687-693, 1983.
- LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; BRINSKO, S. L.; RIGBY, R. S.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 58, p. 221-224, 2002.
- MAFFILI, V.V.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; PROSPERI, C.P.; SANTOS, A.D.F.; BORGES, A.M. Uso de diferentes tempos de incubação no teste hiposmótico em sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.4, p.631-635, 2003.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. Major proteins of bovine seminal bind to the low density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p.1250 -1258, 2002.
- MARTIN, C.E.G. **Efeito da LDL em algumas características funcionais de espermatozói de eqüino criopreservado**. Pelotas: Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas, 2005. 41 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária – UFPEL, 2005.
- MARTIM, JC, KLUG E, GUNZEL AR. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, (Suppl.) v. 27. p 47-51, 1979.
- MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells with emphasis on mammalian ova and embryos. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 9., 1980, Madrid, Spain. **Proceedings...**Madrid, Spain, 1980, p. 99-114.
- MCDONNELL, SM. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically induced ex-copula ejaculation in stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p.153-159, 2001.
- MEDEIROS, A.S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Avaliação da integridade acrossomal de espermatozói des de garanhões criopreservados com crioprotetores a base de amidas e glicerol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p. 353-354, 2003.

MELLO, S.L.V. **Efeito da colheita fracionada de dois diluidores sobre longevidade espermática de asininos (*Equus asinus*) resfriados a 5° C.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária –Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 97p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária – UFMG, 1998.

MELLO, S.L.V.; HENRY, M.; SOUZA, M.C.; OLIVEIRA, S.M.P. Effect of split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserved at 5°C. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52;n.4; 2000.

MELO, M.I.V., HENRY, M., BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n..6,p.757-763,2005.

MELO, M.I.V; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.71-78, 1999.

MELO, M.I.V. **Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino.**Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 67 p. 1999. Tese (Doutorado em Ciência Animal) –Escola de Veterinária – UFMG, 1999.

MERKT, H.; KLUG, E.; KRAUSE, D. et al. Results of long-term storage of stallion semen frozen by the pellet method. **Journal of Reproduction and Fertility (Suppl.)**, v. 23, p. 105-106, 1975.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial.**6ed. Porto Alegre: Sulina, 1987, vol. I e II, 750p.

MIRRÓ, J.; LOBO, V.; QUINTERO-MORENO, A.; MEDRANO, A.; PENA,A.; RIGAN, T. Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. **Theriogenology**, v.63, p. 1706-1716, 2005.

MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mare in Newmarket. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n.1,p.51-60, 2002.

MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, n.6., p. 999-1012, 1992.

MOUSSA M, MARTINET V, TRIMECHE A, TAINTURIER D, ANTON M. Low density lipoprotein extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695 -1706, 2002.

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia e epifluorescência) de espermatozoides eqüinos criopreservados.** Pirassunga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, 2006.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Qualidade e Produtividade Animal) – FMVZ – USP, 2006.

NAGASE H., SOEJIMA S., NIWA T., OSHIDA H., SAGARA Y., ISHIZAKI N., HOSHI S. Studies on the freezing of stallion semen. I. Fertility results of stallion semen in concentrated pellet form. **Jap. J. Animal Reproduction**, v.12, p.48-51, 1966.

NAGASE H, NIWA T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. I Factors affecting survival of spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5., 1964, Trento. **Proceedings...** Trento: International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1964, v.4, p.410-415.

NAGASE, H; GRAHAM, K. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5., 1964, Trento. **Proceedings...** Trento: International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1964, v.4, p.410-415.

NIE, G.J.; WENZEL, J.G.W. JOHNSON, K.E.; Comparison of pregnancy outcome in mares among methods used to evaluate and select spermatozoa for insemination. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.211-222, 2002.

NEILD et al, 1999;

NEWCOMBE, J.R. Embryonic loss and abnormalities of early pregnancy. **Equine Veterinary Education**. v.12, n.2, p.88-101, 2000.

NUNES, R. O jumento Pêga. In: I – Simpósio Mineiro de Equideocultura, 1., 2007, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Departamento de Zootecnia- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. p. 33-39.

OLIVEIRA, J.V.; ALVARENGA, M.A.; MELO,C.M.; MACEDO, L.M.; DELLÁQUAJR; J.A.; PAPA, F.O. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezeability and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p.82-84, 2006.

OLIVEIRA, J.V. **Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumento (Equus asinus) por meio de testes laboratoriais e fertilidade**, Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, 2005.108p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – FMVZ- Universidade Estadual Paulista, 2005.

OSHIDA H., MIKAWA T., HORTUCHI S., TAKAHASHI H., TOMIKUZA T., NAGASE H. Studies of the freezing storage of stallion semen. III. Freezing of pellet frozen semen preserved in liquid nitrogen. **Japan Journal Animal Reproduction**.v.13, p.136-140, 1967.

PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J. Effect of timing insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p.115–121, 1975.

PACE, M.M, GRAHAM, E.F. Components in egg yolk wich protect bovine spermatozoa during freezing. **Jornal of Animal Science**, v.39, p.1144-1149. 1974.

PALHARES, M.S. **Adequação de um novo container para o transporte do sêmen eqüino diluído e resfriado: I - Características Termodinâmicas e Funcionais, II – Desempenho Reprodutivo das Éguas Inseminadas**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1997. 240p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária – UFMG, 1997.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., 1984, Urbana. **Proceedings...** Urbana: International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1984, v.4, p. 377-379.

PAPA FO, MELO CM, DELL'AQUA JA, MACEDO LP, CARVALHO AG, ALVARENGA MA, MEDEIROS ASL. Inovações metodológicas na biotecnologia do sêmen eqüino resfriado e congelado. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33,(Suppl.,1), p.19-27, 2005.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'ÁQUA JÚNIOR, J.A. et al. Utilização do diluente MP 50 para a criopreservação de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.184-187, 2002.

PAPA, F.O.; MEIRA, C.; SIMON, J.J.; FERREIRA, J.C.P.;DELL'AQUA JR, J.A.; LEME, D.P. Pregnancies in mare using donkey (*Equus asinus*) frozen semen. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.27, n.1,p.262, 1999.

PAPA, F.O. **Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de eqüinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial**. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista, 1987.150p. Tese (Tese Livre Docência em Reprodução Animal) – FMVZ- Universidade Estadual Paulista, 1987.

PAPA, F.O.; MARTIN, J.C.; KRAUSE, A. Influência da centrifugação sobre a motilidades do sêmen de eqüinos em resistência térmica e congelamento. **Revista Ciência Biomédica**, v 2, p. 3139, 1981.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.

PERECIN, F. **Epigenética do desenvolvimento em bovinos: DNA metiltransferases e genes “imprinted” em embriões, fetos e placentas**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista, 2007. 107p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - FCAV – Universidade Estadual Paulista, 2007.

PETTITT, M.J.; BUHR, M.M. Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behavior during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v.19, n.6, p.736-746.1998.

PHILLIPS, P.H. Preservation of Bull Semen. **Journal Biol. Chem.** v.1,p.415. 1939.

PIAO, S.; WANG, Y.; CHENG, Y. A study of the technique of freezing concentrated semen of horses (donkeys) and the aspect of insemination. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11., 1988, Urbana. **Proceedings...** Dublin: International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1988, Abstract 286.

PICKETT B.W., SQUIRES E.L., MCKINNON A.O. Techniques for collection, evaluation and insemination of stallion semen. Fort Collins: *Animal Reproduction Biotechnology Laboratory - Colorado State University*, 2001, 114p.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, Lea Febiger: Malven, p.769- 785, 1993.

PICKETT, B.W. Factors affecting sperm production and output. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.) **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p.689-704.

PYCOCK, J.F. Pregnancy diagnosis in the mare. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. Saint Louis: Saunders& Elsevier, 2007, p.335-342.

POLGE, C.; SMITH, A.; PARKES, A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, p. 164-166, 1949.

POLGE, C.; MINOTAKIS, C. Deep-freezing of jacks and stallion semen In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5., 1964, Trento. **Proceedings...** Trento: International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1964.

PURSEL, V.G.; SCHULMAN, L.L; JOHNSON, L.A. Effect of orvus es paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. **Journal of Animal Science**, v.47, n.1, p.198-202, 1978.

PYCOCK, J.F. Pregnancy diagnosis in the mare. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. (Eds.) **Current Therapy in Equine Reproduction**. Saint Louis: Saunders& Elsevier, 2007, p.335-342.

LOVE, C.C. Reproductive examination of stallion: evaluation of potential breeding soundness. In: YOUNGQUIST, R.S.; THREFALL, W. R. (Ed) **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. 2. ed. Saint Louis: Saunders-Elsevier, 2007, p.10-14.

PYCOCK, J.F. Perineal and cervical abnormalities. IN: RICKETTS, S.W. (Ed.) **Equine stud medicine course**. 10ed. Newmarket: British Equine Veterinary Association, 2005, p.60-69.

RAESIDE, J.; CHRISTIE, H.L.; RENAUD, R.L.; WARLCHLI, R.O.; BETTERIDGE, K.J. Estrogen metabolism in the equine conceptus and endometrium during early pregnancy in relation to estrogen concentrations in yolk sac fluid. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1120-1127, 2004.

RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, 2007. 111p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – FMVZ –USP, 2007.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. Na osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v.69,p.77-86, 1994.

RICKETTS, S.W. Uterine structural normality and abnormalities. IN: RICKETTS, S.W. (Ed.) **Equine Stud Medicine Course**. 10 ed. Newmarket: British Equine Veterinary Association, 2005, p.70-77.

ROTA, A.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiatina donkey spermatozoa. **Theriogenology**, v.69, p.176-185, 2008.

SAEG: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA–UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas – SAEG**. Versão 9.1. Viçosa, MG, 2007. 142p.

SAMPER JC. Techniques for Artificial Insemination. In: Youngquist RS, Threlfall WR. (Eds.) **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. 2. ed. Saint Louis: Saunders-Elsevier. 2007, p. 37-42.

SAMPER, J.C. Reproductive system: evaluate of the breeding stallion. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE MEDICINA EQUINA, 1, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Eqüídeos, 2007. 1-18p.

SAMPER, J.C.; ESTRADA, A.J.; MCKINNON, A.O. Insemination with frozen semen. In: SAMPER, J.C.; PYCOK, J.F.; MCKINNON, A.O (Eds.) **Current Therapy in Equine Reproduction**. Saint Louis: Elsevier-Saunders, ed. 2007, p.285-288.

SAMPER, J.C.; VIDAMENT, M.; KATILA, T.; NEWCOMBE, J.; ESTRADA, A.; SARGEANT, J. Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi center study. **Theriogenology**, v.58, p.647-650, 2002.

SAMPER, J.C.; MORRIS, C.A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**, 49:895-903, 1998.

SANTOS, G.F. **Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre características físicas e morfológicas dos espermatozóides de jumentos (*Equus asinus*) preservados a 5°C.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. 82p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária – UFMG, 1994.

SATURNINO, H.M.; SILVAFILHO, J.M.; SILVA, M.D.; PALHARES, M.S.; BRANDÃO, F.Z.; OLIVEIRA, H.N. Efeito do intervalo das duas últimas inseminações sobre a fertilidade de égua inseminadas com sêmen fresco diluído. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n.3, p. 1143-1149, 2002.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**, 2. ed. Moscow: Current Concepts, 2003, 450 p.

SERRES, C.; ÁLVAREZ, A.L.; RODRIGUEZ, A.; SANTIAGO, I.; MATEOS, E.; MATEOS, E.; GÓMEZ-CUÉTARAL. Effect of extender and glycerol concentration on cryopreservation of Semen from the Zamorano-Leonés Donkey. **Reproduction in Domestic Animals** v.39 n.4, pp267, 2004. (Abstract).

SERRES, C.; RODRIGUEZ, A.; ALVAREZ, A.L.; SANTIAGO, I. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen. **Theriogenology**.v.58,p. 329-332, 2002.

SILVA FILHO JM, FONSECA FA, PALHARES MS, WANDERLEY AT, OLIVEIRA HN. Avaliação de uma técnica de diluição e transporte de sêmen eqüino para as condições Brasileiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27 p.66-74, 1998.

SILVA FILHO JM, FONSECA FA, PALHARES MS, OLIVEIRA HN. Fertilidade do semen diluído, resfriado e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, p.1134 – 1141, 1997.

SILVA FILHO, J.M. **Aspectos do Manejo Reprodutivo e do Sêmen na Inseminação Artificial em éguas.** Viçosa: Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1994. 402p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – DZO – UFV, 1994.

SANTOS, G.F. **Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre características físicas e morfológicas dos espermatozóides de jumentos (*Equus asinus*) preservados a 5°C.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. 82p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária – UFMG, 1994.

SILVA FILHO JM, PALHARES MS, BERGMANN JAG. Inseminação artificial e transporte de sêmen eqüino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1987, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p. 78.

SILVA, S.S.; HENRY, M.; NUNES, S.A.; MELLO, S.L.V. Influência do sistema de envasamento sobre a qualidade espermática de jumentos (*Equus asinus*)

avaliada “in vitro” pós-descongelamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.3, p.140-146, 1997.

SILVA, S.S. **Avaliação in vitro do sêmen congelado de jumentos (Equus asinus) envasados em macrotubo ou em tubo de alumínio**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1995. 61p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária – UFMG, 1995.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p. 387-395, 2007.

SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pos-descongelamento de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n. 12, p. 56-64, 2008.

SMITH, A.U., POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperature. **Nature**, v. 166, p. 668–669, 1950.

SOUZA, F.A. **Determinação da taxa de gestação de éguas coberta 12 e 24 horas pós-ovulação**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 89p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária - UFMG, 2007.

SQUIRES E.L., PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUMMER, J.E. **Cooled and frozen stallion semen**, Fort Collins: Animal Reproduction Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Bulletin (09) 1999.

STATON, M.B.; STEINER, J.V.; PUGH, D.G. Endometrial cysts in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, p.14-19, 2004.

STICKER, L.S.; THOMPSON, D.L.; FERNANDEZ, J.M.; BUNTING, L.D.; DEPEW, C.L. Dietary protein and (or) energy in mares: plasma growth hormone, IGF-I, prolactin, cortisol, and thyroid hormone response to feeding, glucose, and epinephrine. **Journal of Animal Science**, v.73, n. 5, p.1424-1432, 1995.

STOUT, T.A.E.; MEADOWS, S.; ALLEN, W.R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Animal Reproduction Science**, v.87, n.3-4, p. 269-281, 2008.

SWANSON, E.C.; BEARDEN, H.J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.10, p.981-987, 1951.

THOMPSON, D.L. Reproductive physiology of stallion and jack. In: EVANS, J.W. (Ed.) **World Animal Science: Horse Breeding and Management**. London: Elsevier, 1992, p. 237-257.

- TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, (*Suppl.*), v.27, p.53-59, 1979.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v.50, p.793-806, 1998.
- TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P.; GANDEMER, G.; TAINTURIER, D. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for freeze preservation of Poitou jacas sperm. **Cryobiology**, v. 34, n.4, p.385 -393, 1997.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LELANNOU, D.; BARRIÈRE, P.; TAINTURIER, D. Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. **Theriogenology**, v.45, n.5,p.1015-1027, 1996.
- VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; MELO, M.A.;MAGNAGO, L.G.P. Utilização de um contêiner modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.5, 1999.
- VANDERWALL, D.K.; NEWCOMBE, J.R. Early embryonic loss. IN: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Current Therapy in equine reproduction**. Saint Louis: Saunders& Elsevier, 2007, p.374-383.
- VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Age-related subfertility in the mare. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 39, 1990, Boston, USA. **Proceedings...** American Association of Equine Practitioners, Lexington, KY, 1990, p. 85-89.
- VAN NIEKERK, F.E.; VAN NIEKERK, C.H. The effect of dietary protein on reproduction in the mare. VII. Embryonic development, early embryonic death, foetal losses and their relationship with serum progestagen. **Journal South African Vet. Association**, v. 69, n.4. p. 150-155, 1998.
- VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L. **Disease and Management of breeding stallions**. Goleta California: American Veterinary Publications, 1991, 349p.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.28, n.5,p.709-723, 1987.
- VARNER DD, BLANCHARD TL., LOVE CL, GARCIA MC, KENNEY RM. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.29, p.1043 – 1054, 1988.
- VIANNA, B.C. **Inseminação Artificial em éguas com: sêmen congelado, in natura e diluidor**. Curitiba: Departamento de Veterinária – Universidade Federal do Paraná, 2000. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) - Departamento de Medicina Veterinária, UFPR, 2000.
- VIERA, R.C.; ARRUDA, R.P.; MANZANO, A. Inseminação intercornual de Inseminação com sêmen congelado em palhetas de 0,5 ml. In: REUNIÃO

ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 22., 1985, Camburiu. **Anais...** Camburiu: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1985. p. 298.

VIDAMENT, M.; VICENT, P.; MARTIN, F.X.; MAGISTRINI, M.; BLEBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, (in Press) 2008.

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

VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; YVON, J.M.; BRUNEAU, B.; MARTIN, F.X. Glycerol in semen extender is a limiting factor in the fertility in asinine and equine. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.39-41, 2005. (Abstract).

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P., BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, v. 58, p. 249–251, 2002.

VIDAMENT, M.; COGNARD, E.; YVON, J-M.; SATTER, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Evaluation of stallion semen before and after freezing. **Reproduction Domestic Animals**, v.33, p.271-277, 1998.

VIDAMENT, M.; DUPERE, M.; JULIENNE, P.; EVAINE, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v.48, p.907-917, 1997.

XAVIER, I.L.G.S. **Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen a fresco diluído, no corpo ou ápice do corno uterino, utilizando diferentes números de espermatozoides por dose inseminante.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 158p. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária – UFMG, 2006.

WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 3, Mariensee, 1996. **Proceedings...** Mariensee: 1996. p. 135-14

WEISS RR, VIANNA BC, MURADAS PR. Artificial insemination in mares with “in natura” and diluted semen. **Archives of Veterinary Science**, v.8,p.19-22, 2003.

WATSON, E. Artificial insemination in horses. British Veterinary Association – **Equine Practice**. February, 54-59, 1995.

WOODS, G.L.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares. **Equine Veterinary Journal**. v.22, p.410-415, 1990.

ZUCARRI, C.E.S.S.N. **Eficiência reprodutiva e dinâmica folicular de acordo com a condição corporal de éguas da raça Campolina.** Belo Horizonte:

Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 68p. 1990.  
Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola de Veterinária – UFMG, 199.