

**LUDMILA SOUZA FERNANDES**

**COMPORTAMENTO SEXUAL, PARÂMETROS SEMINAIS E DILUIÇÃO PÓS-  
CONGELAMENTO DE SÊMEN DE JUMENTOS (*Equus asinus*) DA RAÇA  
PÊGA**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

F363c  
2012

Fernandes, Ludmila Souza, 1985-

Comportamento sexual, parâmetros seminais e diluição  
pós-congelamento de sêmen de jumentos (*Equus asinus*) da  
raça Pêga / Ludmila Souza Fernandes. – Viçosa, MG, 2012.  
xiii, 63f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Domingos Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Asinino - Reprodução. 2. Asinino - Comportamento  
sexual. 3. Sêmen - Criopreservação. 4. Asinino. 5. Sêmen.  
6. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc. 7. Asinino -  
Recursos do germoplasma - Criopreservação. 8. *Equus asinus*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.182

LUDMILA SOUZA FERNANDES

**COMPORTAMENTO SEXUAL, PARÂMETROS SEMINAIS E DILUIÇÃO PÓS-  
CONGELAMENTO DE SÊMEN DE JUMENTOS (*Equus asinus*) DA RAÇA  
PÊGA**

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

APROVADA: 07 de março de 2012.



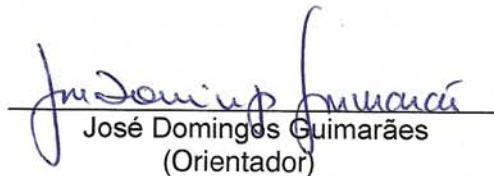
Giovanni Ribeiro de Carvalho



Jeanne Broch Siqueira



Lincoln da Silva Amorim



José Domingos Guimarães  
(Orientador)

Dedico este trabalho a meus pais, Messias Eustáquio Sena Fernandes e Penha Solange Souza Fernandes, ao meu irmão Filipe Souza Fernandes e a todos os animais que tanto nos respeitam.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Veterinária, pela oportunidade de realização do mestrado.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudo, durante um ano do mestrado.

Ao professor José Domingos Guimarães, pela orientação, pelos ensinamentos, pela oportunidade e pelas discussões construtivas.

Aos meus pais, irmão e avós, por serem meu porto seguro sempre.

Ao professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pelo apoio e pela concessão do espaço da Equideocultura e dos animais para realização deste trabalho.

Ao amigo Lincoln Silva Amorim, pela tolerância, perseverança, competência, ajuda e incentivo em várias etapas deste e de outros trabalhos.

Aos amigos Júlio, Camila, Bruna, Ana Estela, Manuela, Alberto, Priscilla, Fabiana, Flávia, Damares, Thyara e Sanely.

Ao estagiário Thiago Peixoto Machado, pelas ideias, pelo apoio, pelos dias sem almoço que passou comigo durante todo o período de experimento e pela significativa aprendizagem que construímos juntos.

Aos funcionários de Setor de Equideocultura do DZO-UFV, em especial, ao Fernando Antônio Freitas, pela presteza.

Aos professores do programa de pós-graduação da UFV, pelos conhecimentos transmitidos no decorrer das disciplinas cursadas.

À amiga Polyana Galvão, por me apresentar e ensinar a amar a espécie tão especial que são os asininos.

Ao Fernando, pelo apoio, amor e compreensão e por sempre dizer que eu vou conseguir.

Aos estagiários Tácio, Henrique, Bruno e Reginaldo, por toda a ajuda, vocês também foram muito importantes para a realização deste trabalho.

A toda turma do Atocha e amigos, principalmente Janine, Juliana, Lorena e Klécila, porque sem os momentos bons com vocês eu não teria conseguido passar pelos ruins, nem vencer barreiras e transpor obstáculos!

Ao professor Laércio pelos conselhos e pela amizade.

A todas as pessoas que de alguma maneira conviveram com o mau-humor, cansaço e estresse, tão característicos da fase final do experimento.

Aos animais que participaram desse experimento, e que sem eles nada teria se realizado, Delegado, Sargento e Xerife.

## **BIOGRAFIA**

Ludmila Souza Fernandes, filha de Messias Eustáquio Sena Fernandes e Penha Solange Souza Fernandes, nasceu na cidade de Viçosa, Minas Gerais, em 28 de setembro de 1985.

Realizou o ensino médio no Colégio de Aplicação da Universidade Federal de Viçosa.

Graduou-se Médica Veterinária pela Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (FACISA/UNIVIÇOSA) na cidade de Viçosa, Minas Gerais, no dia 14 de janeiro de 2010.

Durante a graduação, exerceu atividades de monitoria das disciplinas Anatomia Veterinária I e II, Clínica de Grandes Animais, Laboratório Clínico e Patologia Cirúrgica de Grandes Animais. Participou da comissão organizadora das I e II Jornadas Acadêmicas de Medicina Veterinária da UNIVIÇOSA e do IV SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE ANIMAIS SILVESTRES E SELVAGENS – UFV.

Concluiu os estágios supervisionados na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP) em Botucatu, São Paulo, nas áreas de Anestesiologia Veterinária e Reprodução Animal.

Em março de 2010, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, na área de Reprodução Animal, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a tese em março de 2012.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	viii	
LISTA DE FIGURAS .....	ix	
RESUMO .....	x	
ABSTRACT .....	xii	
INTRODUÇÃO GERAL .....	1	
REFERÊNCIAS.....	3	
CAPÍTULO I		
COMPORTAMENTO SEXUAL DE JUMENTOS DA RAÇA PÊGA DURANTE SESSÕES DE COLETAS DE SÊMEN COM VAGINA ARTIFICIAL		
1. INTRODUÇÃO .....	4	
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6	
2.1 Os jumentos.....	6	
2.2 Organização social .....	7	
2.3 Comportamento sexual .....	8	
2.4 Comportamento sexual em coleta com vagina artificial e características seminais .....	9	
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13	
3.1 Animais .....	13	
3.2 Coletas de Sêmen .....	14	
3.3 Avaliação do comportamento sexual .....	14	
3.4 Avaliação do sêmen fresco não diluído .....	15	
3.5 Análises estatísticas .....	16	
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	17	
5. CONCLUSÕES .....	23	
REFERÊNCIAS.....	24	
CAPÍTULO II		
EFEITO DE DIFERENTES SOLUÇÕES NA DILUIÇÃO PÓS- DESCONGELAMENTO NOS PARÂMETROS DE VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE JUMENTOS DA RAÇA PÊGA .....		29
1. INTRODUÇÃO .....	29	
2. REVISAO BIBLIOGRÁFICA.....	31	

2.1 O jumento Pêga .....	31
2.2 Criopreservação de sêmen em equídeos .....	32
2.3 Crioprotetores .....	34
2.4 Plasma Seminal .....	36
2.5 Diluição do crioprotetor .....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	40
3.1 Delineamento Experimental .....	40
3.2 Coleta e avaliação do sêmen .....	41
3.3 Processo de criopreservação .....	42
3.4 Descongelamento do sêmen .....	43
3.5 Avaliação do sêmen “in natura”, do plasma seminal e do sêmen descongelado e processado de acordo com cada tratamento .....	43
3.5.1 Avaliação Física do sêmen .....	43
3.5.2 Teste de termorresistência .....	44
3.5.3 Morfologia espermática .....	44
3.5.4 Teste Supravital .....	45
3.5.5 Potencial Hidrogeniônico (pH) .....	45
3.5.6 Teste Hiposmótico .....	46
3.5.6 Análises estatísticas .....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
5. CONCLUSÕES .....	56
REFERÊNCIAS .....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Motilidade espermática total para o sêmen fresco de asininos em diferentes estudos.....	11
Tabela 2 – Defeitos espermáticos obtidos em sêmen fresco de asininos em diferentes estudos.....	12
Tabela 3 – Sinais fisiológicos do comportamento sexual em jumentos (J1, J2 e J3) observados durante sessões de coleta de sêmen, empregando jumentas em estro natural como manequins....	17
Tabela 4 – Características físicas e morfológicas do sêmen fresco de jumentos da raça Pêga, coletados com vagina artificial.....	21
Tabela 5 – Diluente T2-94, acrescido do crioprotetor dimetilformamida (2,2%) e gema de ovo de codorna (10%).....	42
Tabela 6 – Motilidade (%), vigor (0-5), porcentagem (%) de células não coradas no teste supravital - CSV), porcentagem (%) de células reativas ao teste hiposmótico- RH) e defeitos espermáticos totais após o descongelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga.....	49
Tabela 7 – Motilidade espermática total (%), vigor (0-5) e percentual (%) de células reativas ao teste supravital de sêmen de jumentos congelados em diluente T2-94 acrescido de dimetilformamida a 2,2% e rediluídos pós-descongelamento em plasma 10% v/v ou em diluente Botu-Sêmen de acordo com os tempos de incubação do TTR.....	52
Tabela 8 – Defeitos espermáticos encontrados no exame morfológico do sêmen fresco e descongelado nos diferentes tratamentos....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Motilidade espermática total e percentual de células não coradas no teste supravital do sêmen de jumento de acordo com tempo de incubação no TTR.....	53
--	----

## RESUMO

FERNANDES, Ludmila Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2012. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e diluição pós-congelamento de sêmen de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga.** Orientador: José Domingos Guimarães.

O objetivo do presente estudo foi observar aspectos do comportamento asinino a partir da descrição de várias coletas realizadas com vagina artificial e relacionar esse comportamento com os parâmetros seminais. Avaliou-se, ainda, a eficácia da formulação do diluente T2-94 acrescido de dimetilformamida na proteção das células espermáticas durante a criopreservação do sêmen de jumentos da raça Pêga; analisou-se o efeito da reintrodução do plasma seminal (PS) após o descongelamento na proteção contra o estresse osmótico desse mesmo sêmen; e também o efeito da diluição com Botu-Sêmen® (BTU), avaliando-se os efeitos nos parâmetros de viabilidade espermática mediante as avaliações “in vitro”, descritas no capítulo 2. Foram utilizados neste estudo três jumentos da raça Pêga. Em um primeiro momento, as coletas foram realizadas somente para observação do comportamento sexual dos animais: Número de Reflexos de Flehmen (RF), Números de montas sem ereção (MSE) e Tempo de reação (TR), além da avaliação do sêmen fresco não diluído. Como resultados, observou-se que os animais faziam, em média, 3,9 RF, 1,4 MSE e finalizavam o serviço em torno de 24,8 min. A média do volume ejaculado foi 53 mL. A motilidade média foi de 77%, e o vigor de  $3,7 \pm 0,3$ . A concentração espermática variou de 683 a 710 milhões de espermatozoides por mL de sêmen ejaculado. Na morfologia, a média foi de 12% de células inviáveis no ejaculado. Concluiu-se que, quanto maior o tempo de reação e o número de montas sem ereção, maior a quantidade de ejaculados com a presença de gel. A melhor adequação do manejo a ser empregado, nas condições do estudo, depende proporcionalmente do conhecimento sobre o comportamento sexual dos animais utilizados. Em um segundo momento, sêmen coletado dos referidos animais foi destinado ao congelamento, utilizando-se o diluente T2-94,

acrescido do crioprotetor dimetilformamida. No descongelamento, as amostras foram diluídas em PS ou BTU e observadas por duas horas, durante o teste de termorresistência (TTR). Foram retiradas amostras para avaliação, desse sêmen descongelado, da morfologia e para teste de estresse hiposmótico em três tratamentos (controle, com PS e com BTU). Os resultados mostraram que a motilidade foi superior no tratamento com PS (55,9%), quando comparada com o grupo controle (50,6%). Já a média do vigor espermático foi de 3,4 nos tratamentos com adição de PS e de BTU pós-congelamento. O número de células reativas ao teste supravital, e a porcentagem de defeitos totais observados na morfologia espermática, não diferiram entre os tratamentos. No Teste Hiposmótico, o número de células reativas foi superior no tratamento com adição de PS (43,5%). Durante o TTR, a motilidade manteve-se maior até duas horas após o descongelamento nos tratamentos com adição de PS ou com adição de BTU ( $25,2 \pm 10,6$  e  $23,4 \pm 13,1$ , respectivamente). O mesmo ocorreu com o vigor espermático que no tempo 90 min apresentava  $2,8 \pm 0,4$  no tratamento com adição de PS, e  $2,4 \pm 0,6$  com adição de BTU. A avaliação do meio T2-94 acrescido de dimetilformamida para sêmen de jumentos foi positiva, demonstrando ser capaz de preservar motilidade dos espermatozoides após a criopreservação. A reintrodução do PS mostrou melhora nos parâmetros seminais e manteve um padrão seminal aceitável nos testes "in vitro".

## ABSTRACT

FERNANDES, Ludmila Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2012. **Sexual behavior, seminal parameters and dilution after freezing Pêga breed donkeys (*Equus asinus*) semen.** Advisor: José Domingos Guimarães.

The aim of this study was to elucidate aspects of asinine behavior from the description of various collections using an artificial vagina and relate this behavior with the seminal parameters. We evaluated also the availability of the formulation of the diluent T2-94 plus dimethylformamide in the protection of sperm cells during cryopreservation of semen from the Pêga breed donkeys; examined the effect of the reintroduction of seminal plasma (SP) after thawing in protection against osmotic stress of that semen, and also the effect of dilution with Botu-Semen® (BTU), evaluating the effects on parameters of sperm viability assessments by "in vitro", described in Chapter 2. Used in this study were three Pêga donkeys. At first, the samples were taken only for sexual behavior of animals: Number of Flehmen Reflexes (FR), numbers of mounts without erection (MWE) and reaction time (RT), besides the evaluation of fresh semen is not diluted. The results showed that the animals were, on average, FR 3.9, MWE 1.4 and finishing the service about 24.8 min. The mean ejaculate volume was 53 mL. The motility was 77%, and the force of  $3.7 \pm 0.3$ . The sperm concentration ranged from 683 to 710 million sperm per mL of semen ejaculated. In morphology, the average was 12% of viable cells in the ejaculate. It was found that the greater the reaction time and the number of mounts without erection, the greater number of ejaculations in the presence of gel. The best adequacy of management to be employed under the conditions of the study, the proportion depends on knowledge about the sexual behavior of animals used. In a second step, semen was collected from those animals intended for freezing, using the diluent T2-94, plus the cryoprotectant dimethyl formamide. On thawing, the samples were diluted SP or BTU and observed for two hours, during the heat resistance test (HRT). Samples were removed for evaluation of frozen-thawed semen, the morphology and hypoosmotic stress

test in three treatments (control, SP and BTU). The results showed that the motility was greater in SP treatment (55.9%) compared with the control group (50.6%). The mean of the spermatic was 3.4 with addition of SP and BTU after freezing. The number of cells reactive to supravital test, and the percentage of total defects observed in sperm morphology did not differ between treatments. In hypoosmotic test, the number of reactive cells was higher in treatment with the addition of PS (43.5%). During the HRT, motility was kept higher within 2 hours after thawing with addition of PS or with addition of BTU ( $25.2 \pm 10.6$  and  $23.4 \pm 13.1$ , respectively). The same occurred with the spermatic in T4 showed that  $2.8 \pm 0.4$  in the treatment with the addition of SP, and  $2.4 \pm 0.6$  with the addition of BTU. The evaluation means 94 + T2-dimethylformamide to assess semen were positive, showing be able to preserve sperm motility after cryopreservation. The reintroduction of SP showed improvement in semen parameters and remained seminal acceptable standard tests "in vitro".

## INTRODUÇÃO GERAL

O jumento Pêga é uma raça asinina genuinamente brasileira, 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 feita pelo padre Manoel Maria Torquato de Almeida (NUNES, 2007). Hoje em dia, essa raça é de preferência dos criadores brasileiros por gerar híbridos fortes e de andamento marchado (ANDRADE, 1999).

O estudo da biologia reprodutiva dos animais domésticos tem sido de grande importância para a produção animal. Assim, quanto mais elucidados forem os conhecimentos sobre a condição natural desses animais, aliados à eficiência econômica, melhor e mais eficientemente serão produzidos animais de alto valor zootécnico (HENRY, 1991).

Para que as biotécnicas da reprodução tenham uma eficiência ótima, também em asininos, é imprescindível que se conheçam as particularidades do comportamento sexual dessa espécie (CANISSO, 2008).

Alguns fatores do comportamento sexual do jumento, como, por exemplo, o tempo de reação, assim como ocorre em outras espécies, pode influenciar de forma negativa a qualidade e a fertilidade do sêmen. O excesso da fração gel no ejaculado e a concentração espermática também podem afetar o sêmen, quando a finalidade for o congelamento do sêmen ou a inseminação artificial, uma vez que dificulta a manipulação do mesmo e promove a queda da motilidade espermática (DAVIES-MOREL, 1999).

O uso da inseminação artificial com sêmen congelado é a principal ferramenta utilizada no melhoramento genético animal na maioria das espécies domesticadas. A criopreservação de sêmen é uma importante ferramenta na reprodução animal, facilita sua comercialização, transporte, e torna possíveis os cruzamentos entre animais de grande valor zootécnico, mesmo quando separados por grandes distâncias, resultando em expressivo ganho genético e melhor controle de doenças sexualmente transmissíveis. Adicionalmente, proporciona melhor aproveitamento de animais que estejam em competições, ou se recuperando de doenças (CANISSO, 2008).

Embora o sêmen criopreservado venha sendo utilizado ao longo de 50 anos na indústria bovina, sua utilização na espécie equina e asinina continua limitada. O grande limitante dessa técnica é a baixa fertilidade obtida, quando comparado com sêmen fresco ou resfriado (VIDAMENT et al., 2009).

Gestações em jumentas inseminadas com sêmen congelado de jumento são obtidas somente quando o crioprotetor é diluído ou removido após o descongelamento, como demonstrado nos trabalhos realizados por Trimeche et al. (1998) que registraram 37,5% de prenhez em jumentas e Vidament et al. (2009) com resultado de prenhez igual a 13% em jumentas.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi observar aspectos do comportamento sexual asinino em sessões de coletas realizadas com vagina artificial, bem como a relação desse comportamento com os parâmetros seminais; além de avaliar a eficácia da formulação do diluente T2-94 acrescida de dimetilformamida na proteção da célula espermática durante a criopreservação do sêmen de jumentos da raça Pêga; avaliar o efeito da reintrodução do plasma seminal e de um diluente comercial a base de leite desnatado após o descongelamento na proteção contra o estresse osmótico desse mesmo sêmen.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, L.S. **Jumentos, muares de sela. Criação e julgamento.** Aracaju: Info Graphic's, 13-21, 1999.

CANISSO, I. F. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus Asinus*) da raça Pêga.** 184p. 2008. Dissertação de mestrado em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

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

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

NUNES, R. **O jumento Pêga.** In: I – Simpósio Mineiro de Equideocultura, 1., Viçosa. **Anais...** Viçosa: Departamento de Zootecnia- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p. 33-39, 2007.

TRIMECHE, A., RENARD, P., TAINTURIER, D. A procedure for poitou jackass sperm criopreservation. **Theriogenology**, v.50, p.793-806, 1998.

VIDAMENT, M., VINCENT, P., MARTIN, F. X., MAGISTRINI, M., BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 22-35, 2009.

## **CAPÍTULO I**

### **COMPORTAMENTO SEXUAL DE JUMENTOS DA RAÇA PÊGA DURANTE SESSÕES DE COLETAS DE SÊMEN COM VAGINA ARTIFICIAL**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Os jumentos da raça Pêga têm sido cada vez mais valorizados no Brasil. O crescente interesse por eles provém da visível melhora nos padrões zootécnicos e ganho no potencial genético que os animais têm apresentado em competições de morfologia e andamento. Podem, ainda, produzir muares de qualidade para o trabalho em rebanhos bovinos e para montaria e puxadores de charrete no turismo rural (PUGH, 2002; MACHADO, 2010).

O estudo da biologia reprodutiva dos animais domésticos tem sido de grande importância para a produção animal. Assim, quanto mais elucidados os conhecimentos sobre a condição natural desses animais, aliados à eficiência econômica, melhor e mais eficientemente serão produzidos animais de alto valor zootécnico (HENRY, 1991).

Para que as biotécnicas da reprodução tenham uma eficiência ótima também em asininos, é imprescindível que se conheçam as particularidades do comportamento sexual dessa espécie (CANISSO, 2008).

Por pertencer à mesma família que os equinos, muitos acreditam que a organização social e o comportamento sexual dos asininos sejam similares aos dos equinos, e, portanto, recorrem a procedimentos de manejo similares aos utilizados na criação de equinos. Entretanto, é conveniente que se conheça a espécie asinina, para que se possa otimizar a sua eficiência reprodutiva, incorporando ao máximo, no manejo de criação controlada, as características inerentes à espécie. Agindo assim, respeita-se a sua forma de viver e, conseqüentemente, melhoram-se o seu bem-estar e sua produtividade (HENRY et al., 2009).

Alguns fatores do comportamento sexual do jumento, como por exemplo, o tempo de reação, assim como ocorre em outras espécies (eqüinos e bovinos), pode influenciar de forma negativa a qualidade e a fertilidade do sêmen. O excesso da fração gel no ejaculado e a concentração espermática também podem afetar o sêmen, quando a finalidade é o congelamento do sêmen ou a inseminação artificial, uma vez que o mesmo dificulta a manipulação e diminui a motilidade espermática (DAVIES-MOREL, 1999).

Portanto, propõe-se com este estudo analisar aspectos do comportamento sexual asinino, durante as sessões de coletas de sêmen, realizadas com vagina artificial, bem como verificar a relação desse comportamento com as características seminais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Os jumentos

Os jumentos (*Equus asinus*) foram o quarto grupo de animais de produção a serem domesticados, após ovelhas, cabras e vacas há mais de 7000 anos, com a finalidade de transporte de objetos pesados e pessoas, facilitando a movimentação dos povos à procura de novos pastos para seus rebanhos. Além de animais de carga eram utilizados também na produção de leite, carne e pele (MORAES, 2008; ROSSEL et al., 2008).

No Brasil, a criação de jumentos foi iniciada por Manuel Maria Torquato de Almeida, na Fazenda Curtume, no município de Entre Rios, Minas Gerais. Os cruzamentos entre as raças italiana e egípcia e a seleção dos melhores animais resultaram na criação de uma raça de grande importância para a pecuária nacional, a raça Pêga (NUNES, 2007).

Atualmente, a raça de jumentos Pêga, uma raça autóctone, é preferida pelos criadores brasileiros por gerar híbridos fortes e de andamento marchado, raro atributo zootécnico. Por isso, essa raça vem conquistando um grande número de apreciadores (ANDRADE, 1999).

Esse fato leva a uma maior procura de biotécnicas da reprodução por parte desses criadores, fazendo com que muitos veterinários, pesquisadores e técnicos vislumbrem um novo campo de trabalho. Porém, é preciso observar que, devido a algumas diferenças no comportamento sexual asinino, não se pode simplesmente transferir o manejo reprodutivo de equinos para os jumentos e jumentas, e sim procurar conhecer melhor esse comportamento para, então, estabelecer um manejo reprodutivo adequado a essa espécie (HENRY, 1991).

## 2.2 Organização social

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

Apesar de os equinos e os asininos pertencerem à mesma família "Equidae", a organização social dos equinos ocorre em haréns (não territorial), enquanto a dos asininos é definida como sendo territorial sem a presença de fêmeas junto ao macho dominante do território (MOEHLMAN et al., 1998).

A organização em harém consiste em um grupo relativamente estável de fêmeas adultas mantidas sob a liderança de um garanhão. Na forma selvagem, o grupo é constituído de duas a três fêmeas adultas, podendo chegar a até 15 animais, predominando grupos de quatro a sete fêmeas. Os descendentes, próximos à maturidade, são excluídos do grupo para constituírem, de um lado, um novo harém e, de outro, os grupos de machos solteiros (KLINGEL, 1975; RUDMAN, 1998).

Os asininos apresentam uma organização conhecida como territorial. A definição e a expressão de territorialidade são realizadas pelos machos reprodutores dominantes. O território, em condições naturais de criação, chega a se estender por inúmeros quilômetros quadrados, geralmente apresenta sombra, além de boa disponibilidade de água e pastagens. Esse local só será deixado pelo animal em caso de falta de água e alimento (HENRY et al., 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, comportará como subordinado, sendo que em algumas ocasiões poderá até efetuar coberturas após as do 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).

As fêmeas asininas, por outro lado, não demonstram qualquer preferência por um território, deslocam-se de um para outro, norteadas pelas

suas necessidades de forragem e de água. A migração continuada das fêmeas tem sido um achado constante (KLINGEL, 1975; MCDONNELL, 1998; MOEHLMAN et al., 1998).

### **2.3 Comportamento sexual**

A característica de territorialidade é particularmente expressa pelo macho, quando, durante o trânsito das fêmeas, uma ou mais estiverem no período de receptividade sexual. Nesse período, o reprodutor dominante, dentro do seu território, procura afastar os demais machos subordinados, com o intuito de ser o único a executar o cortejo sexual e a monta das fêmeas receptivas (HENRY et al., 1987).

Em estudos realizados em sistema de monta extensiva, foi observado que a vocalização executada pelo macho é uma forma importante de comunicação e exerce efeito de atração das fêmeas em cio, particularmente, para aquelas que estão fora do campo de visualização do macho. No contexto do comportamento reprodutivo, a vocalização é mais frequente em fêmeas em cio, expressando, aparentemente, uma resposta ao chamado realizado pelo reprodutor dominante. Desse modo, as jumentas são atraídas para esse território (HENRY et al., 1987, 1991; MCDONNELL, 1998).

As jumentas em estro que estejam de passagem pelo território serão cortejadas e cobertas nesse local pelo jumento, podendo permanecer ali, durante todo o período do estro, contudo, sem serem arrebanhadas (HENRY, 1991; LODI, 1993; MCDONNELL, 1998).

O cortejo sexual de jumentos com fêmeas em estro da mesma espécie inicia-se com uma intensa interação macho-fêmea. Ocorre vocalização, olfação nasonasal 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, 1991).

Outras observações frequentes consistem nos atos de retirada em fuga rápida ou lenta, seguindo-se 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).

#### **2.4 Comportamento sexual em sessões de coleta de sêmen com vagina artificial e características seminais**

A escolha de reprodutores para doadores de sêmen tem por finalidade melhorar o desempenho reprodutivo e produtivo dos animais de interesse zootécnico. Por essa razão, é fundamental mais estudos sobre as características genéticas, produtivas e reprodutivas de cada raça, visando à sua conservação, preservação e comercialização.

Conhecendo melhor o comportamento desses animais em vida livre ou em criação extensiva, é possível condicioná-los da melhor maneira possível para que realizem o serviço completo, a fim de se obter sêmen de maneira mais segura e rápida. Promove-se, desse modo, maior adaptação dos animais ao manejo de exploração reprodutiva assistida.

O tempo de reação em asininos é o sinal fisiológico avaliado no comportamento do animal desde o momento em que o jumento é levado até o local onde se encontra a jumenta em estro (devidamente contida), até que ocorra a ereção. Já o tempo de serviço é marcado até que ocorra a penetração e posterior ejaculação, seja na vagina artificial ou em monta controlada (CANISSO, 2008).

HENRY (1991), trabalhando com dois jumentos da raça Nordestina, sob condições de monta controlada em jumentas, registrou o tempo de reação de  $11,6 \pm 8,9$  e de  $11,3 \pm 9,3$  minutos para os dois reprodutores. Já, em condições de monta a campo, trabalhando com os mesmos machos, os tempos de reação foram  $39,9 \pm 30,4$  e  $25,9 \pm 17,8$  min. E COSTA (1991) conduziu um estudo a campo envolvendo o comportamento sexual durante uma coleta de sêmen em 83 machos da raça Pêga e de diferentes idades e estágio reprodutivo e relatou que o tempo de reação variou de um até 45 minutos, com média de 10 minutos

para a realização da coleta de sêmen. O autor ainda observou que ocorreu grande variação desse tempo de reação de acordo com a idade do animal, o clima, o condicionamento prévio e o estresse ambiental.

A importância do tempo de reação em equinos foi demonstrada pela alta correlação com volume de gel no ejaculado, que é uma característica altamente indesejável na manipulação do ejaculado (DAVIES-MOREL, 1999).

O volume do ejaculado em equídeos apresenta uma variação muito grande entre reprodutores e entre coletas de um mesmo reprodutor. A baixa repetição dessa característica está relacionada a muitos fatores, tais como: raça, idade, particularidades individuais, frequência 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 outros (PICKETT et al., 1970; GEBAUER et al., 1974; 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, sendo que os valores mais frequentes estão em torno de 40 a 100 mL (NISHIKAWA, 1959; 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 é aparentemente uma característica individual dependente do jumento, da época do ano, da frequência de coleta, excitação sexual e da idade, além de diferenças raciais.

Entre as características seminais, o percentual de motilidade espermática, particularmente a motilidade progressiva, é um bom indicativo de viabilidade espermática em equídeos (DAVIES-MOREL, 1999). Apesar de não necessariamente ser um indicador da capacidade fecundante, a motilidade espermática, obrigatoriamente, deve estar presente para que o espermatozoide possa fecundar (VOS et al., 1981).

A motilidade espermática total para sêmen fresco de jumentos, conforme estudos de diversos autores, é 70 % a 100 % (Tabela 1) (ARRUDA et al., 1989; CANISSO et al., 2008; ROTA et al., 2008; KER, 2009; DE OLIVEIRA, 2010; TABERNER et al., 2010; e CONTRI et al., 2011).

Tabela 1 – Motilidade espermática total para o sêmen fresco de asininos em diferentes estudos

<b>Autores</b>	<b>Ano</b>	<b>Motilidade espermática Total (%)</b>
Arruda et al.	1989	75,5 ± 7,8
Canisso et al.	2008	84,2 ± 6,0
Rota et al.	2008	94 ± 3,5
Ker	2009	83,07 ± 3,8
De Oliveira	2010	83,0 ± 2,5
Taberner et al.	2010	71,6 ± 15,8
Contri et al.	2011	91 ± 5,1

Outro parâmetro avaliado, o vigor espermático, constitui a avaliação subjetiva da força e velocidade espermática; sendo que Walton (1952) classificou o vigor espermático usando uma escala de 0 a 5, em que zero é o vigor nulo e 5 o vigor máximo. O CBRA (1998) considera adequado, seguindo a mesma classificação, um vigor acima de 3 para o sêmen fresco de equinos, uma vez que não há parâmetro específico para o sêmen de asininos. Papa (1987) atribuiu alto grau de importância ao vigor espermático na avaliação de sêmen de garanhões equinos, principalmente para sêmen congelado. No entanto, tal característica não tem sido utilizada com frequência como parâmetro depreciativo da qualidade de sêmen (GEBERS, 1995).

A concentração espermática é resultante da eficiência espermatogênica e da secreção de fluido pelas glândulas sexuais acessórias (VARNER et al., 1991). A concentração espermática média em jumentos varia de 100 a 800x10<sup>6</sup> espermatozoides por mL, sendo esses valores maiores que os usualmente observados em garanhões (KREUCHAUF, 1984). Segundo a mesma autora, 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.

Nishikawa (1959) desenvolveu estudos pioneiros, comparando as características da morfologia espermática entre garanhão equino e asinino. Esse autor observou que os espermatozoides asininos se assemelham aos dos garanhões, entretanto, apresentam a cauda mais longa e a cabeça de formato ligeiramente mais globoso, semelhante às dos espermatozoides de touros e

carneiros. Adicionalmente, o autor verificou existir uma relação entre a morfologia espermática e a fertilidade de garanhões.

A morfologia espermática de equídeos apresenta similaridade com as demais espécies de animais, porém a cabeça do espermatozoide é assimétrica e a inserção abaxial da cauda é considerada normal; além disso, o acrossomo é relativamente mais delgado quando comparado às demais espécies domésticas (BIELANSKY e KACZMARSKI, 1979; MAGISTRINI, 2000).

Conforme 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). Sendo que o número de defeitos totais não pode ultrapassar 20%, o a porcentagem de defeitos maiores deve ser inferior a 10% para sêmen fresco de eqüinos. Seguindo esses critérios, os autores listados na Tabela 2 obtiveram os seguintes resultados:

Tabela 2 – Defeitos espermáticos observados em sêmen fresco de asininos em diferentes estudos

<b>Autor, Ano</b>	<b>Raça</b>	<b>Defeitos Maiores (%)</b>	<b>Defeitos Menores (%)</b>	<b>Defeitos Totais (%)</b>
<b>Kreuchauf, 1984</b>	Jumento Africano	7,46	4,7	12,2
<b>Henry et al., 1987</b>	Jumento Nordestino	9,1	6,3	15,4
<b>Arruda et al., 1989</b>	Jumento Brasileiro	3,06	3,10	6,16
<b>Morais, 1990</b>	Jumento Pêga	8,55	7,04	15,5
<b>Gebbers, 1995</b>	Jumento Pêga	5,4	4,4	9,8
<b>Ker, 2009</b>	Jumento Pêga	7,3	6,4	13,7

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

O comportamento sexual de três jumentos da raça Pêga foi estudado durante as estações de monta do ano de 2010 e 2011. O estudo foi conduzido no Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, situado no município de Viçosa, Zona da Mata, Minas Gerais, 20°45'20" de latitude S e 42°52'40" e altitude média de 752 m e clima predominante do tipo tropical mesotérmico brando úmido (BDCB/EMBRAPA, 2011).

Os animais apresentavam idade de 2, 4 e 5 anos, com peso corporal entre 240, 300 e 340 kg, respectivamente, hígidos e alocados em baias individuais de 16 m<sup>2</sup> e também mantidos em piquetes de 225 m<sup>2</sup> por um período de 4 horas diárias. Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados com ração concentrada e capim elefante (*Pennisetum purpureum* cv cameroon) picado, fornecido duas vezes por dia em quantidade estimada para manutenção da condição corporal, conforme manejo adotado pela equideocultura e água *ad libitum* (NRC EQUINOS, 2007).

Antes do início do estudo comportamental, os animais foram submetidos ao exame andrológico e apresentaram características espermáticas dentro dos padrões aceitos para sêmen fresco, sendo a motilidade mínima de 70% e vigor maior que 3 (0-5), conforme valores preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998). Os animais passaram por um período de condicionamento e esgotamento e estabilização das reservas extragonadais, por dez dias consecutivos, por meio de uma coleta diária de sêmen, de acordo com Oliveira (2005).

### **3.2 Coletas de Sêmen**

Todas as coletas foram realizadas dentro da estação de monta, de outubro de 2010 a março de 2011, e depois de outubro de 2011 até dezembro de 2011.

As coletas foram feitas utilizando-se uma vagina artificial (modelo Hannover), com água aquecida a 50 °C em seu interior (no momento do preenchimento da vagina), revestida com a membrana mucosa e copo coletor acoplado na proteção de plástico, a intervalos de dois dias, até que se obtivessem 20 ejaculados por animal, totalizando 60 ejaculados de sessões de coleta de sêmen. O local de realização das coletas era um curral com piso de cimento.

O Tempo máximo permitido para cada jumento realizar um serviço foi de 90 min. Caso o jumento não realizasse o serviço completo nesse período, uma nova coleta apenas seria realizada no dia seguinte.

Para efetuar as coletas de sêmen, foram empregadas, como manequins, jumentas Pêga em estro natural. Para tanto, as jumentas foram rufiadas e aquelas que apresentavam sinais de estro, como micção frequente, mastigação (abertura e fechamento da boca), imobilidade e toque no pescoço com a ponta da orelha (HENRY et al., 1987) foram separadas e devidamente contidas para a coleta.

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

Para a avaliação dos sinais fisiológicos de comportamento sexual dos jumentos da raça Pêga, dois observadores sempre estiveram presentes nas sessões de coletas de sêmen e, à medida que as manifestações comportamentais eram expressas pelos animais, eram anotadas em planilhas individuais, sendo o tempo cronometrado. Ao final das observações, obteve-se a média das anotações dos dois observadores.

As coletas eram realizadas em apenas um animal por vez, devido ao comportamento territorialista que os asininos apresentam, utilizando um cabresto longo para que nenhum comportamento natural, como o ato de retirada fosse inibido. Os seguintes sinais de comportamento sexual dos garanhões asininos frente a fêmeas em estro foram avaliados:

1) Reflexo de Flehmen: número de vezes em que o animal manifestou o reflexo de Flehmen na presença da jumenta em estro, em cada uma das coletas.

2) Monta sem ereção: número de vezes em que o jumento realizou a monta no manequim, sem a ereção do pênis.

3) Tempo de reação: tempo, em minutos, da exposição inicial do jumento à jumenta em estro, até a completa ereção.

Apenas esses sinais do comportamento foram avaliados estatisticamente, por sua maior importância, quanto ao comportamento asinino. Embora, os animais também tenham sido classificados de 0 a 3, com relação ao seu interesse pela fêmea em estro, sendo 0 – não demonstra interesse; 1 – pouco interesse, quase não há interação com a fêmea; 2 – há algum interesse, mas o animal se distrai facilmente, há interação com a fêmea, porém, ela não é o foco principal e 3 – apresenta interesse persistente, a fêmea é o foco principal e o animal realiza o serviço completo.

### **3.4 Avaliação do sêmen fresco não diluído**

O copo coletor de sêmen, previamente aquecido a 37 °C foi acoplado à vagina artificial, devidamente protegido da luz e das variações da temperatura ambiente por uma caixa isotérmica. Imediatamente após a coleta, foi verificada a presença ou não da fração gel do ejaculado no filtro do copo coletor. A seguir, o volume do sêmen foi mensurado em uma proveta graduada. Então, uma alíquota do sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37 °C, para avaliação das características físicas seminais, com o auxílio de um microscópio óptico (Bioval®) em um aumento de 40x.

As características seminais observadas foram: motilidade espermática total (0-100%); vigor espermático (1-5); concentração espermática ( $\times 10^6$  espermatozoides/mL) e espermatozoides totais no ejaculado ( $\times 10^9$ ).

Uma amostra de 20 $\mu$ L de sêmen foi adicionada a 1mL de solução de formol salina tamponada pré-aquecida a 37 °C, para posterior avaliação morfológica.

Adicionalmente, uma amostra de 20 $\mu$ L de sêmen foi acondicionada em um frasco com 2mL de solução de formol salina tamponada (proporção de 1:200) para determinação da concentração espermática, empregando-se a câmara de Neubauer.

### **3.5 Análises estatísticas**

Para análises estatísticas, empregou-se o programa SAEG 9.1 (Sistema de Análises Genéticas e Estatísticas – UFV (SAEG-UFV, 2007)). Para as variáveis quantitativas, efetuaram-se os testes de Lilliefors, para verificação da normalidade dos dados, e Cochran e Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias. Os dados foram submetidos às análises descritivas (média, desvio padrão e distribuição de frequência) e quando atendidas as premissas da ANOVA, os mesmos foram submetidos à análise de variância e, quando houve significância a 5%, as médias foram comparadas pelo teste SNK a 5%.

Correlações simples de Pearson foram realizadas entre todas as variáveis estudadas, ou Spermann entre características categóricas.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Não foi observado nenhum tipo de comportamento estereotipado para a espécie, durante o período de coleta de sêmen na presença de uma fêmea em estro, e todos os animais foram classificados com pontuação 3 no quesito interesse pela fêmea. Em todas as coletas, observou-se o comportamento de investigação olfativa do solo e da região perineal da fêmea, bem como a vocalização tanto das fêmeas quanto dos garanhões.

Após um primeiro contato com a fêmea, a vocalização e a investigação olfativa, o próximo comportamento observado era o Reflexo de Flehmen para detecção da fêmea em estro. O número de reflexos de Flehmen observado no presente estudo foi inferior (Tabela 3) ao do estudo conduzido por Gastal et al. (1996), também utilizando jumentas para a coleta de sêmen ( $6,6 \pm 0,5$ ), bem como foi inferior aos verificados por Canisso (2008) que utilizou éguas em estro como manequins, e obteve uma média de 7,4 reflexos de Flehmen por coleta em animais com idades de 3,5 a 16 anos. Já Sereno et al. (1996), ao observarem equinos jovens (3 anos) registrou  $7,6 \pm 4,4$  reflexos de Flehmen quando o macho se aproximava de uma égua em estro.

Tabela 3 – Sinais fisiológicos do comportamento sexual em jumentos (J1, J2 e J3) observados durante sessões de coleta de sêmen, empregando jumentas em estro natural como manequins

Animal/idade	Reflexo de Flehmen	Monta sem ereção	Tempo de reação (min.)
J1/ 6 anos	$2,8 \pm 0,9^B$	$1,0 \pm 0,8^B$	$16,0 \pm 9,5^B$
J2/ 4 anos	$4,6 \pm 1,0^A$	$1,0 \pm 0,9^B$	$25,3 \pm 13,6^{AB}$
J3/ 2,5 anos	$4,4 \pm 1,6^A$	$2,2 \pm 1,1^A$	$32,0 \pm 13,3^A$
Geral	$3,9 \pm 1,4$	$1,36 \pm 1,0$	$24,8 \pm 13,5$

\*Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste SNK.

O reflexo de Flehmen é caracterizado pela elevação do lábio superior e da cabeça, aprisionando o ar no órgão vômero-nasal, seguido por uma respiração profunda com extensão do pescoço para identificação dos ferormônios presentes na região perineal, secreções vaginais, urina e fezes da

jumenta em estro (WEEKS et al., 2002). Esse é um comportamento descrito em jumentas e jumentos a pasto e também em jumentos durante a coleta de sêmen, usando jumentas e éguas como manequim (GASTAL et al., 1996). É um comportamento que ocorre com frequência também em garanhões equinos. O número de reflexos de Flehmen registrado neste estudo pode ter sido influenciado pelo prévio condicionamento dos animais às coletas. Apesar de Canisso (2008) também ter precondicionado os animais às coletas, neste estudo, os animais eram utilizados com frequência em coletas de sêmen para suprir a demanda do Setor de Equideocultura, e não passaram mais de 5 dias sem haver coleta. Mesmo assim o animal mais novo neste estudo fez um maior número de Reflexos de Flehmen o que é atribuído a uma menor experiência em estações de montas anteriores.

Após essa primeira interação com a fêmea caracterizada pela vocalização, investigação olfativa, ato de mascar e Reflexos de Flehmen, no comportamento de todos os animais observados, o ato de retirada ocorreu uma vez durando de 5 a 40 minutos. Henry et al. (1998) observaram que uma particularidade do período de cortejo sexual em asininos é ver o macho se afastar das fêmeas abruptamente, a passo, ou correndo, após um período de interação com elas. A distância percorrida é variável, mas chega a ser de 20 a 30 m. Afastado, o macho pasta ou fica parado em um estado de aparente desinteresse pelas fêmeas. No entanto, durante esse período, observa-se que ele realiza repetidas exteriorizações parciais do pênis e assim ele permanece, até que as fêmeas voltem a se aproximar dele. Ao se aproximarem, as fêmeas deflagram um novo período de interação entre eles. Após vários períodos de cortejo, o macho, afastado das fêmeas, entra em ereção e, na sequência, dirige-se para uma fêmea em cio para cobri-la, não necessariamente a mais próxima. Neste estudo, essa particularidade do afastamento, antes da monta com ereção, que foi possível devido ao longo cabresto, foi observada em todas as coletas.

Ainda, o número de montas sem ereção foi similar ( $1,36 \pm 1,0$ ) aos observados por Canisso (2008) quando utilizou éguas em estro como manequim; e aos estudos de Henry (1991) que utilizou jumentas em estro como manequim. Esse autor observou que o animal mais novo realizou um

maior número de montas sem ereção que os outros mais velhos (0,95 vs 2,87 respectivamente).

A monta sem ereção é um elemento presente no comportamento precopulatório normal de equídeos, sendo frequente sua presença no cortejo do macho com a fêmea (HENRY et. al, 1998). A interpretação dada para esse comportamento é que o macho estaria, dessa forma, avaliando o grau de receptividade da fêmea. Aquelas que estiverem receptivas permanecem paradas ao serem montadas e, na sequência, passam a demonstrar outras atitudes de receptividade. Uma vez montado na fêmea e quando não sofre rejeição, o macho assim permanece por vários segundos até desmontar espontaneamente (HENRY et al., 2009). No entanto, esse sinal fisiológico do comportamento sexual dos asininos mostra-se ausente em equinos, onde diversos estudos não relatam a presença de monta sem ereção, nem em monta natural, nem em coletas com vagina artificial (SERENO et al., 1996; SILVA et al., 2002).

Neste estudo, foi permitido que animais realizassem a monta sem ereção, uma vez que esta é uma característica inerente à espécie e foi observado durante o condicionamento que a monta sem ereção acelerava a execução do serviço, assim como MCDONNEL (2000) observou em garanhões jovens. Canisso (2008) considera esse comportamento essencial para o estímulo sexual durante a coleta de sêmen e alega ser um erro a inibição do mesmo pelo condutor do garanhão, podendo levar à perda de interesse dos animais, quando punidos pela monta sem ereção. Tal resultado foi corroborado por Henry et al. (2009).

Com relação ao tempo de reação observado no presente estudo, o tempo de  $24,7 \pm 13,5$  min (Tabela 3) está dentro da amplitude descrita por Canisso (2008) de 11 a 35 min. Esse mesmo autor relata diferenças entre grupos de jumentos jovens (média de 25 min) e adultos (média de 12 min), o que também ocorreu neste estudo, uma vez que o jumento mais novo (que estava em sua primeira estação de monta) apresentou uma média de 32 min, e os mais velhos de 16 min. Esta característica diferiu dos resultados observados em equinos, por Sereno et al. (1996) que registraram  $5,5 \pm 5,1$  minutos do momento em que o garanhão equino viu a fêmea em estro, até o momento da penetração e ejaculação (serviço completo). Corroborando, Silva et al. (2002)

registraram um tempo de  $4,2 \pm 1,6$  minutos para o tempo de reação em eqüinos (apenas até o momento da ereção).

Quanto às características seminais, sumarizadas na tabela 4, os valores obtidos para o volume do ejaculado sem gel foram de  $51,2 \pm 2,3$ ;  $56,8 \pm 3,0$  e  $50,7 \pm 2,5$  mL, sendo inferiores aos registrados por Ferreira (1993) que trabalhando com três jumentos da raça Pêga, obteve médias de volume do ejaculado sem gel por animal de 104,79; 63,25 e 67,04 mL. No presente estudo, não houve correlação do tempo de reação com o volume seminal ( $r=0,07$ ;  $p>0,05$ ); porém, houve correlação negativa ( $r=-0,33$ ) entre o número de montas sem ereção e o volume seminal, verificando-se que, quanto maior o número de montas sem ereção, menor seria o volume seminal coletado. Tal fato se deveu ao jumento jovem, no qual apresentou maior número de montas sem ereção e maior percentual de ejaculados com gel (85%), e conseqüente maior redução do volume do ejaculado após a remoção do gel.

Valores próximos aos do presente estudo foram registrados por Arruda et al. (1989) que obtiveram em 29 ejaculados de um reprodutor da raça Brasileira um volume de sêmen sem gel de  $46,6 \pm 10,0$  mL e ao estudo de Costa (1991) que realizou um estudo avaliando apenas uma coleta por jumento em 103 jumentos da raça Pêga. Esses reprodutores, criados em diferentes regiões do estado de Minas Gerais e da Bahia, tinham idade que variava de 1,5 até 12 anos, e foram avaliados em diferentes períodos de atividade reprodutiva. O volume médio obtido foi de 66,7 mL, sendo que a porção gelatinosa esteve presente no ejaculado em apenas 13 animais (12,6%).

No presente estudo cada jumento apresentou pelo menos um ejaculado com a presença de gel, sendo no total, 21 ejaculados com gel e 39 sem gel. Houve correlação positiva ( $r=0,53$ ) entre a presença de gel e o tempo de reação, levando à conclusão de que um maior tempo de estímulo sexual pode levar à presença da fração gel no ejaculado, corroborando os estudos feitos por Davies-Morel (1999) em que foi demonstrada alta correlação entre o tempo de reação e o volume de gel no ejaculado de garanhões. Com isso, fica evidente que um condicionamento adequado para que ocorra menor tempo de reação pode diminuir presença de gel no ejaculado, uma vez que além de dificultar a manipulação do ejaculado, o gel causa queda na motilidade e no vigor

espermáticos e favorece a aglutinação dos espermatozóides (DAVIES-MOREL, 1999).

Tabela 4 – Características físicas e morfológicas do sêmen fresco de jumentos da raça Pêga, coletados com vagina artificial

Características	Jumentos			
	J1	J2	J3	Geral
Volume do sêmen sem gel (mL)	51,2±10,5 <sup>a</sup>	56,8±10,5 <sup>a</sup>	50,75±11,1 <sup>a</sup>	53,0± 12,0
Presença de gel	5 <sup>c</sup>	35 <sup>b</sup>	85 <sup>a</sup>	25
Motilidade espermática total (%)	76,7±5,2 <sup>a</sup>	77,7±4,4 <sup>a</sup>	76,5±5,4 <sup>a</sup>	77,0 ± 5,0
Vigor espermático (1-5)	3,6±0,4 <sup>a</sup>	3,8±0,3 <sup>a</sup>	3,7±0,4 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,5
Concentração (espermatozoides/mLx10 <sup>6</sup> )	683±298 <sup>a</sup>	710±288 <sup>a</sup>	698±201 <sup>a</sup>	697 ±261
Defeitos espermáticos Maiores (%)	6,5±2,9 <sup>a</sup>	5,4±3,2 <sup>a</sup>	7,2±3,6 <sup>a</sup>	6,4±3,3
Defeitos espermáticos Menores (%)	6,6±3,4 <sup>a</sup>	5,7±3,3 <sup>a</sup>	5,1±3,2 <sup>a</sup>	5,8±3,3
Defeitos Espermáticos Totais (%)	12,6±4,0 <sup>a</sup>	11,0±3,6 <sup>a</sup>	12,4±4,1 <sup>a</sup>	12,0±3,9

\*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ( $p>0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Gebers (1995) e Canisso (2008) reportam diferenças no tempo de reação entre grupos de jumentos jovens e adultos, bem como a presença de gel no ejaculado de 50% dos jumentos mais jovens. Neste sentido, a idade do animal pode favorecer a ausência de gel no ejaculado, e pode influenciar a maneira como deve ser conduzido o condicionamento desse animal.

A porcentagem de espermatozoides móveis e vigor espermático não foram diferentes entre ejaculados ( $p>0,05$ ). A idade também não influenciou ( $p>0,05$ ) nenhuma das duas características (Tabela 4). Quanto à motilidade espermática total, o valor de 77,0±0,5 (Tabela 4) foi inferior ao obtido por Canisso (2008) de 84,2±6,0, porém, manteve-se dentro das amplitudes citadas por diversos autores, que varia de 70 a 100% (ARRUDA et al., 1989; MIRÓ et al., 2005; CANISSO et al., 2008; ROTA et al., 2008; TABERNER et al., 2010 e CONTRI et al., 2011). A motilidade espermática neste estudo não teve correlação ( $p>0,05$ ) com nenhuma das características comportamentais estudadas, apesar de a motilidade espermática ser aparentemente menor nos ejaculados com a presença da fração gel.

No presente estudo, o vigor espermático registrado foi de  $3,7 \pm 0,5$ , (Tabela 4) valor esse dentro do preconizado pelo CBRA (1998). E não houve correlação do vigor espermático com as demais características seminais ou comportamentais estudadas ( $p > 0,05$ ). O vigor médio avaliado por Henry et al. (1987) em jumentos da raça Nordestina, foi de 4,2. 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, obteve 4,2. Ferreira (1993) registrou valores médios para vigor 3,92; 3,33 e 3,7 em três reprodutores da raça Pêga. Já Gebers (1995) obteve valor médio para vigor de 4,8 e com amplitude de 4,7 a 4,9 em seis jumentos da mesma raça.

Corroborando aos estudos de Gastal (1991), o presente estudo registrou pequenas variações na concentração espermática, com uma média de  $697 \times 10^6$  espermatozoides por mL. Não houve correlação da concentração espermática com nenhum aspecto físico do sêmen ou com as características comportamentais ( $p > 0,05$ ).

Neste estudo, foram obtidos, respectivamente, os valores médios de 6,4; 5,8 e 12,0% para defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais em amostras do sêmen fresco. Valores próximos foram registrados por Kreuchauf (1984) com média de 7,5% (maiores) e 4,7% (menores). Henry et al. (1987), ao trabalharem com jumentos da raça Nordestina, obtiveram médias maiores que as do presente estudo, assim como o de Morais (1990) que trabalhando com seis reprodutores adultos da raça Pêga e 85 amostras de sêmen, obteve média de 8,55% e 7,04% de 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 3,1% de defeitos menores. Já Gebers (1995) ao trabalhar com seis reprodutores da raça Pêga, registrou 5,4% e 4,4% de defeitos maiores e menores, respectivamente, em 288 amostras de sêmen.

## 5. CONCLUSÕES

O estudo permitiu concluir que, quanto maior o tempo de reação e o número de montas sem ereção de um jumento, durante a coleta de sêmen com vagina artificial, maior a quantidade de ejaculados com a presença de gel. O comportamento de menor tempo de reação pode ser moldado pelo condicionamento dos animais às coletas com vagina artificial.

Em virtude das consideráveis diferenças entre equinos e asininos, constatou-se que o manejo deve ser adequado às necessidades dos asininos, uma vez que influencia a eficiência reprodutiva dos mesmos. A escolha de um local adequado, sem a presença de outros animais ou sem muita movimentação de animais e pessoas. Manutenção da temperatura da água da vagina artificial em torno de 45°C, uma vez que o asinino demora um tempo considerável para completar o serviço de monta completo. E ainda permitir a realização de montas sem ereção e utilizar um cabresto longo para conduzir o garanhão e permitir o ato de retirada. E que, com paciência todos esses momentos da coleta sejam respeitados sem punição do animal pela demora em completar o serviço.

Assim, com as informações necessárias para essa adequação do manejo, as chances de insucesso na coleta de sêmen com vagina artificial diminuem.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, L.S. **Jumentos, muares de sela. Criação e julgamento.** Aracaju: Info Graphic's, 13-21, 1999.

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**, n.1, p.215, 1989.

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

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.

CANISSO, I. F. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (Equus Asinus) da raça Pêga.** 184p. 2008. Dissertação de mestrado em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

CANISSO, I. F., SOUZA F.A., KER, P.G., RODRIGUES A.L., SENA, T.C., CARVALHO, G.R. COLETA DE SÊMEN DE JUMENTOS (Equus asinus) UTILIZANDO-SE ÉGUAS EM ESTRO COMO MANEQUIM. **Ciência veterinária nos trópicos**, Recife-PE, v. 11, no 2/3, p. 57 - 64 - maio/dezembro, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2ed, Belo Horizonte, CBRA: 49p. 1998.

CONTRI, A. GLORIA, A. ROBBE, D. De AMICIS, I. CARLUCCIO A. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. **Theriogenology** xx (2011) xxx.

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

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

DE OLIVEIRA, R. R. **Efeito in vitro da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozóides criopreservados de jumentos (Equus asinus) da raça Pêga.** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG. 2010.

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

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

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.

GEBAUER, M.R.; PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; SWIERSTRA, E.E. Reproductive physiology of the stallion: Daily sperm output and testicular measurements. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.165, p.711-713, 1974.

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

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

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

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

HENRY, M., LAGO, L.A., MENDONÇA L.F. Asininos: animais com características sociais e reprodutivas próprias **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.223-230. 2009.

KER, P. G. **Fertilidade do sêmen congelado de jumento (*Equus asinus*) da raça Pêga em éguas inseminadas pré e pós-ovulação.** Dissertação de mestrado em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2009. 55 p.

KLINGEL H. Social organization and reproduction in equids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p.7-11, 1975.

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

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.

MACHADO, J. Pêga em alta, por que os jumentos valem tanto. **Revista HORSE**. N 24. p 28-34 São Paulo. Julho de 2010.

MAGISTRINI M. Semen evaluation. In: **Samper JC. (Ed.). Equine breeding management and artificial insemination.** Philadelphia: WB Saunders. p.91-108. 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. 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.

MIRÓ, J. LOBO, V. QUINTERO-MORENO, A. MEDRANO, A., A. PEÑA A. RIGAU, T. Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. **Theriogenology** .v 63 1706–1716. 2005.

MOEHLMAN PD, FOWLER LE, ROE JH. Feral asses (*Equus africanus*) of Volcano Alcêdo Galapagos: behavioral ecology, spatial distribution, and social organization. **Appl Anim Behav Sci**, v.60, p.197-210, 1998.

MORAES, N.L. **História e origem dos jumentos.** PROAGRI Revista Virtual destinada a pequenos criadores, sítios e quintais. Informações agropecuárias. Jaboaão, 2008. Disponível em: <http://www.oocities.org/agra1net/>. Acesso em janeiro de 2012.

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

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

NUNES, R. **O jumento Pêga**. In: I – Simpósio Mineiro de Equideocultura, 1., Viçosa. **Anais...** Viçosa: Departamento de Zootecnia- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p. 33-39, 2007.

OLIVEIRA, J. V. de. **Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumento (*Equus asinus*) por meio de testes laboratoriais e fertilidade**. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 110p. 2005.

PAPA FO. **Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de equinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial**. 1987. 150p. Tese (Tese Livre Docência em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal, Botucatu, 1987.

PICKETT BW, FAULKNER LC, SUTHERLAND TM. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. **Journal of Animal Science**, v.31, p.713-728, 1970.

PUGH, D. G. **Donkey Reproduction. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**. v. 48. p. 113 - 114. 2002.

ROSSEL, S., MARSHALL, F., PETERS, J., PILGRAM, T., ADAMS, M.D., O'CONNOR, D. Domestication of the donkey: timing, processes, and indicators. **Proceedings of National Academy of Sciences**. USA, v.105, p.3715-20, 2008.

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.

RUDMAN R. The social organization of feral donkeys (*Equus asinus*) on a small Caribbean island (St. John, US, Virgin Islands). **Applied Animal Behavior Science**, v.60, p.211-228, 1998.

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

SAMPER JC. Reproductive system: evaluate of the breeding stallion. **In: Fórum Internacional de Medicina Equina** - ABRAVEQ, 2007, São Paulo, SP. Anais ... São Paulo, SP: ABRAVEQ, 2007. 18p.

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

SILVA, J.R.; BARBOSA, M.; AGRÍCOLA, R. Variação sazonal da produção de sémen e do comportamento sexual de cavalos Lusitanos com 6-8 anos de idade: resultados preliminares. **Congresso de Ciências Veterinárias [Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002]**, SPCV, Oeiras, 10-12 Out. 2002.

SERENO, J.R.B.; MELO, M.I.V. HENRY, M.R.J.M. CASSALI, G.D. **ESTUDO DO COMPORTAMENTO SEXUAL DE EQUINOS DA RAÇA PANTANEIRA NO PERÍODO PERIPUBERAL**. EMBRAPA. Comunicado Técnico. Número 18. Nov./96. ISSN 0102-8316. 1996.

TABERNER, E. R. MORATÓ, R. MOGAS, T. MIRÓ, J. Ability of Catalanian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.118, p. 354-361, 2010.

VARNER D, SCHUMACHER J, BLANCHARD TL, JOHNSON L. Disease and management of breeding stallions. Sta Barbara: **American Veterinary Publications**. 349p. 1991.

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

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**

### **EFEITO DE DIFERENTES SOLUÇÕES NA DILUIÇÃO PÓS-DESCONGELAMENTO NAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE JUMENTOS DA RAÇA PÊGA**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Os jumentos da raça Pêga vêm sendo cada vez mais valorizados no Brasil. O crescente interesse por eles provém da visível melhora nos padrões zootécnicos e ganho no potencial genético que os animais têm apresentado em competições de morfologia e andamento, podendo produzir muares de qualidade para o trabalho em rebanhos bovinos, ser utilizados como montaria e puxadores de charrete no turismo rural e, também, como animais de guarda de pequenos ruminantes. (PUGH, 2002; MACHADO, 2010).

A criopreservação de sêmen é uma importante ferramenta na reprodução animal, pois facilita sua comercialização, transporte e torna possível cruzamentos entre animais de grande valor zootécnico, mesmo quando separados por grandes distâncias, resultando em um expressivo ganho genético e melhor controle de doenças sexualmente transmissíveis. Adicionalmente, proporciona melhor aproveitamento de animais que estejam em competições ou se recuperando de doenças (CANISSO, 2008).

Embora o sêmen criopreservado venha sendo utilizado ao longo de 50 anos na indústria bovina, sua utilização na espécie equina e asinina continua limitada. O grande limitante da utilização dessa técnica é a baixa fertilidade obtida, quando comparado com sêmen fresco ou resfriado (VIDAMENT et al., 2009).

Gestações em jumentas inseminadas com sêmen congelado de jumento são obtidas somente quando o crioprotetor é diluído ou removido após o descongelamento, como demonstraram os estudos realizados por Trimeche et al. (1998) e Vidament et al. (2009).

A taxa de fertilidade de jumentas é insatisfatória, quando comparada àquelas de éguas inseminadas com o mesmo sêmen congelado de jumento, a despeito da boa qualidade espermática no pós-descongelamento. Vários pesquisadores (TRIMECHE et al., 1998, PUGH, 2002, HAGSTROM 2004, OLIVEIRA et al., 2006; CANISSO, 2008 e VIDAMENT et al., 2009) afirmam que a metodologia de congelamento de sêmen utilizada para equinos não é adequada para a espécie asinina.

A reduzida fertilidade, muitas vezes, tem sido correlacionada com a baixa capacidade antioxidante do sêmen e com a diferença da osmolaridade dos meios diluidores para congelamento, sendo que tais fatos podem decorrer da retirada do plasma seminal durante os processos de resfriamento ou congelamento.

Este estudo teve como objetivos avaliar se a formulação do diluente T2-94, acrescido de dimetilformamida, seria eficaz na proteção do sêmen durante a criopreservação do sêmen de jumentos da raça Pêga; avaliar o efeito da reintrodução do plasma seminal após o descongelamento na proteção contra o estresse osmótico desse mesmo sêmen; avaliar o efeito da diluição do sêmen de jumentos da raça Pêga no pós-descongelamento, com um diluidor comercial á base de leite desnatado, avaliando seus efeitos nas características que demonstram viabilidade espermática mediante as avaliações *in vitro*.

## 2. REVISAO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O jumento Pêga

A indústria equina mundial exerce importante papel como fonte geradora de renda e empregos. Em estudo estimativo sobre a indústria do cavalo no Brasil, demonstrou-se que o rebanho efetivo é de cerca de 8,5 milhões de equinos e 1,2 milhões de muares e jumentos. Esse segmento agropecuário é responsável pela geração de 600 mil empregos diretos e 3,2 milhões de empregos indiretos (LIMA et al., 2006).

A raça de jumentos Pêga é 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. A criação e seleção foram iniciadas em 1810, pelo padre Manoel Maria Torquato de Almeida, com cruzamentos entre as raças asininas: italiana e egípcia. Em 1847, o padre transferiu sua criação para o Coronel Eduardo José de Resende na fazenda Engenho Grande dos Cataguases, município de Lagoa Dourada (NUNES, 2007).

O maior interesse na criação de jumentos como doadores de sêmen é a produção de muares. O jumento Pêga é valorizado no meio equestre por produzir excelentes animais marchadores em cruzamentos com éguas de raças puras e mestiças. Além disso, no Brasil, existem diversos criatórios de asininos de elevado padrão genético, onde os reprodutores são de extrema importância na manutenção e no melhoramento da raça (NUNES, 2007).

Mesmo com sua considerável importância no mercado, poucos estudos têm sido realizados na área de reprodução dessa espécie, mesmo em países onde algumas raças de jumentos se encontram ameaçadas de extinção, como é o caso da raça francesa Poitou Jackass (TRIMECHE et al., 1998; VIDAMENT et al., 2009). Entretanto, Henry (1991), Canisso (2008) e Ker (2009) avaliaram, no Brasil, a utilização de protocolos de biotecnologias reprodutivas utilizados para outras espécies, principalmente a equina, e se estas poderiam ser

realmente extrapoladas para os asininos. Entretanto, os autores concluíram que novas metodologias devem ser desenvolvidas, para que sejam atendidas eficientemente as crescentes demandas na espécie asinina, uma vez que os aspectos da biologia reprodutiva do jumento possuem particularidades não compartilhadas com a espécie equina.

## **2.2 Criopreservação de sêmen em equídeos**

Almeida (2006) afirmou que é grande a variabilidade individual no congelamento do sêmen de equídeos, e que essa diferença entre indivíduos parece estar relacionada a aspectos genéticos, não sendo associada à fertilidade “*in vivo*” (monta natural). Outro agravante relacionado ao uso de sêmen congelado é a sua reduzida vida útil nos órgãos genitais da fêmea, causada principalmente por induções de reação acrossomal prematura, devido à retirada do plasma seminal e pelos próprios processos de resfriamento e congelamento (MORRIS et al., 2003).

O processo de criopreservação de sêmen possui várias etapas que podem danificar os espermatozoides, tais como: a mudança de temperatura, o estresse osmótico e tóxico causado pela exposição aos crioprotetores, e a formação e dissolução de gelo no ambiente extracelular (CANISSO, 2008).

O primeiro estresse térmico pelo qual as células espermáticas passam durante o processo de congelamento ocorre durante o resfriamento de 37 °C a 5 °C. Segundo Graham (1996), para o espermatozoide equino, esses efeitos podem ser minimizados pelo controle da taxa de resfriamento entre temperaturas críticas, de 19 °C e 8 °C e pela adição de lipídios (gema de ovo) ou lipoproteínas (leite) ao diluidor, uma vez que estes estabilizam a membrana celular do espermatozoide.

A água pura se congela e forma cristais de gelo a 0 °C. Já o ponto de congelamento de uma solução é determinado pela concentração de partículas que ela contém como soluto. Segundo Zúccari (1998), à medida que a água pura de uma solução se congela, ocorre um aumento de concentração de solutos no líquido residual, e isso resulta em queda contínua do ponto de

congelamento da solução. A autora relata que o ponto de congelamento do citoplasma celular está, normalmente, abaixo de  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mas as células geralmente permanecem não congeladas na faixa entre  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , isto é, se encontram super-resfriadas, mesmo quando o gelo está presente. Tal fato indica que a membrana plasmática pode impedir a propagação do gelo extracelular para o interior da célula super-resfriada.

Considerando-se que a pressão de vapor da água super-resfriada é maior que a do gelo, as células começam a se equilibrar por meio da desidratação e ocorre uma concentração de eletrólitos no interior da célula. À medida que a solubilidade dos eletrólitos vai sendo ultrapassada, os solutos se precipitam, alterando o pH e, abaixo do ponto eutético do sistema, temperatura na qual não resta nenhum líquido, ocorre a precipitação de todos os solutos. Mazur (1970) denominou esses eventos de efeito de solução. Para Pickett (1986), o aumento de concentração de soluto induz a uma desnaturação proteica e, como consequência, reduz a atividade enzimática de espermatozoides congelados.

Abaixo de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , os espermatozoides começam a apresentar mudanças biofísicas, principalmente na membrana plasmática e, abaixo de  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sofrem efeitos de descompensação iônica e de lipídios, suficientemente graves para causar choque térmico. Angola (1994) relata que o efeito desse choque resulta em alteração da motilidade (movimentos em círculos ou retrógrados, presença de peças intermediárias dobradas) e muitos desses processos são considerados irreversíveis.

A regulação de cálcio também é afetada pelo resfriamento, o que provoca sérios efeitos sobre a função celular. Para Watson (2000), o influxo do cálcio resulta na capacitação e fusão entre membrana plasmática e a porção interna da membrana acrossomal externa, o que seria um processo desorganizado e prematuro da reação acrossomal.

Em adição aos fatores que influenciam a sobrevivência dos espermatozoides, Ball e Vo (2001) relataram que danos "subletais" são importantes limitações para equinos e suínos. Estudos demonstram que espermatozoides submetidos a baixas temperaturas sofrem capacitação prematura, danos osmóticos, danos oxidativos nos fosfolipídios de membrana e cromatina, e danos no DNA.

## 2.3 Crioprotetores

Segundo Gao et al. (1993), a adição e remoção de crioprotetores implicam estresse osmótico na membrana plasmática dos espermatozoides, dependendo da relativa permeabilidade dos crioprotetores. Além disso, Santos (2003) destaca que os espermatozoides são altamente sensíveis a efeitos tóxicos dos crioprotetores, efeitos esses que dependem principalmente da concentração utilizada e do período de exposição das células a esses agentes.

Os crioprotetores podem ser divididos em dois grupos: os penetrantes e os não penetrantes. Os primeiros atravessam a membrana plasmática do espermatozoide e atuam no meio intracelular e extracelular. Nesse grupo, estão as pequenas moléculas como o etilenoglicol, glicerol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido, acetamida e outras amidas. Já os não penetrantes são grandes moléculas que não atravessam a membrana plasmática, entre elas as proteínas presentes no leite e na gema do ovo, açúcares e polímeros sintéticos (AMANN e PICKETT, 1993; MCKINNON, 1996; LEIBO e BRADLEY, 1999).

Para Watson (1995), os crioprotetores penetrantes atuam por meio de suas propriedades coligativas e diminuem o ponto de congelamento intracelular, de maneira que uma quantidade maior de água vai permanecer no estado líquido, sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos, propiciando um ambiente menos deletério à célula espermática durante o congelamento.

Estudos recentes têm demonstrado bons resultados ao serem utilizadas amidas, tais como acetamida, metil-formamida e dimetilformamida como crioprotetores penetrantes no congelamento de sêmen de equinos (VIDAMENT et al., 2002; GOMES et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002).

O efeito de concentrações crescentes de dimetilformamida foi tão eficiente quanto o glicerol (2% e 3%) em manter a motilidade e capacidade de fertilização, segundo estudos realizados por VIDAMENT et al. (2002).

Já os crioprotetores não penetrantes protegem as células por meio de efeitos osmóticos, criando um meio hipertônico que induz a saída de água do

meio intracelular para o extracelular, causando a desidratação do espermatozoide e posterior redução da formação de cristais intracelulares durante o congelamento (DALIMATA e GRAHAM, 1997).

O meio básico INRA 82, à base de leite desnatado, modificado por Palmer (1984), tem sido utilizado em equinos, obtendo-se resultados satisfatórios na preservação de células espermáticas resfriadas e congeladas (VIDAMENT et al., 2001; ROTA et al., 2008).

A adição da gema de ovo aos meios diluidores tem mostrado a capacidade desse componente em proteger os espermatozoides contra os danos causados pelo resfriamento e congelamento.

A gema não é uma substância fisicamente homogênea, mas consiste em frações granulares suspensas em uma fase contínua. Muitas das proteínas livres na gema são idênticas às proteínas do sangue, e é provável que se originem delas (VILLELA, 1998). A composição química típica da gema inclui lipídios (60%), fosfolipídios (35%) e esteróis (5%), sendo que 68% do componente proteico são lipoproteínas de baixa densidade, 16% lipoproteínas de alta densidade, 10% de livetinas e 4% de fosvitinas, localizadas em duas frações facilmente separáveis, o grânulo e o plasma da gema (JOLIVET et al., 2006).

O ovo de codorna é um alimento de excelente qualidade, com alta digestibilidade, elevada quantidade de proteína (14%), e baixo teor de colesterol (0,3%). Com relação aos níveis de colesterol, pode-se observar que os ovos de codorna apresentaram as menores concentrações desse constituinte, quando comparados aos ovos de galinha, pata, gansa e peru. Além disso, é uma fonte proteica de ótima qualidade (VILLELA, 1998; BAUNGARTNER, 1994)

A gema amarela (ou vitelo amarelo) do ovo de codorna, assim como o de outras aves, é uma mistura complexa de água, lipídios, proteínas e outros microcomponentes, incluindo vitaminas e minerais. A maioria dos lipídios está sob a forma de lipoproteína e esses compostos costumam formar complexos com cálcio e ferro (BAUNGARTNER, 1994).

Trimeche et al. (1997), afirmaram que o sêmen de jumento, quando congelado em meio contendo 10% de gema de ovo de codorna, adquiriu maior motilidade e melhor qualidade de movimento no descongelamento, comparado

àquele sêmen congelado em meio contendo gema de ovo de galinha. Esses mesmos autores obtiveram 62% (8/13) de prenhez em um estudo onde a fertilidade do sêmen congelado no meio T2-94 (contendo 10% de gema de ovo de codorna e 4% de glicerol) foi testado (TRIMECHE et al., 1998).

Eles verificaram ainda que os parâmetros motilidade linear, motilidade progressiva e velocidade dos espermatozoides de jumentos Poitou foram melhores quando utilizaram gema de ovo de codorna na criopreservação, no lugar da gema de ovo de galinha. Atribuíram essa melhor proteção à maior quantidade de fosfatidilcolinas presentes no ovo de codorna, uma vez que Graham (1996) sugeriu que esses fosfolipídeos da gema poderiam se fundir com a membrana dos espermatozoides, substituindo alguns desses fosfolipídeos e, assim, diminuir a sua temperatura de transição de fases durante o congelamento e descongelamento. Constataram, também, menores quantidades de fosfatidiletanolamina e uma menor proporção de ácidos graxos saturados e insaturados que as encontradas em gema de ovo de galinha, o que tornaria a membrana espermática menos susceptível ao choque térmico, uma vez que a cristalização dos ácidos graxos saturados é mais ordenada e regulada que a dos ácidos graxos insaturados.

## **2.4 Plasma Seminal**

O plasma seminal é a porção fluída do ejaculado, na qual os espermatozoides estão presentes. Ele é composto pelas secreções do epidídimo, ampola do canal deferente, próstata, vesículas seminais e glândulas bulbo-uretrais (MANN, 1975; VARNER et al., 1987).

Existem vários componentes orgânicos e inorgânicos no plasma, como aminoácidos, proteínas, íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , entre outros), bicarbonato, frutose, sorbitol, inositol, ergotiomina, glicerilfosforilcolina, ácido cítrico, ácido ascórbico, lipídeos, enzimas, antimicrobianos, imunoglobulinas e uma variedade de substâncias hormonais, todos em quantidades variadas (GARNER e HAFEZ, 2004).

Segundo Töpfer-Petersen et al. (2005), as proteínas secretadas ao longo do trato genital do macho, presentes no plasma seminal, exercem uma importante função no processo de maturação e capacitação espermática, por meio do remodelamento da superfície celular, possibilitando à célula espermática penetrar a zona pelúcida por meio da reação acrossomal. Entretanto, a influência do plasma seminal na criopreservação de sêmen ainda não está bem definida, pois, enquanto alguns estudos evidenciam seus benefícios, outros postulam que o mesmo provoca efeitos maléficos aos espermatozoides e, por isso, deve ser excluído ou mantido em pequenas frações (BARRETO, 2007). Embora amplamente estudados, os efeitos do plasma seminal nas funções espermáticas ainda são contraditórios (PÉREZ-PÉ et al., 2001).

Parece existir uma concentração mínima dessas proteínas, para que elas se adsorvam na membrana plasmática espermática e possibilitem a reversão das lesões provocadas pelo estresse térmico, como a aglutinação cabeça com cabeça (MAXWELL e JOHNSON, 1999).

Tendo em vista que o plasma seminal é uma fonte de proteção natural dos espermatozoides e que no processo de criopreservação o mesmo é retirado, acredita-se que vários danos poderiam ser minimizados, se esse processo mantivesse uma determinada quantidade de plasma (ALMEIDA, 2006). Diversos estudos foram realizados no intuito de demonstrar o efeito benéfico da adição de plasma seminal ao espermatozoide armazenado (resfriado ou congelado) na espécie equina (BRAUN et al, 1994; AURICH et al., 1996; KATILA et al., 2002; SCHMITT, 2002; MOORE, 2005; ALMEIDA, 2006). No entanto, não há relatos da utilização da adição de plasma em sêmen criopreservado de jumentos.

A adição de plasma seminal de animais que produzem um sêmen de boa congelabilidade ao sêmen com baixa motilidade espermática após o descongelamento aumentou significativamente a motilidade progressiva em estudo realizado por Aurich et al. (1996). Esses pesquisadores verificaram, ainda, que a adição de plasma seminal de baixa congelabilidade diminuiu a motilidade progressiva do sêmen com boa motilidade pós-congelamento.

Os componentes do plasma seminal que determinam a boa congelabilidade do sêmen ainda são desconhecidos e as diferenças individuais

no conteúdo dessas substâncias estabilizadoras da membrana dos espermatozoides no plasma seminal podem explicar as diferenças na capacidade de congelamento do sêmen entre garanhões (AURICH et al., 1996).

No entanto, vários protocolos de congelamento preconizam a retirada do plasma seminal, substituindo-o por diluentes, reduzindo, assim, a proteção conferida aos espermatozoides, pelos fatores decapacitantes que possuem, impedindo, dessa forma, a capacitação prematura deles. Amann & Pickett (1987) relatam que a remoção desse plasma é necessária para a sobrevivência dos espermatozoides criopreservados dos equínos. No entanto, existem poucos trabalhos indicando que esse procedimento possa ser benéfico, de fato.

O perfil das proteínas identificadas no plasma seminal parece variar de acordo com hormônios, as enzimas, os fatores de crescimento e glicoproteínas que permanecem desconhecidos em sua natureza ou função. Além disso, a proporção dessas proteínas varia entre indivíduos de uma mesma espécie (FRAZER; BUCCI, 1996) e entre ejaculados de um mesmo animal (AMANN et al., 1987). A composição e seus efeitos na habilidade de fertilização do espermatozoide variam com a fertilidade individual de cada animal (BRANDON et al., 1999) e, possivelmente, com a estação climática, como sugerem WRENCH et al. (2008).

Martins et al (2006) não observaram correlações entre as características físicas e morfológicas do sêmen fresco com a concentração de proteínas totais solúveis do plasma seminal de caprinos, enquanto Gundogan (2006) demonstrou que as concentrações de proteínas totais presentes no sêmen de ovinos apresentaram correlação com a motilidade espermática.

## **2.5 Diluição do crioprotetor**

Segundo Gao et al. (1993), a adição e remoção de crioprotetores implicam estresse osmótico na membrana plasmática dos espermatozoides, dependendo da relativa permeabilidade dos crioprotetores.

Nos seres humanos, Gao et al. (1993) demonstraram que os espermatozoides são muito sensíveis ao estresse osmótico, mas a motilidade do espermatozoide foi mais sensível ao turgor da célula do que à diminuição da pressão osmótica. Conseqüentemente, eles têm demonstrado que a remoção de glicerol pós-descongelamento, em várias etapas, reduz o estresse osmótico dos espermatozoides.

Calah et al., 1999 afirmam que a remoção do crioprotetor de espermatozoides congelados de frango, através de métodos como a diluição simples, a lavagem, a diálise ou gradiente de centrifugação, tal como parte do processo de descongelamento pode restaurar sua capacidade de fertilização.

Em estudo de Trimeche et al. (1998), a prenhez de jumentas foi obtida somente após se remover o crioprotetor através de diluição, no momento seguinte ao descongelamento.

Constatação semelhante foi obtida por Vidament et al. (2009) que obtiveram sucesso ao inseminar jumentas com sêmen congelado de jumentos diluído com leite (10mL de leite foram adicionados gota a gota em 4mL de sêmen) após o descongelamento ou ainda lavados com leite, sendo que neste caso o sêmen descongelado era centrifugado e o pellet obtido ressuspendido em 1mL de leite.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa com a certificação de número 39/2011.

Este estudo foi realizado no período de 10 de outubro de 2010 a 26 de abril de 2011 no Setor de Equídeocultura, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, localizado na Mesorregião da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil, a uma latitude 20° 45'20" Sul, longitude 42° 52'53" Oeste, altitude média de 690 m e clima predominante do tipo tropical mesotérmico brando úmido (BDCB/EMBRAPA-ESALQ, 2011).

Foram utilizados três jumentos da raça Pêga, clinicamente sadios, com idade de 2, 4 e 5 anos, alocados em baias individuais de 16m<sup>2</sup> e alimentados com ração concentrada e capim elefante (*Pennisetum purpureum* cv cameroon) picado, fornecido duas vezes por dia e água *ad libitum*. Diariamente, os animais eram soltos em piquetes de 225m<sup>2</sup>, por um período de 4 horas, quando então retornavam as suas respectivas baias.

Antes do início das coletas, os animais foram submetidos ao exame andrológico e apresentaram características espermáticas dentro dos padrões aceitos para congelamento, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998), sendo motilidade de 60% e vigor 3.

#### 3.1 Delineamento Experimental

O sêmen congelado com T2-94 (modificado por FERNANDES et al., 2011a), empregando o método de congelamento descrito por Füst (2006), com o crioprotetor dimetilformamida (VIDAMENT, 2009), foi descongelado e submetido aos tratamentos:

T1: (controle, sêmen descongelado)

T2: diluído com plasma (10%v/v)

T3: diluído em meio comercial à base de leite desnatado<sup>1</sup> (proporção de 1:1)

A escolha da concentração do plasma seminal a ser adicionado foi baseada nos melhores resultados alcançados nos estudos de Almeida (2006) e Fernandes et al. (2011b). Após a centrifugação do sêmen o plasma obtido era centrifugado mais uma vez a 1800 rpm, por 30 minutos e armazenado nos próprios tubos de centrifugação, sob refrigeração até serem re-adicionados ao sêmen descongelado. Utilizando-se sempre o plasma obtido da mesma partida.

### **3.2 Coleta e avaliação do sêmen**

Cada reprodutor foi submetido a um período de coletas até a obtenção de onze ejaculados, as quais foram realizadas com intervalos de dois dias. Para a coleta do sêmen, foi empregado o método de vagina artificial, modelo Hannover, com água aquecida a 50 °C, no momento de montagem da vagina artificial. Utilizou-se como manequim uma fêmea em estro natural, não sendo necessário o período de esgota das reservas extragonadais dos animais, uma vez que estes já se encontravam em regime de coleta de sêmen, durante o início da estação de monta. Após a coleta, foi realizado o exame imediato do sêmen, considerando os seguintes itens: coloração (translúcido, branco acinzentado até um branco leitoso ou amarelado), aspecto (aquoso, opalescente, leitoso ou cremoso) volume (mensurado em proveta graduada), motilidade espermática progressiva retilínea, vigor espermático, percentual de células coradas no teste supravital, percentual de células reativas ao teste hiposmótico, osmolaridade e pH.

Adicionalmente uma amostra de 20µL de sêmen foi reservada para avaliação da concentração espermática e cálculo do número de doses. Para o cálculo de concentração, utilizou-se a câmara de Neubauer, com sêmen diluído em solução de formol-salina tamponada na proporção de 1:20.

### 3.3 Processo de criopreservação

Após a coleta, cada ejaculado foi analisado e somente seriam utilizados para congelamento, aqueles que apresentaram motilidade espermática progressiva, igual ou superior a 60%, vigor igual ou superior a 3 e concentração igual ou maior a 60 milhões de espermatozoides por mL, tal como preconizado por CBRA (1998), porém todos os ejaculados apresentaram motilidade maior que 70% e vigor superior a 3. Foi então separado em alíquotas iguais, em quatro tubos tipo Falcon de 10 mL e os mesmos foram centrifugados a 600 g por 10 minutos a temperatura ambiente (ALMEIDA, 2006). Após centrifugação, o plasma seminal foi retirado e armazenado em tubos falcon e congelado (-20°C). Para ressuspensão do sêmen utilizou-se o meio diluente T2-94 (TRIMECHE, 1998) acrescido do crioprotetor dimetilformamida (2,2%) e gema de ovo de codorna (10%) para o congelamento (Tabela 5).

Tabela 5 - Diluente T2-94, acrescido do crioprotetor dimetilformamida (2,2%) e gema de ovo de codorna (10%)

Componente	Quantidade
L-glutamina	11,692g
Glicose	50 g
Citrato de sódio	0,6 g
Citrato de Potássio	0,82 g
Gema de codorna (10%)	200 mL
Dimetil formamida (2,2%)	22mL
Leite desnatado	1 L
Água destilada	qsp.
Lactose	3 g
Rafinose	3 g
Gentamicina	10.000 UI
Total	2 L (osmolaridade igual 391mOsm/Kg)

Adaptado de TRIMECHE, 1997.

O volume final de ressuspensão foi calculado de forma a se obter  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Para envase, foram utilizadas palhetas de

polietileno (modelo francês) de 0,5mL. As palhetas foram envasadas por aspiração, identificadas e lacradas com álcool polivinílico.

As palhetas foram depositadas em um dispositivo especial contendo 200 mL de álcool absoluto, então, resfriadas 60 min em refrigerador a 5°C. Após período de estabilização, a bandeja contendo as palhetas foi transferida para um suporte em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido a uma distância de 6 cm acima da superfície de nitrogênio líquido. Nesse procedimento, as palhetas foram mantidas a uma temperatura próxima de -130°C, onde permaneceram por 20 min no vapor de nitrogênio, sendo posteriormente mergulhadas no nitrogênio líquido e estocadas em um botijão criogênico a -196°C (FÜRST, 2006).

### **3.4 Descongelamento do sêmen**

As palhetas foram descongeladas em água aquecida a 75 °C durante 7 segundos e imediatamente transferidas para o banho-maria a 37 °C durante 30 segundos e depositadas em tubos plásticos de 1,5mL (Eppendorf ®) (FÜRST, 2006). Foi feito um pool de 4 palhetas da mesma partida descongeladas e armazenados em banho-maria para a realização da diluição do crioprotetor de acordo com cada tratamento descrito no delineamento experimental.

### **3.5 Avaliação do sêmen “in natura”, do plasma seminal e do sêmen descongelado e processado de acordo com cada tratamento**

#### **3.5.1 Avaliação Física do sêmen**

Imediatamente após a coleta foi verificada a presença ou não da fração gel do ejaculado no filtro do copo coletor de sêmen. A seguir, o volume do sêmen foi mensurado em uma proveta graduada. Então uma alíquota do

sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecidos a 37 °C para avaliação das características físicas seminais com o auxílio de um microscópio óptico em um aumento de 400x.

Os parâmetros seminais observados foram: motilidade espermática total (0-100%); vigor espermático (1-5); concentração espermática ( $\times 10^6$  espermatozoides/mL). Sendo que a motilidade e o vigor foram analisados em no mínimo 5 campos na lâmina.

### **3.5.2 Teste de termorresistência**

O teste de termorresistência consistiu em submeter ao estresse térmico o sêmen descongelado, diluído ou não de acordo com cada tratamento. Foram descongeladas 4 paletas de 0,5 mL e retirada uma amostra de 1mL do sêmen para cada tratamento (T1 – controle, apenas sêmen; T2- adição de plasma seminal homólogo e T3 – adição do meio comercial a base de leite desnatado e acondicionado em tubos plásticos de 1,5 mL (Ependorf ®) para ser submetido a 2 horas de incubação em banho-maria à temperatura de 37°C. Durante o período de incubação, uma alíquota de sêmen de cada tratamento foi colocada entre lâmina e lamínula preaquecidas a 37 °C e avaliadas quanto à motilidade espermática progressiva retilínea (0-100%) e ao vigor espermático (0-5), em intervalos de 0, 30, 60, 90 minutos (ZÚCCARI, 1998 e KER, 2009) com o auxílio de um microscópio de contraste de fase em aumento de 200X.

### **3.5.3 Morfologia espermática**

A morfologia espermática foi avaliada utilizando-se 20 µL da amostra de sêmen diluída em 500 µl de solução de formol salina tamponada. Após a diluição, uma alíquota foi retirada para realização de preparação úmida e avaliação por microscopia de contraste de fase. Em cada lâmina foram contadas 200 células, registrando as anomalias da cabeça, cauda e peça

intermediária de acordo com Blom (1973) e depois classificadas conforme padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal –CBRA (1998).

#### **3.5.4 Teste Supravital**

A avaliação das células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas em vermelho) pelo teste supravital foi realizada utilizando-se solução de eosina (1%) e negrosina (5%), conforme descrito por Swanson & Bearden (1951). Uma amostra de 20 µL de sêmen foi homogeneizada com 20 µL do corante e um esfregaço fino confeccionado sobre a lâmina. Após aproximadamente 30 segundos (BARTH e OKO, 1989), a amostra foi analisada em microscopia óptica em aumento de 1.000x sob óleo de imersão e contabilizado o total de 100 células, em cada tempo do teste de termorresistência. Células consideradas vivas apresentavam a cabeça espermática corada de vermelho, já as células consideradas mortas apresentavam a região da cabeça não corada.

#### **3.5.5 Potencial Hidrogeniônico (pH)**

O conhecimento do pH do sêmen pode auxiliar no entendimento de algumas reações uterinas a determinados tipos de sêmen e para tal mensuração é considerado normal o limite de 5,9 a 7,3, apesar de ser comprovado um aumento na atividade espermática, quando o meio se torna mais alcalino (em pH de até 10). Para essa mensuração, foram utilizadas fitas comerciais de pH, com o auxílio de uma pipeta automática, 10 µL de sêmen era depositado em uma fita de pH e após 3 minutos era feito a sua leitura.

### **3.5.6 Teste Hiposmótico**

O teste hiposmótico foi realizado no sêmen descongelado segundo o protocolo adotado por REVELL e MRODE (1994), em amostras de todas as partidas antes do congelamento e após serem descongeladas. Sendo uma amostra de 20 µL de sêmen homogeneizada em 2 mL de solução hiposmótica previamente aquecida a 37°C e posteriormente incubada por 1 hora a 37°C. Foi utilizada uma solução contendo sacarose a uma osmolaridade de 128mOsm/kg. Depois do período de incubação, 0,5mL de formol salina tamponada foi adicionada à amostra para fixação da mesma. Uma gota dessa amostra foi colocada entre uma lâmina e uma lamínula. Foram contados 200 espermatozoides em microscopia de contraste de fase em aumento de 1.000X, sob uma gota de óleo de imersão, verificando-se o percentual de espermatozoides que apresentaram seu flagelo dobrado ou enrolado. Foram utilizados os critérios de dobramento de cauda, conforme descrito por REVELL e MRODE (1994) para sêmen bovino. Segundo os autores, os graus de enrolamento dependem da quantidade de água que entra na célula, até que ocorra o equilíbrio entre os meios extracelular e intracelular. Os espermatozoides que se apresentaram com a membrana intacta, com cauda levemente dobrada, cauda dobrada e fortemente dobrada foram contabilizados como espermatozoides reativos à solução espermática.

O cálculo do percentual de células reativas foi feito por meio da fórmula  $HOST = (\% \text{ de espermatozoides com a cauda dobrada após o HOST}) - (\% \text{ de espermatozoides com a cauda dobrada na análise morfológica})$  (MELO e HENRY, 1999).

### **3.5.6 Análises estatísticas**

Para análises dos dados, foi empregado o Sistema de Análises Genéticas e Estatísticas – 9.1 (SAEG-UFV, 2007). Para todas as variáveis,

efetuaram-se as análises descritivas dos dados (médias, desvio padrão e distribuição de frequência). Empregou-se ANOVA e quando algum efeito foi observado pelo teste F, realizou-se a comparação de médias pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro.

Realizou-se a Correlação Simples de Pearson para todas as variáveis estudadas e a Correlação de Spearman para as variáveis categóricas.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH seminal se manteve constante (entre 6,75 e 7,5), mesmo após a adição do diluente T2-94 com dimetilformamida no momento antes do congelamento e após o descongelamento com a adição de plasma ou do diluente Botu-Sêmen®.

A razão de utilização da dimetilformamida como crioprotetor neste trabalho decorre dos bons resultados obtidos por alguns autores (GOMES et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002; VIDAMENT et al., 2002 SQUIRES et al., 2004 e OSORIO, 2006), quando utilizaram amidas, tais como acetamida, metilformamida e dimetilformamida como crioprotetores no congelamento de sêmen de equinos.

Gomes et al. (2002), ao usarem dimetilformamida, metilformamida, dimetilacetamida e glicerol verificaram que a motilidade total e progressiva foram mais expressivas para as células espermáticas conservadas pela dimetilformamida.

A porcentagem de espermatozoides móveis e vigor após criopreservação não foi diferente entre partidas ( $p>0,05$ ). No entanto, o tratamento influenciou ( $p<0,05$ ) ambos os parâmetros (Tabela 6).

A porcentagem de espermatozoides móveis foi superior no tratamento com plasma seminal (55,9%), quando comparada com o grupo controle (50,6%, Tabela 6), o que sugere que os componentes do plasma seminal influentes na fisiologia espermática se mantiveram e foram capazes de manter a motilidade espermática. Corrobora-se os estudos de Trimeche et al. (1998) que, utilizando o mesmo diluente T2-94, porém com glicerol, verificaram 53,4% de motilidade total no sêmen descongelado de jumentos. Entanto, foi superior aos resultados registrados por Canisso, (2008) que obteve médias de motilidade espermática total igual a 37,4% para sêmen descongelado, com diluentes à base de gema de ovo de galinha e glicerol em jumentos da raça Pêga. Almeida (2006), trabalhando com garanhões, registrou 61,9% de motilidade espermática total do sêmen descongelado acrescido de 5% de plasma seminal.

Tabela 6 – Motilidade (%), vigor (0-5), porcentagem (%) de células não coradas no teste supravital), porcentagem (%) de células reativas ao teste hiposmótico) e defeitos espermáticos totais após o descongelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga e rediluídos em plasma 10% v/v ou em diluente comercial a base de leite desnatado de acordo com os tempos de incubação do TTR

Tratamento	Motilidade	Vigor	Supra Vital	Hiposmótico	Defeitos Totais
Controle	50,6±6,9 <sup>B</sup>	3,2±0,3 <sup>B</sup>	49,4±8,6 <sup>A</sup>	35,4±12,6 <sup>B</sup>	15,6±4,9 <sup>A</sup>
+ Plasma	55,9±8,3 <sup>A</sup>	3,4±0,3 <sup>A</sup>	49,9±8,7 <sup>A</sup>	43,5±11,6 <sup>A</sup>	16,8±5,3 <sup>A</sup>
+Botu-Sêmen®	53,3±7,4 <sup>AB</sup>	3,4±0,4 <sup>AB</sup>	49,0±6,8 <sup>A</sup>	41,4±7,7 <sup>AB</sup>	18,0±4,3 <sup>A</sup>

\*Médias seguidas por letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Oliveira (2005) verificou uma motilidade espermática total de 64,6% em sêmen de jumento Pêga congelado com meio à base de 5% de gema de ovo de galinha e dimetilformamida (3%), porém esse mesmo autor não obteve nenhuma prenhez em jumentas, utilizando vários tipos de diluentes. Isso leva a consideração do quanto a motilidade do sêmen de asininos ao descongelamento está relacionada à fertilidade.

Os resultados obtidos neste estudo para motilidade espermática logo após o descongelamento diferem dos achados de Fagundes (2003) que observou melhores resultados de motilidade total em espermatozoides de equinos, quando utilizou proteínas de plasma seminal concentradas (10% v/v) e plasma proveniente do mesmo garanhão (plasma autólogo) como feito neste estudo. Porém, o tipo de diluente utilizado por Fagundes (2003) foi o proposto por Martin (1979), cujo crioprotetor é o glicerol, e obteve motilidade média de 38,4%, portanto menor que a observada neste estudo (55,9%), com o diluente T2-94, acrescido de dimetilformamida como crioprotetor.

Já a média do vigor espermático foi de 3,4 nos tratamentos com adição de plasma e de Botu-Sêmen pós-congelamento, sendo que no grupo controle a média do vigor foi igual a 3,2 (Tabela 6). Papa (1987) considera o vigor espermático um dos pontos fundamentais para a avaliação de sêmen congelado de garanhões. Os valores obtidos neste estudo foram semelhantes aos do trabalho de Canisso (2008) e superiores aos encontrados por Ker (2009) que obteve valor de 2,73±0,33 para o vigor espermático logo após o

descongelamento. Os resultados obtidos sugerem que o metabolismo energético foi preservado nas células espermáticas durante o processo de criopreservação.

Neste estudo, foi verificada uma correlação positiva baixa para a motilidade espermática ( $r=0,26$ ) e para o vigor espermático ( $r=0,23$ ) do sêmen fresco e das mesmas características após descongelado, indicando que, quanto melhor as características do sêmen fresco, melhor serão estas mesmas características após o descongelamento.

O número de células que não se apresentaram coradas durante a contagem (máximo  $49,9\pm 8,7\%$ ) e a porcentagem de defeitos totais (máximo  $18,0\pm 4,3$ ) observados na morfologia espermática não diferiram entre os grupos experimentais ( $p>0,05$ /Tabela 6), indicando que o processo de criopreservação não causou danos à morfologia espermática.

Na Tabela 6, os dados do teste hiposmótico demonstram que a reintrodução do plasma seminal bem como a adição do meio comercial, mantiveram as membranas espermáticas funcionais, protegendo-as contra o estresse osmótico. Nas amostras descongeladas com adição de plasma, 43,5% das células foram reativas ao teste hiposmótico, 41,4% foram reativas quando adicionado o meio comercial a base de leite desnatado e 35,4% quando não se adicionava nenhum diluente. Porém, todos foram inferiores aos 78,1% de espermatozoides reativos do sêmen fresco ( $p>0,05$ ) demonstrando que o processo de criopreservação em si já causa vários danos na membrana.

Com relação ao teste hiposmótico, o número de células reativas ao estresse hiposmótico foi superior no tratamento com adição de plasma (43,5%), comparado aos demais (Tabela 6). Isso sugere que a adição de plasma seminal pode ter influenciado na proteção da membrana, e que esta manteve suas funções de balanceamento osmótico. Mesmo quando ocorreram as mudanças de volume da célula (encolhimento e à expansão da membrana em resposta à hiperosmolaridade do crioprotetor), assim como a desidratação induzida pelo congelamento, que são processos que desestabilizam as membranas e/ou o citoesqueleto, e levam a lesões de membrana (GRAHAM, 1996).

O plasma seminal, na porcentagem adequada (máximo 10%v/v), evitou o influxo abrupto de água para o interior da célula espermática após o

descongelamento, evitando danos à membrana plasmática dessas células, preservando suas funções osmóticas. Esses dados corroboram os de Almeida (2006), que adicionou plasma seminal em sêmen descongelado de garanhões equinos.

Neste estudo, a correlação entre células reagidas ao teste hiposmótico e motilidade espermática foi positiva e de alta intensidade ( $r=0,70$ ). Vidament et al. (1997) e Melo (1999) registraram alta correlação entre espermatozoides reagidos ao teste hiposmótico com a motilidade espermática para garanhões.

A motilidade e o vigor espermáticos, após o descongelamento, também tiveram correlação positiva com o teste hiposmótico ( $r=0,70$  para motilidade x teste hiposmótico e  $r=0,36$  para vigor x teste hiposmótico), além de uma variação considerável do sêmen fresco e descongelado, indicando que o teste hiposmótico (em solução de sacarose) é um teste complementar adequado para avaliação de sêmen congelado/descongelado de jumentos.

Durante o teste de termorresistência (Tabela 7), a motilidade se manteve maior até duas horas após o descongelamento nos tratamentos com adição de plasma ou com a adição do meio comercial a base de leite desnatado ( $25,2\pm 10,6$  e  $23,4\pm 13,1$  respectivamente). O mesmo ocorreu com o vigor espermático que em T4 apresentava  $2,8\pm 0,4$  no tratamento com adição de plasma e  $2,4\pm 0,6$  no tratamento com adição do meio comercial.

Tabela 7 – Motilidade espermática total (%), vigor (0-5) e percentual (%) de células reativas ao teste supravital de sêmen de jumentos congelados em diluente T2-94 acrescido de dimetilformamida a 2,2% e rediluídos pós-descongelamento em plasma 10% v/v ou em diluente comercial a base de leite desnatado de acordo com os tempos de incubação do TTR

Tratamentos				
Características	Tempo (minutos)	Controle	+Plasma	+Botu-Sêmen <sup>®</sup>
<b>Motilidade</b>	5	50,6±6,9 <sup>b</sup>	55,9±8,3 <sup>a</sup>	53,3±7,5 <sup>ab</sup>
	30	40,5±10,9 <sup>b</sup>	50,2±5,5 <sup>a</sup>	47,6±7,6 <sup>a</sup>
	60	32,7±11,2 <sup>b</sup>	41,4±7,5 <sup>a</sup>	38,9±10,9 <sup>a</sup>
	90	24,1±11,5 <sup>b</sup>	34,0±9,7 <sup>a</sup>	30,3±11,3 <sup>ab</sup>
	120	16,0±11,6 <sup>b</sup>	25,2±10,6 <sup>a</sup>	23,4±13,1 <sup>a</sup>
<b>Vigor</b>	5	3,3±0,3 <sup>b</sup>	3,5±0,3 <sup>a</sup>	3,5±0,4 <sup>ab</sup>
	30	3,0±0,4 <sup>b</sup>	3,3±0,3 <sup>a</sup>	3,3±0,4 <sup>a</sup>
	60	2,7±0,5 <sup>a</sup>	3,0±0,4 <sup>a</sup>	3,0±0,4 <sup>a</sup>
	90	2,1±0,8 <sup>a</sup>	2,8±0,4 <sup>a</sup>	2,6±0,5 <sup>ab</sup>
	120	1,8±0,9 <sup>b</sup>	2,3±0,5 <sup>a</sup>	2,4±0,6 <sup>a</sup>
<b>Supravital</b>	5	49,5±8,6 <sup>a</sup>	49,9±8,7 <sup>a</sup>	49,0±6,8 <sup>a</sup>
	30	41,0±7,3 <sup>a</sup>	44,5±7,9 <sup>a</sup>	43,2±5,9 <sup>a</sup>
	60	37,8±7,4 <sup>a</sup>	39,9±6,7 <sup>a</sup>	38,5±6,3 <sup>a</sup>
	90	32,0±9,0 <sup>a</sup>	34,8±6,0 <sup>a</sup>	32,2±6,1 <sup>a</sup>
	120	27,0±9,5 <sup>a</sup>	27,6±8,0 <sup>a</sup>	26,4±5,5 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Já o teste supravital, realizado em todos os tempos de avaliação do teste de termorresistência não apresentou diferenças entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), porém o número de células não coradas decresceu de acordo com o passar do tempo acompanhando, de certa forma, a queda da motilidade espermática, o que foi indicado pela correlação positiva entre as duas variáveis ( $r = 0,32$ ) (Tabela 7; Figura 1). Os dados indicam que a metodologia utilizada

neste estudo foi adequada para avaliação do sêmen de jumentos congelado/descongelado com o diluidor T2-94, ao contrário do resultado registrado por Canisso (2008), em que se afirmou que a coloração com eosina-nigrosina, para o sêmen congelado com os diluidores, não é adequada para a avaliação do sêmen congelado com os diluidores Martin ou Nagase & Niwa.

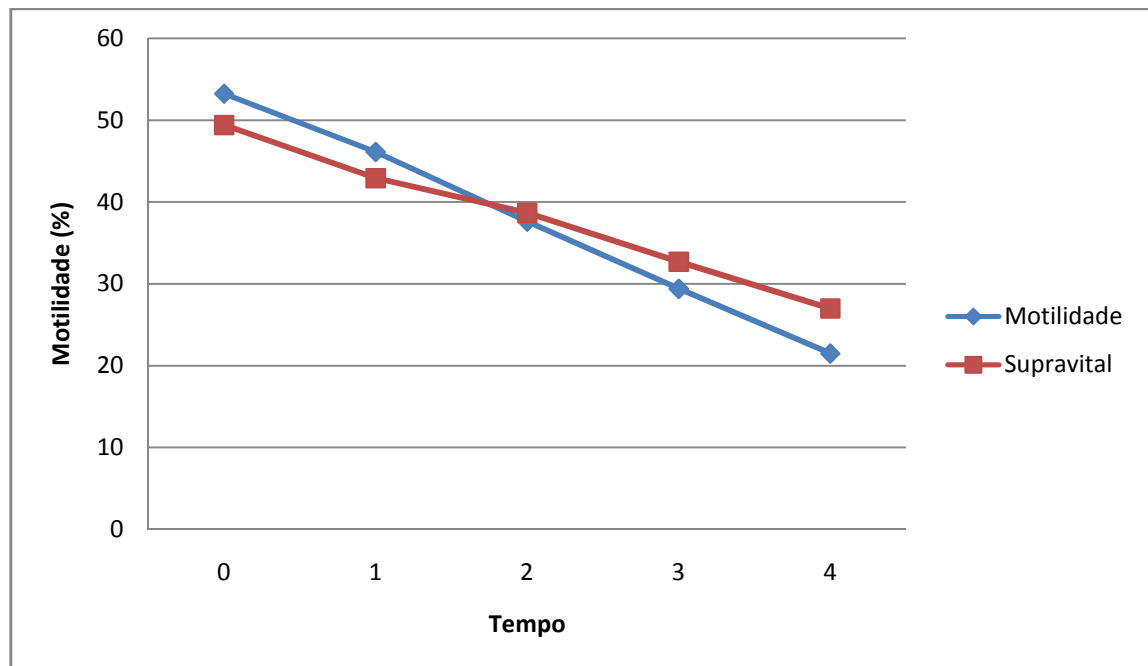


Figura 1 - Motilidade espermática total e percentual de células não coradas no teste supravital do sêmen de jumento de acordo com tempo de incubação no TTR.

Trimeche et al. (1997) afirmaram que a proporção de fosfatidilcolinas e de fosfatidiletanolaminas encontradas em gema de ovo de codorna é o dobro da proporção desses fosfolipídeos encontrada na gema de ovo de galinha. Graham (1996) sugeriu que esses fosfolipídeos da gema poderiam se fundir com a membrana dos espermatozoides, substituindo alguns desses fosfolipídeos e, assim, diminuir a sua temperatura de transição de fases durante o congelamento e descongelamento. A fosfatidilserina, presente nos dois tipos de gema, sozinha ou combinada com a fosfatidilcolina são os fosfolipídeos mais efetivos em proteger a membrana espermática do choque térmico. Por conter mais fosfatidilcolinas que a gema de ovo de galinha é que a

gema de ovo de codorna seria melhor para proteger a membrana espermática. Além disso, a gema de ovo de codorna contém mais ácidos graxos saturados do que insaturados, o que torna a membrana espermática menos suscetível ao choque térmico, uma vez que a cristalização dos ácidos graxos saturados é mais regulada e ordenada que a dos ácidos graxos insaturados. Os bons resultados obtidos neste trabalho confirmam que o diluente T2-94 com gema de ovo de codorna foi realmente eficaz na preservação da membrana plasmática dos espermatozoides de jumentos.

Como demonstrado na Tabela 8, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os defeitos espermáticos (menores, maiores ou totais) verificados nas amostras do sêmen fresco e descongelado nos diferentes tratamentos. O diluente T2-94 + dimetilformamida foi eficiente em manter a estrutura da célula espermática durante o processo de criopreservação. O mesmo ocorreu no trabalho de Almeida (2006) com adição de plasma ao sêmen descongelado de cavalos.

Os valores médios observados para essa característica estiveram dentro dos limites considerados normais para sêmen congelado/descongelado de garanhões, de acordo com as normas do CBRA (1998). Poucos estudos levam em consideração a morfologia espermática como critério de avaliação do congelamento de sêmen em jumentos e a semelhança entre os resultados de trabalhos, mesmo com diluente e crioprotetores diferentes (VIEIRA et al., 1985; ARRUDA et al., 1989; SILVA et al., 1997 e CANISSO, 2008), levam a acreditar que o sêmen de jumento pode possuir algum tipo de resistência estrutural ao processo de criopreservação celular, o que beneficiaria a criopreservação espermática se as taxas de fertilidade obtidas até hoje, não fossem tão insatisfatórias.

Tabela 8 – Defeitos espermáticos\* encontrados no exame morfológico do sêmen de jumentos da raça Pêga, submetidos a diferentes diluições pós-descongelamento.

	Sêmen Fresco	Controle	+Plasma**	+Botu-Sêmen®***
<b>Defeitos Maiores</b>	6,1±3,0	9,0±5,3	8,4±4,2	9,8±3,6
<b>Defeitos Menores</b>	7,0±3,3	6,9±3,9	8,6±4,9	8,2±3,9
<b>Defeitos Totais</b>	13,7±6,2	13,6±4,9	16,8±5,4	18,0±4,4

\*  $p > 0,05$ .

\*\* Plasma a 10% (v/v)

\*\*\* Diluente Botu-Sêmen na proporção 1:1.

Os resultados das características seminais motilidade e vigor, após o congelamento do sêmen de jumentos com o diluente T2-94, contendo gema de ovo de codorna e dimetilformamida obtidos neste estudo foram superiores aos resultados de alguns autores que utilizaram diluentes contendo gema de ovo de galinha e glicerol em sua composição (CANISSO, 2008; KER, 2009; JEPSEN, 2010).

Neste estudo, foi verificada uma correlação positiva porém baixa para a motilidade espermática ( $r=0,26$ ) e do vigor espermático ( $r=0,23$ ) do sêmen fresco e para as mesmas características do sêmen depois de descongelado. Indicando que quanto melhor as características seminais do sêmen fresco, melhor serão estas características no sêmen após descongelado. A motilidade do sêmen descongelado também teve uma correlação positiva com o teste supravital ( $r=0,75$ ) da amostra do mesmo sêmen. Mostrando que o protocolo de congelamento manteve uma boa viabilidade da membrana plasmática e que o teste supravital foi eficiente em demonstrar esta característica.

## 5. CONCLUSÕES

A avaliação do meio de congelamento alternativo para sêmen de jumentos foi positiva, demonstrando ser o T2-94 + dimetilformamida capaz de preservar motilidade adequada das células espermáticas após a criopreservação, bem como a preservação do vigor e integridade da membrana plasmática como demonstraram os testes supravital e hiposmótico.

A reintrodução do plasma seminal e a adição do meio diluente comercial promoveram a melhora nas características seminais e manteve um padrão seminal aceitável nos testes *in vitro*, embora as análises laboratoriais nem sempre reflitam a fertilidade real da amostra seminal e os efeitos da reintrodução do plasma seminal, bem como utilizando o diluente T2-94 acrescido de dimetilformamida, devem ser testados *in vivo* para que a questão da baixa fertilidade do sêmen congelado de jumentos seja elucidada.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, JL. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino.** Dissertação Mestrado em Agronomia. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Eq Vet Sci**: 7,145-73. 1993.

ANGOLA, A.P. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. **Vet Méx**: v.25, n.3, p.207. 1994.

ARRUDA RP, VIEIRA RC, BARBOSA RT, MANZANO A. Congelamento do sêmen de jumentos: características reprodutivas de um doador. **Rev Bras Reprod Anim Supl**, n.1, p.215, 1989.

AURICH, J.E., KÜNE, A., HOPPE, H., AURICH, C. Seminal plasma effects membrana integrity and motility of equine spermatozoa after criopreservation. **Theriogenology**, New York, v.46, p. 791-797, 1996.

BARTH, A. D., OKO, R. J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. 1st 6 ed. Ames: **Iowa State University Press**. 1989. 285 p.

BALL, B.A., VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **J. Androl.** 72, 1061–1069. 2001.

BARRETO, M. A. P. **Efeito das proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 KDa sobre a congelabilidade do sêmen, reação inflamatória uterina e fertilidade.** 67 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2007.

BAUNGARTNER, J. Japanese quail production, breeding and genetics. **World's Poultry Science**, 50:228-235, 1994.

BDCB, Banco de Dados Climáticos do Brasil. Parceria da EMBRAPA e ESALQ/USP Na web:  
<http://www.bdclima.cnpm.embrapa.br/resultados/balanco.php?UF=&COD=106>.  
Acesso em: 15/12/2011.

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.

BRAUN, J., TORRES-BOGGINO, F., HOCHI, S., OGURI, N. Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5 degrees. **Dtsch Tierarztl Wochenschr.** Aug, v. 101, n.8, p.319-22. 1994.

CANISSO, I. F. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus Asinus*) da raça Pêga.** 184p. 2008. Dissertação de mestrado em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2. ed, Belo Horizonte, CBRA: 49p. 1998.

DALIMATA, A.M., GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with threalose and methyl cellulose. **Theriogenology**: v.48, n.5, p.831-841. 1997.

FAGUNDES, B. **Análise do congelamento e descongelamento de sêmen eqüino utilizando proteínas do plasma seminal em diferentes concentrações.** Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2003. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2003. 47p.

FERNANDES, L.S., MACHADO T.P., SILVEIRA C.O., DIAS, J.C.O., B.W. FREITAS B.W., AMORIM L.S., GUIMARÃES J.D. **Uso da gema do ovo de codorna (*Coturnix japonica*) na criopreservação do sêmen de jumentos da raça Pêga (*Equus asinus*).** CBRA 2011, Recife, PE. 2011a.

FERNANDES, L.S., SILVEIRA C. O., MACHADO T. P., FREITAS B. W., AMORIM, L.S. e GUIMARÃES J. D. **Avaliação dos parâmetros espermáticos do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga com a adição de diferentes concentrações de plasma seminal.** In: Anais Simpósio de Integração Acadêmica/UFV. Viçosa, MG. 2011b.

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.

GAO DY, MARK L, McGANN LE, LIU J, KLEINHANS FW, MAZUR P. and CRISTER J.K. (1993). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of cryoprotective agent (CPA): modeling and optimization. **Cryobiology**, 30: 649. 1993.

GARNER, D. L., HAFEZ, E. S. E. Espermatozoide e plasma seminal. In: Hafez, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole Ltda. cap. 7, p. 97-110. 2004.

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 the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, 277-279. 2002.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet Clin North Am Equine Pract**: v. 12, n.1, p.131-47. 1996.

HAGSTROM, D. J. Donkeys are Different: An Overview of Reproductive Variations from Horses. **Equine Extension Specialist**, University of Illinois Written: January, 2004.

JASKO, D.JJ, MORAN, D.M., FARLIN, M.E., SQUIRES, E.L., AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. **Proc 38th Ann Conv AAEP**: p.649-660. 1992.

JEPSEN, R. J. EVANS, L.E., and YOUNGS C.R., Use of Direct Thaw Insemination to Establish Pregnancies with Frozen–Thawed Semen from a Standard Jack. **Journal of Equine Veterinary Science**. Vol 30, No 11. 2010.

JOLIVET, P., BOULARD, C.; BEAUMAL, V. et al. Protein components of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4424-4429, 2006.

KATILA, T., ANDERSON, M., REILAS, T., KOSKINEN, E. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, v.58, 241-4. 2002.

KER, P. G. **Fertilidade do sêmen congelado de jumento (*Equus asinus*) da raça Pêga em éguas inseminadas pré e pós-ovulação**. Dissertação de mestrado em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2009. 55 p.

LEIBO, S.P., BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: GAGNON, C. (ed). The male gamet: from basic science to clinical applications. **Vienna: Cache River Press**. p.501-516. 1999.

LIMA, R.A.de S. SHIROTA, R. BARROS, G.S. de C. **Estudo do Complexo do agronegócio do cavalo**. CEPEA/ESALQ/USP. Piracicaba, SP. 251 ps. 2006.

MANN, T. Biochemistry of stallion semen. **J. Reprod. Fertil.**, v.23. p.47-52. 1975.

MACHADO, J. Pêga em alta, por que os jumentos valem tanto? **Revista HORSE**. N. 24. p 28-34 São Paulo. Julho de 2010.

MARTIN, J.C., KLUG, E., GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 47-51, 1979.

MAXWELL, W. M. C., JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1353-1362. 1999.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**: v. 168, n.934, p.939-949. 1970.

MCKINNON, A.O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. **Austr Eq Vet. J**: v.14, p.156-175. 1996.

MEDEIROS, A.S.L., GOMES, G.M., CARMO, M.T., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**. 58, 273-276. 2002.

MELO, M.I.V. **Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 67 p. 1999. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária – UFMG, 1999.

MOORE, A.I., SQUIRES, E.L., GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2372-2381. 2005.

MORRIS, L.H., TIPLADY, C., ALLEN, W.R. Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozenthawed

spermatozoa onto the uterotubal junction. **Equine Vet J**: v.35, n.2, p.197- 201. 2003.

NUNES, R. O jumento Pêga. In: I – Simpósio Mineiro de Equideocultura, 1, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Departamento de Zootecnia- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. p. 33-39.

OLIVEIRA, J. V. de. **Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumento (*Equus Asinus*) por meio de testes laboratoriais e fertilidade.** Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 110p. 2005.

OLIVEIRA, J. V., ALVARENGA, M. A., MELO, C. M., MACEDO, L. M., DELL'AQUA Jr., J. A., PAPA, F. O. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. **Anim. Rep. Sci.**, v. 94, p. 82-84, 2006.

OSORIO, JP. **Efeito da adição fracionada de dimetil formamida e das curvas de congelamento na viabilidade in vitro pós-descongelamento do espermatozoide equino.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. Belo Horizonte, Minas Gerais. 61p., 2006.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: **Proceedings 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, v. 3, Urbana (Abstract 377). 1984.

PAPA, F.O. **Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de equinos: 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.

PÉREZ-PÉ, R., CEBRIÁN-PÉREZ, J. A., MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p. 425-434. 2001.

PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation. In: **TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS. Proceedings...** Fort Collins: Colorado State University: p.1-5. 1986.

PUGH, D. G. **Donkey Reproduction. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP.** v. 48. p. 113 - 114. 2002.

REVELL, S.G., MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 77-86, 1994.

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. 142p. Viçosa, MG, 2007.

SANTOS, O.E.C. **Viabilidade in vitro do sêmen de cão submetido a congelamento com diferentes diluidores e crioprotetores**. Belo Horizonte, MG: UFMG. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

SCHMITT, F. L. **A concentração, a composição e a qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen equino a +4°C**. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de pós-graduação em ciências veterinárias. Porto Alegre, RS. 101f. 2002.

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.

SQUIRES, E.L., KEITH, S.L., GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology** 62, 1056–1065. 2004.

SWANSON, E. W., BEARDEN, H. J. An eosin-nigrosin stain for differentiating 19 live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 10, p. 981- 987.1951.

TÖPFER-PETERSEN, E., EKHLASI-HUNDRIESER, M., KIRCHHOFF, C. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-170, 2005.

TRIMECHE, A., ANTON, M, RENARD, P., GANDEMER, G. AND TAINURIER, D. Quail Egg Yolk: A Novel Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Poitou Jackass Sperm. **Cryobiology** 34, 385–393. 1997.

TRIMECHE, A., RENARD, P., TAINURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v.50, p.793-806, 1998.

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.

VIDAMENT, M., YVON, J.M., COUTY, I. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. **Animal Reproduction Science, Amsterdam**, v.68, p.201-218, 2001.

VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M., JULIENNE, P., EVAÏN, A., NOUE, P., PALMER, E. Equine frozen semen freezability and fertility fields results. **Theriogenology**, n. 48, p.907-917, 1997.

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., VINCENT, P., MARTIN, F. X., MAGISTRINI, M., BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 22-35, 2009.

VIEIRA, 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.

VILLELA, J L., **Criação de codornas**. Cuiabá: SEBRAE/MT. 91p. (Coleção Agroindústria, v. 14). 1998.

WALTON, A.A. Flow orientation as a possible explanation of "wave motion" an "rheotaxis" of spermatozoa. **J Exp Biol**, v.29.p.520-531, 1952.

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the production of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, n. 2, p. 483- 492, 1981.

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

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. Tese de doutorado apresentada em Botucatu, SP, 1998.