

PEDRO GAMA KER

**FERTILIDADE DO SÊMEN CONGELADO DE JUMENTO (*Equus asinus*)
DA RAÇA PÊGA EM ÉGUAS INSEMINADAS PRÉ E PÓS-OVULAÇÃO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

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

T

K39f
2009

Ker, Pedro Gama, 1983-

Fertilidade do sêmen congelado de jumento
(*Equus asinus*) da raça pêga em éguas inseminadas pré e
pós-ovulação / Pedro Gama Ker. – Viçosa, MG, 2009.
xv, 55f. : il. ; 29cm.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 46-55.

1. Asinino - Reprodução. 2. Sêmen. 3. Asinino - Recursos
do germoplasma - Criopreservação. 4. Ovulação.
5. *Equus asinus*. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

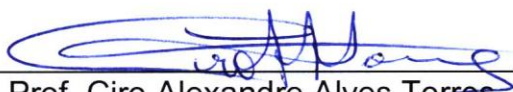
CDD 22. ed. 636.182

PEDRO GAMA KER

FERTILIDADE DO SÊMEN CONGELADO DE JUMENTO (*Equus asinus*) DA
RAÇA PÊGA EM ÉGUAS INSEMINADAS PRÉ E PÓS-OVULAÇÃO

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

Aprovada: 19 de fevereiro de 2009.



Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Coorientador)



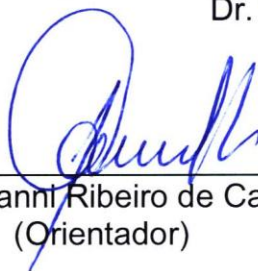
Prof. Eduardo Paulino da Costa



Prof. Alan Maia Borges



Dr. Lincoln Silva Amorim



Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

*“Determinação, coragem e autoconfiança
são fatores decisivos para o sucesso.
Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades.
Se estamos possuídos de uma inabalável determinação,
conseguiremos superá-los.
Independentes das circunstâncias,
devemos sempre ser humildes, recatados e
despidos de orgulho.”*
Dalai Lama

*“O batido do casco da mula
com o meu coração combina.
Minha tráia é de alpaca
Nossa tropa é coisa fina.”*
Gigio Biasetto e Roberto Corrêa

DEDICO

A Nossa Senhora Aparecida,

Ao meu pai, João Carlos Ker, exemplo de responsabilidade e honestidade, que foi o maior incentivador na decisão da realização dessa pós-graduação.

A minha mãe, Maria José de Souza Gama Ker, sempre muito compreensiva e carinhosa, me apoiando em todas as horas.

Ao meu Avô, Carlito Nogueira da Gama, que desde criança me passou grandes ensinamentos sobre o jeito simples de viver e que foi base para minha paixão pela Medicina Veterinária e pelos Eqüídeos.

A minha namorada Sophia pelo constante apoio e amor dedicados em todos os momentos dessa empreitada.

Aos meus irmãos, Henrique e Mariana, pelo amor e amizade durante toda a vida.

Aos eqüídeos de uma forma geral, mas principalmente aos asininos e muares, que foram uns dos responsáveis pelo desbravamento de nosso País e hoje são umas das grandes paixões de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me iluminar e me dar força em momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização desse curso.

Ao meu orientador, professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pela amizade, compreensão e ensinamentos.

Aos meus pais, pelo apoio e por me incentivarem a fazer o curso de mestrado, mesmo não dispondo de bolsa.

Ao Senhor Luiz Felipe Haddad, pela amizade fraterna e pelo apoio dedicado ao projeto cedendo toda a estrutura do Haras Tarumã, para realização do experimento.

À Hertape Calier Saúde Animal, por fornecer as doses de Vetecor®.

Ao amigo e companheiro, médico veterinário Dr. Guilherme Pugliesi, pelo grande auxílio prestado durante o período experimental.

À Sophia pelo apoio incondicional, todo amor, carinho e paciência durante essa longa jornada.

Aos estagiários que contribuíram para realização do experimento: Renan Reis de Oliveira, Thiago de Castro Sena, Polyana Galvão e Cinthian de Deus Vítório.

Aos companheiros e colegas da pós-graduação Charles, Gilberto, Renan, Guilherme, Daniel Rates, Danillo Murta (UFMS), Wender, Paulo Gustavo, Fabrício, Bruno, Verônica, Nelcino e Leonardo.

Ao responsável pelo setor de Eqüideocultura do DZO-UFV, Fernando Antônio de Freitas, pela amizade, conselhos e pela convivência durante o desenvolvimento desse trabalho. Aos demais funcionários do setor de Eqüideocultura.

À todos os funcionários do Haras Tarumã, em especial ao José Roberto da Silva (Betão), grande companheiro e amigo, indispensável durante as atividades desenvolvidas no Haras Tarumã.

Aos meus familiares, avós, tios e primos, que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

Ao professor Joaquín H. Patarroyo Salcedo, por ceder o laboratório e o microscópio de epifluorescência.

Aos professores do programa de pós-graduação do Departamento de Zootecnia e do Departamento de Veterinária pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas não mencionados, que de alguma forma contribuíram para concretização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

PEDRO GAMA KER, filho de João Carlos Ker e Maria José de Souza Gama Ker, nasceu no dia 14 de maio de 1983, na cidade de Florianópolis, Santa Catarina.

Em maio de 2002, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, concluindo este no dia 16 de março de 2007.

Em março de 2007 ingressou no Programa de Pós-graduação, em nível de mestrado, no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, com área de concentração em Reprodução Animal.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Composição e modificações da membrana plasmática durante o processo de resfriamento	4
2.2. Princípios da criopreservação espermática	5
2.3. Injúrias espermáticas devido ao processo de criopreservação	7
2.4. Crioprotetores mais utilizados para sêmen de eqüídeos	8
2.4.1. Crioprotetores penetrantes	9
2.4.2. Crioprotetores não-penetrantes	11
2.5. Principais meios diluentes utilizados para sêmen de asininos	12
2.6. Curva de resfriamento	13
2.7. Curva de congelamento	14
2.8. Curva de descongelamento	15
2.9. Avaliação do sêmen para congelamento	16
2.9.1. Avaliação do sêmen descongelado	16
2.9.2. Avaliação da integridade da membrana plasmática ..	16

2.9.2.1. Teste de sondas fluorescentes	17
2.9.3. Teste de Termorresistência (TTR)	17
2.10. Indução da ovulação em éguas	18
2.10.1. hCG	19
2.11. Dose inseminante, local de deposição, momento de inseminação e fertilidade do sêmen congelado de eqüídeos	19
2.11.1. Dose inseminante	19
2.11.2. Local de deposição do sêmen	21
2.11.3. Momento da inseminação	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Local e período experimental	24
3.2. Manejo dos animais	24
3.3. Coleta e avaliação do sêmen	25
3.4. Centrifugação, diluição e envase	26
3.5. Resfriamento do sêmen	27
3.6. Congelamento	28
3.7. Descongelamento	29
3.8. Avaliação do sêmen descongelado	29
3.9. Testes complementares	29
3.9.1. Teste de termorresistência (TTR)	29
3.9.2. Teste de sondas fluorescentes	29
3.10. Controle folicular e inseminação artificial	31
3.11. Diagnóstico de gestação	31
3.12. Análises estatísticas	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Características e avaliações seminais	33
4.2. Características foliculares	38
4.3. Fertilidade	40
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Agentes indutores da ovulação comumente usados em éguas	18
Tabela 2 – Composição do meio diluidor para centrifugação	26
Tabela 3 – Composição do diluidor de congelamento	27
Tabela 4 – Solução de estoque para utilização na técnica de fluorescência para avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide	30
Tabela 5 – Solução de trabalho para coloração fluorescente para avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide ..	30
Tabela 6 – Valores médios e desvios-padrão das características do sêmen fresco de jumento da Raça Pêga	33
Tabela 7 – Valores médios e desvios-padrão das patologias espermáticas das partidas do sêmen fresco de jumento da Raça Pêga ..	33
Tabela 8 – Tempo médio (minutos) transcorrido entre a coleta e os procedimentos de congelamento de sêmen de jumento da Raça Pêga ...	34
Tabela 9 – Valores médios de diâmetro (mm) folicular inicial, de tempo (horas) até a ovulação e de diâmetro (mm) do folículo pré-ovulatório de animais tratados sem e com hCG	39
Tabela 10 – Tempo (dias) e taxa de crescimento folicular diária (mm/dia) da detecção do estro à ovulação de animais tratados ou não com hCG ..	40

Tabela 11 – Tempo (dias) e taxa de crescimento folicular diária (mm/dia) do folículo de 33 mm à ovulação de animais tratados ou não com hCG ..	40
Tabela 12 – Taxa de gestação aos 13 dias após ovulação de éguas inseminadas pré ou pós ovulação usando sêmen congelado/descongelado de jumento da Raça Pêga	41
Tabela 13 – Taxa de prenhes aos 13, 25 e 35 dias de éguas inseminadas após pré e pós ovulação, usando sêmen congelado de jumento da Raça Pêga	42
Tabela 14 – Intervalos médios (horas) do último controle folicular à inseminação, no sistema pós-ovulação, e da última inseminação à ovulação, no sistema pré-ovulação	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Suporte de aço inoxidável para palhetas de 4 cm de altura	28
Figura 2 – Motilidade progressiva (%) média do sêmen fresco, pós-centrifugação, pós-resfriamento e descongelado do sêmen de jumento da Raça Pêga	34
Figura 3 – Vigor espermático (0-5) médio do sêmen fresco, pós-centrifugação, pós-resfriamento e descongelado do sêmen de jumento da Raça Pêga	35
Figura 4 – Motilidade progressiva (%) do sêmen descongelado nos diferentes tempos do teste de termoresistência (TTR)	36
Figura 5 – Vigor espermático (0-5) do sêmen descongelado nos diferentes tempos do teste de termoresistência (TTR)	37
Figura 6 – Porcentagem de espermatozóides lesados, semi-lesados e intactos no teste de fluorescência do sêmen descongelado	37

RESUMO

KER, Pedro Gama, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Fertilidade do sêmen congelado de jumento (*Equus asinus*) da raça Pêga em éguas inseminadas pré e pós-ovulação.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-orientadores: José Monteiro da Silva Filho e Ciro Alexandre Alves Torres.

O objetivo desse estudo foi avaliar a fertilidade de éguas inseminadas antes e após a ovulação com sêmen congelado de um jumento da Raça Pêga. Foram realizadas treze coletas de sêmen com uso de vagina artificial, modelo Hannover. Foram realizadas avaliações do sêmen fresco, resfriado e congelado nas diferentes fases da criopreservação por avaliação subjetiva dos parâmetros físicos e análise da morfologia espermática. Após a coleta e avaliações dos parâmetros físicos, o sêmen foi diluído no meio de mínima contaminação, centrifugado a 650 g/15 minutos, e ressuspendido no diluidor de lactose-EDTA-gema de ovo. A concentração espermática foi de 100 milhões de células/palheta de 0,5 mL. O sêmen foi resfriado, estabilizado e congelado. A longevidade espermática foi avaliada por meio do teste de termo resistência (TTR). A motilidade e o vigor espermático foram avaliados nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos após o descongelamento. A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando as sondas diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio. Quarenta e oito éguas foram distribuídas em dois tratamentos. T1 (n=25): controle folicular realizado a intervalos de seis horas com inseminações realizadas após a ovulação. T2

(n=23): aplicação de 2000 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) quando os folículos atingiram 35-40 mm de diâmetro. O controle folicular foi realizado em intervalos de 12 h e inseminações 24 h após a aplicação do hCG, repetidas caso a ovulação não ocorresse 48 h após a aplicação da gonadotrofina. As inseminações foram feitas no ápice do corno uterino ipsilateral ao folículo ovulatório, na dose de 300 milhões de espermatozóides viáveis. A motilidade e vigor médio do sêmen fresco foram respectivamente de $83,07 \pm 3,83$ e $3,61 \pm 0,36$; para o sêmen congelado, foram de $41,92\% \pm 8,3$ e $2,73 \pm 0,33$. A motilidade e vigor médio do sêmen nos tempos 0, 30, 60 e 90 foram, $36,9\% \pm 6,5$ e $2,6 \pm 0,3$, $35\% \pm 7,1$ e $2,5 \pm 0,3$, $33,8\% \pm 5,2$ e $2,5 \pm 0,3$, $30\% \pm 7,1$ e $2,5 \pm 0,3$, respectivamente. A porcentagem de espermatozóides íntegros, semi-lesados e lesados foram de $24,9 \pm 11,1$, $9,9 \pm 4,3$ e $66,4 \pm 8,5$, respectivamente. A fertilidade foi de 40% e 26% para os tratamentos 1 e 2, respectivamente ($p > 0,05$). Para T1, o tempo médio do último controle folicular até a inseminação foi 6:35 h. No T2 o tempo médio da última inseminação à ovulação foi de 20:16 h. Pode-se inferir que neste trabalho que o tempo médio de 20:16 horas entre a inseminação e a ovulação no T2 foi longo para o sêmen de jumento.

ABSTRACT

KER, Pedro Gama, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009.
Fertility of semen freeze of Pêga breed donkeys (*Equus asinus*) in mares inseminated on two moments. Advisor: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-Advisors: José Monteiro da Silva Filho and Ciro Alexandre Alves Torres.

The objective of this study was to evaluate the fertility of mares inseminated with Pêga donkey's frozen semen, before and after ovulation. Thirteen semen collections were performed using artificial vagina, Hannover model. Evaluations were performed in fresh, cold and frozen semen in different cryopreservation stages by subjective evaluation of physical parameters and sperm morphology analysis. After collection and physical parameters evaluations, semen was diluted in the minimum contamination medium, centrifuged at 650 g/15 minutes, and resuspended in lactose-EDTA-egg yolk extender. The sperm concentration was 100 million cells/0.5 mL straw. Semen was cooled, stabilized and frozen. The sperm longevity was evaluated using the term resistance test (TRT). The spermatoc motility and vigor were evaluated at 0, 30, 60 and 90 minutes after thawing. The SMI was measured using the probes of carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide. Forty-eight mares were distributed into two treatments. T1 (n = 25): follicular control performed at six hours intervals and inseminations performed after ovulation. T2 (n = 23): 2000 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) application when the follicles reached 35-40 mm in

diameter. The follicular control was performed at 12 hours intervals and inseminations 24 hours after hCG application, repeated if ovulation did not occur for 48 hours after gonadotropin application. The inseminations were performed at the apex of the uterine horn ipsilateral of the ovulatory follicle, with a sperm dose of 300 million viable sperm. The motility and the average vigor of fresh semen were respectively 83.07 ± 3.83 and 3.61 ± 0.36 ; for thawed/frozen semen were $41.92\% \pm 8.3$ and 2.73 ± 0.33 . The motility and average vigor of thawed semen at 0, 30, 60 and 90 were $36.9\% \pm 6.5$ and 2.6 ± 0.3 , $35\% \pm 7.1$ and 2.5 ± 0.3 , $33.8\% \pm 5.2$ and 2.5 ± 0.3 , $30\% \pm 7.1$ and 2.5 ± 0.3 , respectively. The percentage of intact spermatozoa, semi-injured and injured were 24.9 ± 11.1 , 9.9 ± 4.3 and 66.4 ± 8.5 , respectively. The fertility was 40% and 26% for treatments 1 and 2, respectively ($p > 0.05$). For T1, the average time of last follicular control to insemination was 6:35 hours. In T2, the average time of the last insemination to ovulation was 20:16 hours. Its possible to infer that in this work that the average time of 20:16 hours between insemination and ovulation in T2 was longer for the donkey sperm.

1. INTRODUÇÃO

Os asininos da raça Pêga vêm sendo muito valorizados nos últimos anos, principalmente, pelo o andamento marchado transmitido aos seus descendentes, asininos ou muares (híbridos entre eqüinos e asininos).

Em eqüinos, é bastante expressivo o número de estudos nas diversas áreas de reprodução. Nos asininos, apesar de sua grande importância na agricultura e pecuária nacionais, poucas pesquisas têm sido desenvolvidas no Brasil visando ampliar os conhecimentos da fisiologia reprodutiva dessa espécie.

A inseminação artificial com sêmen congelado representa uma importante ferramenta no melhoramento genético animal. Esta biotecnologia da reprodução maximiza o uso de garanhões, permitindo o maior número de descendentes de animais de alto valor genético, a redução no custo do transporte, a melhoria no controle de doenças sexualmente transmissíveis e o uso de animais já mortos (SQUIRES *et al.*, 1999).

Outra finalidade desta tecnologia é a preservação de material genético por um inesgotável período de tempo, propiciando a formação de um banco de germoplasma, conhecido como preservação “*ex situ*” (MARIANTE e CAVALCANTI, 2000).

Apesar do reduzido número de pesquisas nesta área, a demanda por novas tecnologias de criopreservação de sêmen asinino vem aumentando

muito nos últimos anos. No entanto, ainda é grande a diversidade de informações sobre as técnicas de criopreservação: meios diluidores de sêmen, curvas de resfriamento e congelamento ideais, momento da inseminação (viabilidade do oócito da égua e jumento em relação ao espermatozóide asinino) e número de espermatozóides viáveis por dose inseminante.

O maior entrave no uso da inseminação artificial com sêmen congelado de eqüídeos é o elevado custo do manejo intensivo das éguas a serem inseminadas. Os resultados obtidos com o uso de protocolos de inseminação artificial em tempo fixo com sêmen congelado de garanhões são bastante satisfatórios (METCALF, 2005; MORRIS *et al.*, 2003). A maioria dos trabalhos encontrados na literatura que fizeram teste de fertilidade do sêmen congelado de jumento em éguas, utilizaram inseminações pós-ovulação (VIEIRA *et al.*, 1985; ARRUDA *et al.*, 1986 OLIVEIRA, 2005; CANISSO, 2008). VIDAMENT *et al.* (2008), utilizando inseminações pré-ovulação em éguas, obtiveram taxa de prenhes por ciclo de 36%.

Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a fertilidade do sêmen congelado de Jumento da Raça Pêga em éguas inseminadas antes e após a ovulação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os asininos (*Equus asinus*), assim como os cavalos (*Equus caballus*), são membros da Família *Equidae*, e pertencem à ordem *Perissodactyla* (HAFEZ, 2004). Existem duas subespécies de asininos, *Equus asinus africanus* (jumento africano) e *Equus asinus europeus* (jumento europeu). Características morfológicas como pelagem branca, presença de sinais como estrela e extremidades brancas, permitem hipotetizar que os animais da raça Pêga têm como tronco étnico o *Equus asinus africanus africanus* (jumento Nubiano ou Egípcio), do qual muito se aproxima (COSTA, 2007).

Existe um conceito entre criadores de asininos, que esta espécie possui fertilidade inferior quando comparada àquela da espécie eqüina (SILVA FILHO, *et al.*, 1986). As éguas também têm a reputação de ter uma fertilidade mais baixa que as outras espécies de animais domésticos (TEIXEIRA *et al.*, 1985). Outras espécies domésticas, como bovinos, suínos e ovinos, têm sido muito selecionadas para eficiência reprodutiva e outros aspectos produtivos (HAFEZ, 1995). Em eqüídeos, tanto eqüinos quanto asininos, falta seleção objetiva das raças, baseada na eficiência reprodutiva (TEIXEIRA *et al.*, 1985).

A utilização do sêmen congelado já é uma realidade em programas de inseminação artificial para a espécie bovina. Entretanto, em eqüinos, progressos têm sido alcançados ao longo dos últimos 20 anos, tendo ainda vários pontos de estrangulamento a serem resolvidos. Com o sêmen de

asininos, em especial, os da raça Pêga, o problema é mais acentuado. Trabalhos citados na literatura têm mostrado que, apesar do sêmen apresentar alta motilidade no pós-descongelamento, são baixas as taxas de fertilidade quando utilizado na égua, e principalmente, na jumenta (VIEIRA *et al.*, 1985; ARRUDA *et al.*, 1986; OLIVEIRA 2005; CANISSO, 2008, VIDAMENT *et al.*, 2008). Possíveis causas desta baixa fertilidade podem estar relacionadas à predisposição precoce da capacitação espermática causada pelo procedimento de congelamento e descongelamento do sêmen, levando à baixa viabilidade do espermatozóide nos órgãos genitais femininos e, talvez, ao efeito tóxico do glicerol ao espermatozóide do jumento (VIDAMENT, 2008).

2.1. Composição e modificações da membrana plasmática durante o processo de resfriamento

A membrana plasmática da célula espermática é formada por uma bicamada de lipídeos (fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol) com proteínas integrais e glicoproteínas de superfície de ligação, organizados em um modelo de mosaico fluido (SINGER e NICOLSON, 1972). Esta é metabolicamente ativa e, devido à sua composição, apresenta impermeabilidade à maioria das moléculas. Tem um importante papel de isolar a célula do meio exterior e media reações com o meio que a cerca, controlando o fluxo de água e eletrólitos (COOPER, 1996).

A bicamada lipídica é assimétrica, onde cada tipo de fosfolipídio tem preferência na sua orientação específica dentro da bicamada, além disto, o tipo e a quantidade de fosfolipídios de membrana variam de acordo com a espécie animal. De certa forma, tudo isso pode estar relacionado à maior ou menor estabilidade da membrana celular (HAMMERSTEDT e GRAHAM, 1992). Mudanças na organização do mosaico fluído da membrana plasmática podem levar a alterações na permeabilidade, funcionalidade e metabolismo da célula espermática, o que pode prejudicar a motilidade e a capacidade fecundante da mesma (AMANN e GRAHAM, 1993).

A assimetria da bicamada lipídica é importante para a função celular, pois garante a fluidez da membrana externa dos espermatozóides, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções. A fluidez da membrana é afetada principalmente pela composição relativa entre os fosfolipídios e o colesterol, e pela temperatura à qual a membrana é exposta. À temperatura ambiente, os lipídeos e as proteínas de membrana permanecem em estado de fluidez, no entanto, a contínua queda de temperatura promove alterações físicas da membrana, que passa do seu estado líquido ao de gel; as cadeias de ácidos graxos que estavam aleatoriamente distribuídas ordenam-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida e tornando essas áreas fracas e suscetíveis a rupturas e a fusões, como também permeáveis a íons (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990).

As principais alterações sofridas pela célula no processo de criopreservação ocorrem durante os processos de resfriamento e descongelamento. Assim, uma taxa de resfriamento e aquecimento adequada e a adição de diluentes são necessárias para prevenir danos causados à membrana, pelo choque térmico.

2.2. Princípios da criopreservação espermática

De acordo com SQUIRES *et al.*, (1999), para os espermatozóides manterem sua fertilidade, devem ultrapassar os obstáculos impostos, e ainda, preservar as seguintes características: morfologia aceitável, metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, membranas plasmáticas e acrossomal estabilizadas e enzimas para a fertilização.

Segundo ARRUDA (2000), para os espermatozóides sobreviverem à criopreservação, é necessário que estejam em um meio que lhes confira nutrientes e proteção físico-química, associado a uma curva ótima de congelamento.

A queda da temperatura promove alteração no padrão de fluidez da membrana plasmática, passando de um estado líquido-cristalino para o

estado gel, em que as cadeias de ácidos graxos são rígidas e paralelas, sendo esta fase chamada de transição. Nesta fase, os espermatozóides estão mais susceptíveis aos danos causados pelo resfriamento, podendo haver perda do movimento progressivo e alterações nas membranas plasmática e acrossomal, sendo o primeiro desafio imposto a essas células.

O efeito do choque térmico pode ser prevenido ou atenuado pelo controle da taxa de resfriamento, adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteínas (leite) ao diluente (GRAHAM, 1996) e pelo uso de curvas de resfriamento lentas (-0,5 °C/min) (FÜRST, 2006).

Durante o fenômeno de choque térmico, que ocorre quando o resfriamento é feito de maneira inadequada, espermatozóides sofrem danos irreversíveis, caracterizados por alterações nos padrões normais de motilidade, perda rápida de motilidade e danos no metabolismo e nas membranas plasmática e acrossomais (GRAHAM, 1996; SQUIRES *et al.*, 1999).

FÜRST *et al.* (2005) compararam sêmen eqüino resfriado antes do congelamento, com taxa de resfriamento de -0,3°C por minuto entre as temperaturas de 22 a 9°C, usando sêmen congelado sem resfriamento prévio. Verificaram melhor proteção da membrana plasmática, melhor motilidade e vigor dos espermatozóides eqüinos após descongelamento, para o sêmen que foi submetido a uma curva lenta de resfriamento antes do congelamento.

Durante a congelação, a suspensão de espermatozóides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super-resfriamento), antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar, há o aumento na temperatura, necessário para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para o espermatozóide. O uso de curvas adequadas de congelamento diminui os efeitos deletérios (SQUIRES *et al.*, 1999).

Na temperatura de - 5 °C a água intra e extracelular permanece super-resfriada. Quando a temperatura do meio atinge entre -5°C e -10°C,

inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular, porém, protegido pela membrana plasmática, o meio intracelular não se congela e permanece super-resfriado. Assim, ocorre mudança no gradiente osmótico entre os meios intra e extracelular, o que leva a saída de água para o meio extracelular, ocasionando a desidratação celular. Neste ponto deve haver equilíbrio na curva de congelamento, pois, deve ser lenta para evitar a congelação da água intracelular, e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico.

A perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, pois reduzem a formação de grandes cristais de gelo dentro da célula, o que causa danos às estruturas internas e/ou à membrana plasmática (SQUIRES *et al.*, 1999). No entanto, a desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e retração excessiva da célula, até ocorrer um colapso da membrana (MEDEIROS *et al.*, 2002).

A descongelação depende da taxa de congelamento do sêmen pois poderá causar danos que deixarão o espermatozóide com sobrevivência e/ou funcionamento comprometidos. SQUIRES *et al.* (1999), indicam que a taxa de congelação deve ser a mesma à taxa de descongelação.

2.3. Injúrias espermáticas devido ao processo de criopreservação

De acordo com WATSON (2000), as lesões ocasionadas devido ao processo de criopreservação são atribuídas ao efeito da mudança de temperatura; ao estresse osmótico; à toxidez dos crioprotetores e à formação e a dissolução de cristais de gelo no meio extracelular.

A taxa de sobrevivência espermática ao resfriamento, congelamento e aquecimento depende das taxas de resfriamento e aquecimento utilizadas; do tempo de duração de cada etapa; do transporte de substâncias e da formação de cristais de gelo. Contudo, a resposta celular mais importante ao congelamento é dada pela perda de água e pela formação de cristais de gelo intracelular (FÜRST, 2006).

Se a célula for criopreservada em uma taxa de congelamento muito lenta, ocorre formação de gelo extracelular, com isso, há formação de um gradiente osmótico, levando a saída de água do espermatozóide. Assim, a injúria celular é causada pela desidratação celular excessiva em decorrência do meio extracelular muito concentrado, desencadeando um desarranjo morfofuncional da célula. Esse fenômeno é conhecido como efeito solução.

Quando a taxa de congelamento é muito rápida, a formação de cristais de gelo intracelular também é rápida, não permitindo uma desidratação celular adequada e, conseqüentemente, formação de macrocristais no interior da célula, lesando o seu interior.

Altas concentrações de crioprotetores são deletérias aos espermatozóides, devido à sua toxicidade, e podem resultar na redução da fertilidade após a inseminação artificial. Parte da toxicidade é devido à injúria bioquímica, resultado da adição direta do crioprotetor sobre componentes subcelulares (ARRUDA, 2000). Dentre os efeitos deletérios causados, podem ser citados: aumento da permeabilidade da membrana plasmática; indução de sua fusão; inibição da atividade enzimática (FAHY, 1986), resultando na desnaturação de proteínas e em alterações das interações de actina (FAHY, 1990).

2.4. Crioprotetores mais utilizados para sêmen de eqüídeos

Os crioprotetores são substâncias capazes de promover a sobrevivência celular durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. O mecanismo de ação dos crioprotetores ainda não está bem compreendido. WATSON (1981) sugere que estas substâncias atuam via propriedade coligativa da água, reduzindo o ponto de congelação de uma solução. Estes compostos diminuem a formação de cristais de gelo atuando com solvente e reduzem a concentração de solutos no meio externo. MASSIP (1986) relatou que essas substâncias interagem com a membrana celular, proporcionando estabilização e evitando a sua lesão.

Entretanto, os crioprotetores não garantem a sobrevivência de 100% das células, por também possuírem seus efeitos tóxicos, dependendo da concentração utilizada do crioprotetor no meio diluidor (FAHY, 1986).

Os crioprotetores podem ser classificados, de acordo com sua permeabilidade à membrana celular, em: penetrantes (pequenas moléculas) que atravessam a membrana do espermatozóide e atuam no meio intra e extracelular e incluem glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido-(DMSO), 1,2 propanodiol e as amidas (acetamida, formamida, entre outras); e não penetrantes (macromoléculas), como as proteínas presentes no leite e na gema de ovo, sacarose, glicose, lactose, manose, rafinose, trehalose e alguns polímeros sintéticos (McKINNON, 1996).

2.4.1. Crioprotetores penetrantes

Essa classe de crioprotetores pode ser subdividida basicamente em dois grupos: álcoois (glicerol, etilenoglicol entre outros) e amidas. Segundo MEDEIROS *et al.* (2002), um bom agente crioprotetor deve apresentar as seguintes características: baixo peso molecular, elevada solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade à célula espermática.

Dentre os crioprotetores, o glicerol é o mais utilizado no congelamento de sêmen de eqüídeos (MARTIN *et al.*, 1979; GRAHAM, 1996; VIDAMENT *et al.*, 1997; PAPA *et al.*, 1999). Apresenta funções atenuadoras das crioinjúrias celulares, exercendo efeitos extracelulares, por estímulo da desidratação celular, diminuindo, assim, o volume intracelular de água disponível para o congelamento. O glicerol também exerce efeitos intracelulares, pela sua habilidade de atravessar a membrana plasmática, diminuindo o estresse osmótico intracelular da desidratação. Isso ocorre via reposição de água intracelular necessária para manutenção do volume celular, interação com íons e macromoléculas e diminuindo o ponto de congelamento da água (MEDEIROS *et al.*, 2002).

Estudos reportam que o glicerol também apresenta efeitos tóxicos quando usado na criopreservação de sêmen eqüino. Sua toxidez parece causar desnaturação protéica, alteração na interação e indução da proteína

livre da membrana, mudanças de eventos citoplasmáticos por causa do aumento da viscosidade intracelular e alteração direta da membrana plasmática (DEMICK *et al.*, 1976; HAMMERSTEDT e GRAHAM, 1992; ALVARENGA *et al.*, 2000).

A concentração de glicerol ideal vai variar em função da espécie, da curva de congelamento, de outros componentes do diluidor e do método de envase (FÜRST, 2006). De acordo com a maioria dos estudos, a concentração de glicerol nos diluidores de congelamento pode variar de 3,5 a 5% (VIDAMENT *et al.*, 1997).

Alguns autores têm obtido boas taxas de prenhes em éguas com sêmen criopreservado com glicerol, como MARTIN *et al.* (1979) que obtiveram 63%; LOOMIS *et al.* (1983) 51,3%; PAPA *et al.* (1999) 66%; DELL'AQUA (2000) 50% e CANISSO (2008) 53 %.

O etilenoglicol tem sido testado e comparado com o glicerol no congelamento de sêmen. ALVARENGA *et al.* (2000), trabalhando com sêmen de garanhões, verificaram que a motilidade progressiva foi de 34,0%, 36,5%, 29,3% e 34,7%, para os níveis de 5% de glicerol, 5% e 10% de etilenoglicol e etilenoglicol (2%) associado a glicerol (3%), respectivamente. Segundo ARRUDA (2000), o etilenoglicol e o glicerol apresentam propriedades crioprotetoras semelhantes. NEVES NETO *et al.* (1995), não encontraram diferenças nas taxas de prenhes em éguas inseminadas com diluidor a base de Lactose-EDTA-Gema com etilenoglicol ou glicerol.

As amidas são formadas por dois grupos funcionais: um grupo amina (com nitrogênio) e um grupo ácido carboxílico (com oxigênio). Possuem três pontos para ligação ao hidrogênio da água, metade dos sítios de ligação quando comparada ao glicerol. No entanto, as amidas possuem menor viscosidade que o glicerol, sendo mais solúveis em água e mais permeáveis à membrana plasmática do espermatozóide, reduzindo os efeitos deletérios do estresse osmótico causado pelo crioprotetor (BALL e VO, 2001). VIDAMENT *et al.* (2002) obtiveram taxa de fertilidade em éguas de 46%, 58% e 50% usando como crioprotetor o glicerol a 2 e 3% e a dimetilformamida a 2%, respectivamente.

O dimetilsulfóxido (DMSO) pode realizar ligações de hidrogênio via seu radical sulfóxido, reduzindo o ponto de congelação da solução (MURTHY, 1998). Confere maior proteção à membrana plasmática a temperaturas baixas, por possuir a característica de ligação com os grupos fosfatos da membrana (KUNDU *et al.*, 2000).

2.4.2. Crioprotetores não-penetrantes

Nesta categoria de crioprotetores pode-se incluir algumas macromoléculas que atuam na proteção do espermatozóide no processo de criopreservação sem penetrar na célula. São estes: açúcares (sacarose, glicose, lactose, manose, rafinose, trehalose), gema de ovo, leite, polímeros sintéticos (metilcelulose e polivinilpirrolidona) e albumina sérica bovina (KEITH, 1998).

Os açúcares atuam protegendo as células pelos efeitos osmóticos, fazendo com que estas percam água, diminuindo a possibilidade de formação de cristais de gelo dentro da célula. Também são substratos energéticos para o espermatozóide, conferem proteção à membrana plasmática durante a congelação e descongelação, e podem prevenir os danos pela desidratação extrema (YILDIZ *et al.*, 2000).

A gema de ovo é comumente encontrada em meios diluidores de sêmen, prevenindo contra o choque térmico no processo de criopreservação. Esta proteção é devido, principalmente, à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que aderem à membrana plasmática durante o processo de criopreservação, garantindo resistência ao choque térmico e melhoria na motilidade pós-congelamento (MOUSSA *et al.*, 2002).

Outro elemento empregado nos meios diluidores para sêmen de eqüídeos é o etilenodiaminotetracético (EDTA). Sua principal função é se ligar ao cálcio e ao magnésio, reduzindo seu influxo para o meio intracelular, visto que seu excesso provoca lesões celulares, durante o processo de resfriamento (ARRUDA, 2000).

O Orvus-es-paste, outra substância adicionada ao diluente de criopreservação por MARTIN *et al.*, (1979), é um agente emulsificante de gordura que aumenta a disponibilidade e a capacidade protetora dos fosfolípidos. O sêmen congelado, utilizando essa substância, apresentou motilidade pós-descongelamento superior ao do diluente sem a presença do emulsificador (53,4% x 42,3%).

O leite em pó vem sendo rotineiramente usado na composição de diluidores para diluição, centrifugação e armazenamento do sêmen eqüino resfriado. A eficiência do leite na proteção das células espermáticas na criopreservação se assemelha à da gema de ovo, principalmente pela sua composição de proteínas, atuando como tampão e quelante de metais pesados, minimizando o efeito do choque térmico pelo frio (SALAMON e MAXWELL, 2000).

2.5. Principais meios diluentes utilizados para sêmen de asininos

Os meios diluidores para congelação de sêmen são utilizados para garantir a sobrevivência dos espermatozóides e apresentam, em sua constituição básica, substâncias que permitem a preservação da membrana plasmática, mediante a estabilização do pH do meio; a neutralização de produtos tóxicos produzidos pelos espermatozóides; a proteção contra o choque térmico; a manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico; a inibição do crescimento bacteriano e fornecimento de energia para as células (LINDE-FOSBERG, 1991; ENGLAND, 1993).

Os meios mais utilizados no congelamento de sêmen de jumento são o diluidor de Merck-gema utilizado por MARTIN *et al.* (1979) no congelamento de sêmen de garanhões, INRA-82 modificado por TRIMECHE *et al.* (1996), MP50 modificado por OLIVEIRA (2005). Estes diluidores apresentam, em sua composição, fosfolípidos derivados do leite ou da gema de ovo, glicerol e dimetil formamida como crioprotetores, tampão e antibióticos, apresentando ou não um agente emulsificador de gorduras (Orvus-es-paste).

2.6. Curva de resfriamento

O processo de criopreservação inicia-se quando o sêmen é resfriado da temperatura corporal à temperatura ambiente (37 a 20° C), o que parece não ocasionar maiores danos aos espermatozóides, quando este se encontra diluído em meio adequado (KEITH, 1998). A curva de resfriamento vai até 5°C, sendo que a fase mais crítica acontece entre as temperaturas de 19 a 8°C.

A taxa da queda de temperatura que o espermatozóide sofre durante o processo de resfriamento é um dos principais entraves ao sucesso no congelamento de sêmen de eqüídeos. Uma curva de resfriamento rápido é responsável pela maioria das lesões celulares, em decorrência de alteração da propriedade física das membranas espermáticas (WATSON, 1981). O choque térmico, responsável por mudanças irreversíveis na membrana plasmática do espermatozóide, é mais pronunciado quando o resfriamento ocorre de maneira rápida, sendo a severidade do efeito dependente da curva de resfriamento entre as faixas de 15 a 0 °C (QUINN *et al.*, 1980), 19 a 8 °C (MORAN, 1992; WATSON, 1995; GRAHAM, 1996; FÜRST, 2000).

DOUGLAS-HAMILTON *et al.* (1987), concluíram que as taxas rápida (maiores que 1 °C/min) e lenta (menores que 0,33 °C/min) causam maiores danos (maior número de patologias, menor motilidade e maior número de células mortas após o resfriamento) à célula espermática, que a taxa média (entre 1 e 0,33 °C/min).

VIDAMENT *et al.* (2000), ao utilizarem o diluidor INRA82, verificaram melhor motilidade espermática para o congelamento após o resfriamento a 4 °C, em 1 hora antes do envase/congelamento, quando comparado ao sêmen congelado diretamente a partir de 23 °C. FÜRST (2000), comparando taxas de resfriamento de -0,8 °C/min entre 24 e 19 °C e -0,4°C/min entre 19 e 8 °C, evidenciou que a segunda taxa de resfriamento reduziu as perdas da motilidade espermática durante o congelamento de sêmen eqüino.

FÜRST *et al.* (2005) constataram que a taxa de motilidade total, teste supravital e hiposmótico do sêmen congelado com resfriamento prévio, foi

superior ($p < 0,05$) à do protocolo sem resfriamento, tanto no descongelamento a 75 °C/7" quanto a 37 °C/30". O mesmo autor inseminou éguas com deposição do sêmen no ápice do corno uterino, utilizando concentrações de 150 e 300 milhões de espermatozóides viáveis, com média de 55% de taxas de fertilidade.

Na literatura consultada, estudos apontam a curva de resfriamento média (entre 1 e 0,33 °C/min) antes do congelamento como sendo a melhor alternativa para sêmen de asininos (OLIVEIRA, 2005; CANISSO, 2008).

2.7. Curva de congelamento

A curva de congelamento é de extrema importância na manutenção da integridade celular. Se a taxa de congelamento não for adequada, ocorre perda da viabilidade das células, possivelmente em função da diminuição do conteúdo de água intracelular, ocasionando aumento das concentrações de solutos intracelulares e precipitação, com alteração de pH e osmolaridade do meio (WATSON, 1995). Quando a taxa é adequada, a célula se torna progressivamente desidratada e permanece funcional após o descongelamento.

Os danos sofridos pelo espermatozóide durante o congelamento e o descongelamento ocorrem na faixa de temperatura entre -15 e -60 °C (PARKS e GRAHAM, 1992). Entretanto, o tipo de comprometimento celular dependerá da taxa de congelamento. Dessa forma, a desidratação celular será observada quando a taxa de resfriamento oscilar entre 25 a 40 °C/min, enquanto o congelamento lento causa danos à célula, devido a altas concentrações de soluto intracelular durante o processo. Por outro lado, o congelamento rápido (60 °C/min) pode provocar a recristalização após o descongelamento, com formação de grandes cristais de gelo, o que causa danos físicos à célula (GRAHAM, 1996).

Na criopreservação de sêmen asinino, a curva de congelamento mais utilizada é a de 60 °C/minuto (curva rápida), obtida quando as palhetas são

colocadas em posição horizontal, 3 a 6 cm acima do vapor de nitrogênio, durante 20 minutos.

2.8. Curva de descongelamento

A curva de descongelamento é dependente do tipo de envasamento e do tempo de exposição a uma determinada temperatura (PICKETT e AMANN, 1993). Quando o congelamento é realizado com curva lenta, a desidratação celular é maior devido ao maior tempo de exposição dessas células ao meio extracelular muito concentrado, desencadeando um desarranjo morfofuncional na célula. Sendo assim, o descongelamento também deve ser lento, permitindo que ocorra a re-hidratação espermática. No congelamento rápido não há tempo suficiente para que ocorra adequada desidratação, resultando na formação de cristais de gelo no meio intracelular (macrocristais). Para o descongelamento, necessita-se de uma velocidade de descongelamento também rápida, para que não ocorra a recristalização (fusão de cristais de gelo) e, conseqüentemente, lesão celular. (MAZUR, 1985).

VIDAMENT *et al.* (2001), ao estudarem a motilidade espermática do sêmen eqüino descongelado a diversas temperaturas e tempos de descongelamento (37 °C/30", 50 °C/10", 50 °C/20", 60 °C/10", 75 °C/5", 75 °C/10", 75 °C/15"), não observaram diferenças entre os tratamentos, exceto para o descongelamento a 75 °C/15", cuja motilidade foi zero. Na avaliação da longevidade do sêmen descongelado, FÜRST *et al.* (2005) observaram que, independentemente do protocolo de descongelamento 75 °C/7" e 37 °C/30", não houve diferença ($P > 0,05$) na motilidade espermática.

O descongelamento rápido (75 °C por 7") de sêmen eqüino é mais benéfico ao espermatozóide do que o lento (37 °C por 30") (COCHRAN *et al.*, 1984; SQUIRES *et al.*, 1987), embora possa causar danos irreparáveis ao espermatozóide, quando ultrapassar a temperatura e o tempo de descongelamento (PAPA *et al.*, 1998).

2.9. Avaliação do sêmen para congelamento

A motilidade e o vigor do sêmen são os principais parâmetros seminais avaliados rotineiramente. Porém, a estimativa visual da percentagem de espermatozóides móveis e sua intensidade de deslocamento é uma avaliação subjetiva. No Brasil, os critérios de avaliação de sêmen eqüino para congelamento seguem os padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Sendo assim, uma partida de sêmen fresco, para ser aprovada para congelamento, deve apresentar motilidade mínima de 70% e vigor de aproximadamente 3 (0-5).

2.9.1. Avaliação do sêmen descongelado

Os parâmetros mínimos estabelecidos para o uso de sêmen descongelado na IA têm sido preconizados como sendo 35% de motilidade total, imediatamente após o descongelamento (WBFSH, 2009). Uma avaliação do padrão adotado para motilidade espermática pós-descongelamento em 19 centros especializados em congelamento de sêmen eqüino mostrou variações de 30 a 40% (dez centros); 35% (oito centros) e 40% (um centro) (SAMPER e MORRIS, 1998). No Brasil, o CBRA (1998) preconiza, como parâmetros mínimos para aprovação da partida de sêmen congelado, valores superiores a 30% para a motilidade total, vigor maior que 3 e no máximo de 40% de espermatozóides com defeitos totais.

2.9.2. Avaliação da integridade da membrana plasmática

Atualmente, muitas técnicas alternativas têm sido usadas para prever a capacidade fertilizante do espermatozóide e, assim, traçar correlações com o teste de fertilidade. Estes testes visam avaliar algumas características fundamentais da célula espermática, tais como: atividade metabólica para produção de energia; enzimas localizadas no acrossoma; e proteínas presentes na membrana plasmática (AMANN e PICKETT, 1987).

Dentre os testes que visam prever com maior acurácia a capacidade fertilizante do gameta masculino, podem ser citadas as técnicas que utilizam sondas fluorescentes, corantes específicos, microscopia eletrônica ou avaliação do comportamento do sêmen diante das soluções hiposmóticas, dentre outros.

2.9.2.1. Teste de sondas fluorescentes

O diaceto de carboxifluoresceína e o iodeto de propídio são empregados para avaliação da integridade da membrana espermática. Esta técnica está baseada no princípio de que o diaceto de carboxifluoresceína sofre hidrólise dentro da célula por esterases inespecíficas, transformando-se em carboxifluoresceína livre, que fica retida no interior da célula com membrana plasmática íntegra, deixando a célula com coloração verde. Já o iodeto de propídio possui afinidade pelo DNA e a membrana íntegra é permeável a essa substância. Assim, sua penetração na célula torna-se possível somente quando a membrana celular está lesada e, quando isso ocorre, essa sonda se liga ao DNA celular e o tingirá de vermelho. Deste modo, o espermatozóide com membrana plasmática íntegra será corado integralmente de verde e o espermatozóide lesado vai se corar de vermelho (ZÚCCARI, 1998).

2.9.3. Teste de Termorresistência (TTR)

Os parâmetros avaliados no TTR são motilidade e vigor, com as avaliações começando no tempo zero. As demais avaliações do TTR são realizadas em períodos que variam de 90 a 240 minutos (CBRA, 1998; ZÚCCARI, 1998). Os resultados do TTR são influenciados por vários fatores, como: o efeito do ejaculado, método de congelamento e efeitos do tempo de incubação, sendo esta última a variável mais importante para o sêmen eqüino (FÜRST, 2006).

2.10. Indução da ovulação em éguas

Agentes indutores da ovulação têm sido largamente usados em programas de inseminação artificial em eqüídeos, seja com sêmen fresco, resfriado ou congelado. Porém, para maximizar a eficiência desses agentes na indução da ovulação é preciso ter uma compreensão clara da fisiologia e da dinâmica de crescimento folicular durante o ciclo estral da égua. A duração do estro em éguas pode ser extremamente variável, mas a duração média é de 5 a 7 dias. O estro nas éguas é caracterizado pela receptividade ao garanhão, presença de um folículo dominante, relaxamento da cérvix e edema uterino. Esses agentes são mais efetivos quando da presença de um folículo dominante com diâmetro de aproximadamente 30-35 mm (DEALS e HUGHES, 1993; MILLER 2008; SAMPER 2008).

De acordo com SAMPER (2008), as principais vantagens de ter uma ovulação em tempo previsível incluem: apenas uma inseminação/cobertura por ciclo no caso de garanhões muito utilizados na estação de monta; inseminações/coberturas programadas; redução na contaminação uterina; inseminações mais próximas à ovulação no caso do uso de sêmen resfriado, congelado ou de garanhões com baixa fertilidade; sincronização de éguas doadoras e receptoras em programas de transferência de embrião; e redução no trabalho e nos custos com veterinários. Existem alguns produtos disponíveis no mercado que são comumente usados na indução da ovulação em éguas, como: gonadotropina coriônica humana (hCG), análogos do GnRH (deslorelina) e LH recombinante eqüino (rLH) (Tabela 1).

Tabela 1 – Agentes indutores da ovulação comumente usados em éguas.

Produto	Dose e via de administração	Intervalo tratamento-ovulação (horas)	Condições
hCG	1500-3300 UI (IM ou IV)	36 (12-48)	Folículo ≥ 30-35 mm e edema uterino
rLH	800 µg (IV)	36 (12-48)	Folículo ≥ 30-35 mm e edema uterino
Deslorelina (Ovuplant™)	2,2 mg (implante SC)	38 (36-42)	Folículo ≥ 30-35 mm e edema uterino
Deslorelina Injetável	1,5 mg (IM)	40-46	Folículo ≥ 30-35 mm

Fonte: Adaptado de SAMPER (2008).

2.10.1. hCG

A hCG, um hormônio peptídeo placentário, estimula a função luteal e a manutenção da gravidez em mulheres (McDONALD, 1988) e possui propriedades similares às do LH. A dose de hCG recomendada para indução da ovulação varia entre 1500 a 4000 UI administrados por via intramuscular ou intravenosa (VOSS, 1993; MILLER, 2008; SAMPER, 2008; INTERVET, 2009). As ovulações podem ocorrer entre 12 a 48 horas após a administração da gonadotropina, porém, 75% se concentram na faixa de 24 a 48 horas após aplicação (BARBACINI *et al.*, 2000). MOREL e NEWCOMBE (2008) conseguiram que 92,4% das éguas com um único folículo dominante, e 77,2% com múltiplos folículos, ovulassem após 48 horas da aplicação da gonadotrofina. SIEME *et al.* (2003), relataram que 391/401 éguas (97,5%), ovularam dentro de um período de 48 horas após injeção intravenosa de 1500 UI de hCG. Essa variação vai depender do tamanho (maturação) do folículo no momento da ovulação.

2.11. Dose inseminante, local de deposição, momento de inseminação e fertilidade do sêmen congelado de eqüídeos

Para obtenção de boas taxas de fertilidade do sêmen congelado, semelhantes à monta natural, além do aperfeiçoamento e da padronização de técnica de criopreservação, outros fatores podem ser destacados, como: a dose inseminante, o local de deposição do sêmen e o momento da inseminação.

2.11.1. Dose inseminante

Segundo MILLER (2008), não existe uma dose inseminante padrão para sêmen congelado de eqüídeos. A motilidade progressiva varia significativamente entre garanhões e, frequentemente, entre ejaculados. Cada laboratório apresenta seu método de congelamento, de modo que o número de espermatozóides por palheta, bem como o número de palhetas

por dose inseminante, variam muito, não só pelo garanhão, mas também pela partida de sêmen congelado. Numa tentativa de aumentar a uniformidade entre os laboratórios, a *World Breeding Federation for Sport Horses*, estabeleceu um padrão mínimo para uso de sêmen congelado, onde a dose inseminante deve ter, no mínimo, 250×10^6 espermatozóides viáveis por dose, com motilidade progressiva mínima de 35% no pós-descongelamento (WBFSH, 2009). Existe um grande interesse, tanto por parte dos pesquisadores, como dos criadores, na redução do número de espermatozóides por dose inseminante. A maioria dos fatores que influenciam esta demanda é de natureza comercial e incluem: aumentar o número de éguas inseminadas por ejaculado; otimizar a utilização de sêmen congelado de garanhões falecidos; reduzir a ocorrência de endometrites; utilizar garanhões com sêmen de baixa qualidade, e usar sêmen sexado (MILLER, 2008).

Trabalhando com eqüinos, LEIPOLD *et al.* (1998), estudaram a influência no aumento na concentração espermática por dose inseminante de 320 milhões para 800 milhões de espermatozóides, com motilidade progressiva pós-descongelamento, constatando que poderiam aumentar as taxas de concepção. SQUIRES *et al.* (1999) preconizam a utilização de quatro palhetas francesas de 0,5 mL de sêmen com motilidade progressiva de 40% no descongelamento e na concentração final de 320 milhões de espermatozóides móveis por dose inseminante pós-descongelamento. FÜRST (2006) comparou concentrações de 150 e 300 milhões de espermatozóides viáveis e verificou taxas de gestação no primeiro ciclo de 51,6% (31 ciclos) e 54,7% (64 ciclos), respectivamente.

VIEIRA *et al.* (1985) inseminaram 20 éguas com sêmen congelado de jumento, utilizando uma dose de 250 milhões de espermatozóides, e encontraram 33% de fertilidade. ARRUDA *et al.* (1986), usando a mesma concentração espermática, inseminaram 16 éguas e obtiveram 44% de gestação. TRIMECHE *et al.* (1998), utilizaram sêmen congelado de jumento com 600×10^6 em jumentas Poitou, e alcançaram taxa de gestação da ordem de 38%. PAPA *et al.* (1999), trabalhando com sêmen de jumentos na dose de 800×10^6 , obtiveram 66% de éguas gestantes. OLIVEIRA (2005)

encontrou 40% de gestação em 10 éguas, utilizando dose inseminante de 800 milhões de espermatozóides e zero por cento de gestação em 53 jumentas inseminadas com o mesmo número de espermatozóides. Este autor não verificou benefício quando depositou o sêmen no corno ipsilateral a ovulação. CANISSO (2008) usando doses de 300×10^6 de espermatozóides viáveis, obteve fertilidade de 50% e 53,3% com os diluidores de MARTIN *et al.* (1979) e de NAGASE E NIWA (1964) modificado, respectivamente.

2.11.2. Local de deposição do sêmen

O local de deposição do sêmen é umas das principais ferramentas para melhorias na fertilidade em programas de inseminação artificial com sêmen congelado de eqüídeos. A deposição de sêmen no corpo do útero é o método convencional. Porém, nos últimos anos, a inseminação artificial com deposição do sêmen no ápice do corno uterino ipsilateral ao folículo pré-ovulatório ou à ovulação, próximo à junção útero-tubárica, por meio de pipeta flexível guiada via cérvix e do corno uterino (FLEURY e CASSOLI, 1999), tem sido mais utilizada. Além disso, pode haver a redução da dose inseminante e também utilização de garanhões subférteis (MILLER, 2008). Esse método de inseminação tem a vantagem de ser relativamente barato, utiliza material descartável, muito eficaz e rápido, quando feito por um médico veterinário experiente.

Outros métodos, como a inseminação histeroscópica vem sendo utilizados na tentativa de maximizar o uso de garanhões subférteis ou com baixa congelabilidade (MORRIS *et al.* 2000) ou, ainda, no caso de garanhões mortos em que se deseja coletar o sêmen da cauda do epidídimo. Outra vantagem do uso desta técnica é o reduzido número de espermatozóides por dose inseminante (5×10^6). Porém, é uma técnica muito laboriosa, que necessita de equipamentos e pessoal especializado para a sua execução.

2.11.3. Momento da inseminação

O fator mais limitante do uso generalizado do sêmen congelado em programas de inseminação artificial é o custo associado ao manejo intensivo das éguas a serem inseminadas. Geralmente, o recomendado é que a inseminação com sêmen congelado seja realizada dentro de 12 horas antes, ou até 6 horas após a ovulação (LOOMIS, 2001; LOOMIS e SQUIRES, 2005).

O processo de congelamento/descongelamento causa danos aos espermatozoides, apresentando menor longevidade, talvez devido a alterações na capacitação espermática (WATSON, 2000); portanto, a inseminação artificial próxima ao momento da ovulação pode levar a acréscimos na fertilidade do sêmen congelado.

A inseminação pós-ovulação é o método convencional de escolha no uso de sêmen congelado eqüino. Este é o principal método usado atualmente quando a quantidade de sêmen congelado é limitada ou de alto custo, como sêmen congelado de garanhões falecidos ou importados de outros países (MILLER 2008). Porém, esse método exige o uso de controle folicular a cada 6 horas até a detecção da ovulação e posterior inseminação. Com isso, eleva-se o tempo gasto no controle folicular e os custos por égua prenha. Como alternativa a esse impasse, pode-se utilizar inseminações pré-ovulação, com indução da ovulação com uso de agentes indutores e controle folicular a cada 12 horas. Este método de inseminação é uma alternativa viável quando múltiplas doses de sêmen são disponíveis e/ou há limitações ao número de vezes em que uma égua pode ser examinada.

Muitos laboratórios de pesquisas analisaram taxas de prenhes em éguas inseminadas pós-ovulação, pré-ovulação, ou em ambos os momentos da ovulação. Dezenove, de vinte e um laboratórios, sugeriram inseminações com 6 horas antes ou após a ovulação (SAMPER e MORRIS, 1998). Porém, a maioria desses trabalhos foi feita utilizando sêmen de garanhões.

Os resultados de fertilidade com inseminações pós-ovulação com sêmen congelado de jumento variam de 33% a 53% (VIEIRA *et al.*, 1985; ARRUDA *et al.*, 1986; OLIVEIRA, 2005; CANISSO, 2008). Em quase todos

os trabalhos encontrados, as inseminações ocorreram pós-ovulação com deposição do sêmen no corpo do útero. TRIMECHE *et al.* (1998), inseminando jumentas uma vez por dia, a partir da detecção de um folículo de 30 mm até a ovulação, obtiveram taxas de prenhes por volta de 38%. OLIVEIRA (2005), inseminando jumentas antes e após a ovulação, não conseguiu nenhuma gestação. Esse mesmo autor inseminando éguas pós-ovulação com deposição do sêmen no corpo uterino obteve 40% de gestações (4/10). VIDAMENT *et al.* (2008), inseminando jumentas e éguas, 24 e 48 horas antes da ovulação, com dose inseminante de 400 milhões de espermatozóides totais no corpo do útero, obtiveram taxas de prenhes por ciclo de 11% e 36%, respectivamente, para jumentas e éguas.

Em garanhões, os índices de fertilidade encontrados com inseminações, 6 a 8 horas pós-ovulação, variam de 39% a 71% (LOOMIS e SQUIRES, 2005; FÜRST, 2006; FAYRER-HOSKEN *et al.*, 2008; NIELSEN *et al.*, 2008).

BARBACINI *et al.* (2005) avaliaram diferentes protocolos de inseminação com sêmen equino congelado; não acharam diferença na taxa de prenhes entre éguas inseminadas, 24 e 40 horas após a aplicação de hCG (46%), e éguas inseminadas apenas uma vez após a ovulação (47%), usando dose de 800 milhões de espermatozóides totais. MORRIS *et al.* (2003), utilizando apenas uma inseminação, 32 horas após tratamento com hCG, no corpo do útero, obtiveram taxa de fertilidade de 67%.

METCALF (2005), acompanhando 312 ciclos, conseguiu taxas de prenhes com inseminações pós-ovulação de 47% (16/34). Quando as éguas foram inseminadas com apenas uma dose inseminante antes da ovulação, as taxas de prenhes foram de 72% (32/44). Nos demais 234 ciclos, as inseminações foram realizadas antes e após a ovulação e a taxa de prenhes alcançada foi de 70% (164/234).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local e período experimental

O experimento foi realizado em dois locais distintos. No Haras Tarumã, situado no município de Guaraciaba-MG, localizado a 20° 34' 15" de latitude S 43° 00' 27" W Gr de longitude e altitude média 578 metros, foram feitas as coletas, avaliações e congelamentos do sêmen, além do teste de fertilidade em éguas da raça Campolina. No Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa-MG, região da Zona da Mata, situado a 20°45'20" de latitude S, 42°52'40" W Gr de longitude e altitude média de 752 m, foi feito o teste de fertilidade em éguas mestiças Bretãs. Os congelamentos do sêmen foram realizados nos meses de novembro e dezembro de 2007 e o teste de fertilidade no período de dezembro de 2007 a março de 2008.

3.2. Manejo dos animais

Um jumento da raça Pêga de 5 anos de idade, fértil, conforme exame andrológico e histórico reprodutivo por monta natural, sêmen fresco e congelado, foi utilizado como doador de sêmen. O reprodutor foi mantido em

baia individual recebendo volumoso à base de capim Elefante (*Pennisetum purpureum*) picado (25 quilos) e dois quilos de concentrado comercial (12% de proteína bruta e 2800 kcal/kg de energia digestível). Sal mineral e água de boa qualidade foram fornecidos *ad libidum*. O jumento foi solto em piquete, diariamente, por um período de duas horas.

Foram utilizadas 42 éguas (48 ciclos), 21 éguas mestiças Bretãs (27 ciclos), pertencentes ao setor de Eqüideocultura da UFV e 21 éguas da raça Campolina (21 ciclos), pertencentes ao Haras Tarumã. Em ambos os criatórios as éguas pertenciam a diferentes categorias reprodutivas (éguas solteiras e potras), a idade variando de 4 a 20 anos e apresentaram bom escore de condição corporal.

No Setor de Eqüideocultura, as éguas foram manejadas sob condições de pastagens nativas e semi cultivada de *Melinis multifloras* (cv Gordura), com quantidade e qualidade variáveis. No Haras Tarumã, as éguas foram alimentadas sob condições de pastagens cultivadas de *Cynodon dactylon* (cv Tifton 85), com qualidade e disponibilidade variáveis. Tanto no Setor de Eqüideocultura quanto no Haras Tarumã os animais tinha acesso a água de boa qualidade e sal mineral *ad libidum*.

3.3. Coleta e avaliação do sêmen

Antes do início do experimento, coletas diárias de sêmen por seis dias foram realizadas com o objetivo de estabilizar as reservas espermáticas extra gonadais. Para as coletas, foi utilizada, como manequim, uma égua em estro natural ou induzido. Foi utilizada vagina artificial modelo Hannover, devidamente preparada à temperatura interna em torno de 45°C, com copo coletor protegido da luz solar e variação de temperatura. Dentro do copo coletor havia um saco plástico para deposição do sêmen e uma membrana para filtragem do sêmen e remoção da fração gel. Para o congelamento, utilizou-se sêmen de treze ejaculados.

Para avaliação da motilidade progressiva (%) e do vigor (escala de 0 a 5), uma alíquota de 10 µL de sêmen foi depositada em lâmina de vidro,

previamente aquecida a 37°C e avaliada em microscópio óptico, com aumento de 200 vezes. As avaliações do sêmen foram feitas pelo sistema de “duplo-cego”, onde duas pessoas avaliaram a motilidade e o vigor espermático; a avaliação final foi a média das avaliações dos dois examinadores.

Para avaliação da morfologia espermática, uma alíquota de 50 µL de sêmen foi diluída em 5 mL de solução formol-salino (HANCOCK, 1957), previamente aquecido, e armazenada para posterior análise. Para análise das anormalidades espermáticas, uma alíquota de 10 µL desta solução foi depositada em lâmina de vidro pré-aquecida a 37°C e a avaliação foi feita em microscopia óptica de contraste de fase no aumento de 1.000 vezes, onde foram contadas 200 células para determinação do percentual de espermatozóides normais e anormais. As anormalidades espermáticas foram classificadas segundo BLOM (1973).

3.4. Centrifugação, diluição e envase

Os diluidores para centrifugação e de congelamento foram mantidos em banho-maria a 37°C. Para centrifugação, foi utilizado o meio de mínima contaminação (KENNEY *et al.*, 1975) (Tabela 2) e, para o congelamento, o diluidor lactose-EDTA-gema de ovo preconizado por MARTIN *et al.* (1979) (Tabela 3). Após as avaliações, o sêmen foi diluído em meio para centrifugação, na proporção de 1:1, e centrifugado a 650 x g, por 15 minutos.

Tabela 2 – Composição do meio diluidor para centrifugação:

Reagentes	Quantidade
Leite em pó desnatado (Molico Nestlé)	24g
Glicose monohidratada	49g
Penicilina G potássica	1.000.000 UI
Água bidestilada e deionizada (qsp)	1000mL

Fonte: KENNEY *et al.* (1975).

Tabela 3 – Composição do diluidor de congelamento:

Solução 1:

Reagentes	Quantidade
D (+) glicose monohidratada	6,000 g
Citrato de sódio	0,375 g
EDTA (etileno diaminotetraacetatodissódico)	0,370 g
Bicarbonato de sódio	0,125 g
Penicilina G (sódica ou potássica)	100,000 UI
Sulfato de estreptomicina	0,100 g
H ₂ O bidestilada deionizada (q.s.p.)	100 mL
mOsm/Kg	409

Fonte: MARTIN *et al.* (1979).

Reagentes	Quantidade
Solução de lactose a 11%	50,0 mL
Solução 1	25,0 mL
Gema de ovo	20,0 mL
Orvus-es-paste	0,8 mL
Glicerol	5,0 mL

Fonte: MARTIN *et al.* (1979).

Após a centrifugação e a retirada do plasma seminal, os *pellets* foram ressuspendidos com diluidor de congelamento que tinha sido retirado do banho-maria e mantido à temperatura ambiente. A concentração espermática foi determinada após a centrifugação, com o uso de câmara Neubauer, diluindo-se 50 µL de sêmen diluído em 5 mL de solução de formol-salino tamponada.

O volume do diluidor acrescentado foi o suficiente para obtenção de concentração total de 200 milhões de espermatozóide por mL. Após a diluição final, foi retirada alíquota de 10 µL para avaliação da motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen. O envase foi feito em palhetas de polietileno de 0,5 mL, previamente identificadas com o nome do jumento, diluidor utilizado e data da partida.

3.5. Resfriamento do sêmen

O resfriamento do sêmen foi realizado com base no protocolo proposto por FÜRST *et al.* (2005), onde as palhetas com o sêmen diluído no meio de congelação foram colocadas em um tubo de ensaio com

capacidade de 20 mL, em temperatura ambiente. Em seguida, o tubo de ensaio foi revestido por um saco plástico e inserido dentro de um recipiente de plástico contendo 120 mL de álcool absoluto. O recipiente foi colocado na posição horizontal dentro de uma geladeira de 280 L, com temperatura interna de 4-5 °C, de forma a produzir taxa média de resfriamento de -0,5 °C por minuto em um tempo de resfriamento de 35 minutos. Em seguida, o sêmen foi mantido por mais 25 minutos à temperatura de 4-5° C. Após o período de resfriamento, uma palheta foi aquecida a 37°C em banho-maria e o sêmen foi depositado em um tubo tipo *ependorf*, sendo retirada uma alíquota de 10 µL para a avaliação da motilidade e do vigor.

.

3.6. Congelamento

O congelamento foi realizado utilizando-se uma caixa de isopor com 40 cm de comprimento x 32 cm de altura x 20 cm de largura, e colocando-se as palhetas na posição vertical sobre um suporte de aço inoxidável, suspenso por isopor, a 4 cm acima do nível do nitrogênio líquido (Figura 1). O tempo de congelamento foi de 15 minutos em vapor de nitrogênio líquido. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio. Em seguida, foram colocadas em raques devidamente identificadas, e armazenadas em botijão com nitrogênio líquido, para posterior análise e inseminações.

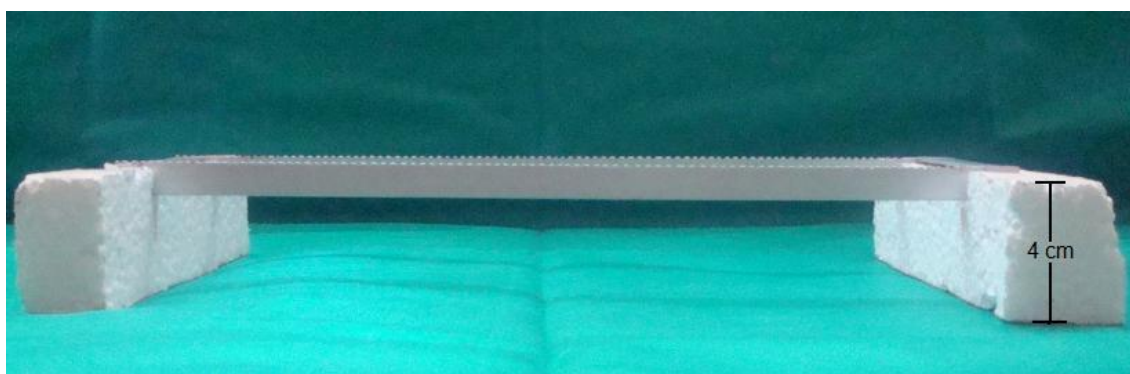


Figura 1 – Suporte de aço inoxidável para palhetas de 4 cm de altura.

3.7. Descongelamento

O sêmen foi descongelado em banho-maria, a 37°C, permanecendo a esta temperatura até o momento da inseminação artificial.

3.8. Avaliação do sêmen descongelado

Para avaliação da motilidade progressiva e do vigor, após o descongelamento, o sêmen foi depositado em um tubo tipo *eppendorf*, mantido em banho-maria a 37°C e uma alíquota de 10 µL foi retirada para avaliação, também realizada pelo sistema de “duplo-cego”.

3.9. Testes complementares

3.9.1. Teste de termorresistência (TTR)

A longevidade dos espermatozóides congelados/descongelados foi avaliada por meio do teste de termorresistência (TTR). Após o descongelamento, o sêmen foi transferido para tubos tipo *eppendorfs* e incubado em banho-maria a 37°C, durante 90 minutos. A motilidade e o vigor espermático foram avaliados nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos após o descongelamento. Ainda, no tempo 0, foram retiradas alíquotas de 10 µL para avaliação da percentagem de espermatozóides reativos ao teste de fluorescência.

3.9.2. Teste de sondas fluorescentes

A execução desse teste seguiu o estabelecido por HARRISON & VICKERS (1990) e modificado por ZÚCCARI (1998). Uma palheta de cada partida de sêmen foi descongelada e depositada em um tubo tipo *eppendorf* e, deste, uma amostra de 10 µL foi retirada e diluída em outro *eppendorf*, previamente identificado e preparado com 40 µL da solução de trabalho

(Tabela 5), produzida a partir da solução estoque (Tabela 4). Em uma sala escura, o tubo tipo *ependorf*, contendo a mistura anteriormente citada, foi homogenizada e, em seguida, uma alíquota de 10 µL foi depositada entre lâmina e lamínula para exame em microscopia de epifluorescência. Para avaliação das membranas plasmática e acrossomal, foram contadas 100 células, que foram classificadas de acordo com a coloração que apresentavam, e consideradas em três categorias para a interpretação dos achados:

Íntegras: espermatozóides com membrana plasmática íntegra. Células coradas pelo diacetato de carboxifluoresceína, apresentando-se verde em toda sua extensão.

Lesadas: espermatozóides com membrana plasmática e acrossomal lesadas. Células coradas pelo iodeto de propídio, apresentando-se vermelhas.

Semi-lesadas: espermatozóide com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra. Células coradas pelo diaceto de carboxifluoresceína na região do acrossomo e núcleo corado pelo iodeto de propídio, apresentando acrossoma verde e núcleo vermelho.

Tabela 4 – Solução de estoque para utilização na técnica de fluorescência para avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide.

Solução	Componentes	Quantidade
Estoque Iodeto de Propídio	Iodeto de Propídio	10 mg
	Solução Fisiológica	20 mL
Estoque diacetato de carboxifluoresceína	Diacetato de carboxifluoresceína	9,2 mg
	Dimetilsulfóxido	20 mL
Estoque de Formaldeído	Formalina 40%	1 mL
	Solução Fisiológica	79 mL
Estoque de Citrato de Sódio	Citrato de Sódio	3 g
	Solução Fisiológica	100 mL

Tabela 5 – Solução de trabalho para coloração fluorescente para avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide.

Solução	Volume
Solução de citrato de sódio 3%	0,96 mL
Solução de formaldeído	10 µL
Solução de Iodeto de Propídio	10 µL
Solução de carboxifluoresceína	20 µL

3.10. Controle folicular e inseminação artificial

Para facilitar o manejo e concentrar as inseminações, as éguas tiveram o estro sincronizado com utilização de análogos da Prostaglandina F2alfa por via intramuscular. As éguas foram rufiadas a cada dois dias e, aquelas em estro, ou que apresentaram folículo maior que 25 mm de diâmetro, foram controladas diariamente, até a detecção de um folículo de 35-40 mm, por meio de palpação retal. Após a detecção do folículo de 35-40 mm as éguas foram distribuídas em dois grupos. T1 (n=25): controle folicular realizado a intervalos de 6 horas e inseminações após a ovulação; T2 (n=23): aplicação de 2000 UI de hCG (Vetecor[®]) por via intramuscular e controle folicular a intervalos de 12 horas. As inseminações foram realizadas 24 horas após a aplicação do hCG, repetidas 24 horas depois, caso a ovulação não ocorresse até 48h após a aplicação da gonadotropina.

As éguas a inseminar foram conduzidas ao tronco de contenção e seu preparo consistia em suspensão da cauda, retirada das fezes da ampola retal e limpeza da região do períneo com água e sabão neutro; em seguida, essa região era secada com papel toalha. Neste momento, procedeu-se o descongelamento das palhetas de sêmen a 37°C. As inseminações foram feitas no ápice do corno uterino ipsilateral à ovulação ou do folículo pré-ovulatório, na dose de 300 milhões de espermatozóides viáveis. Para tal, foi utilizada pipeta flexível (Minitub) de 75 cm, com auxílio de haste metálica específica para IA em eqüinos com palheta de 0,5 mL. O cálculo do número de palhetas utilizadas foi feito em função da motilidade progressiva das partidas do sêmen previamente avaliadas na fase de congelamento.

3.11. Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 13, 25 e aos 35 dias após a ovulação. Aos 13 dias foram feitos por meio de aparelho de ultrassonografia (ALOKA[®] SSD 500, Japão) utilizando transdutor linear trans-retal de 5 MHz e, aos 25 e 35 dias, pela palpação retal.

3.12. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa SAEG 9,1 (Sistema de Análises Genéticas e Estatística – UFV) (SAEG –UFV, 2007)

Foram consideradas para análise descritiva (média e desvios-padrão) das variáveis: motilidade, vigor, patologia.

Foi testada a correlação simples de Pearson entre as variáveis motilidade progressiva no pós-descongelamento e porcentagem de espermatozóides íntegros no teste de sondas fluorescentes.

As variáveis diâmetro folicular inicial, de tempo até a ovulação, de diâmetro do folículo pré-ovulatório, de taxa de crescimento folicular diária e de perdas embrionárias foram submetidas à análise de variância por ANOVA e as médias comparadas pelo teste F com 5% de probabilidade de erro.

Os dados de porcentagem de fertilidade foram avaliados pelo teste do qui-quadrado ao nível de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características e avaliações seminais

A motilidade progressiva, vigor e patologia espermáticas do sêmen fresco são semelhantes aos encontrados por HENRY *et al.* (1987), ARRUDA *et al.* (1989), GEBERS (1995), CANISSO (2008) (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 – Valores médios e desvios-padrão das características do sêmen fresco de jumento da raça Pêga.

Nº Partidas	Volume (mL)	Motilidade Progressiva (%)	Vigor (0-5)	Def. maiores (%)	Def. menores (%)	Normais (%)
13	35,53 ± 17,79	83,07 ± 3,83	3,61 ± 0,36	7,33 ± 3,74	6,41 ± 1,72	86,25 ± 4,39

Tabela 7 – Valores médios e desvios-padrão das patologias espermáticas das partidas do sêmen fresco de jumento da Raça Pêga.

Patologias	Médias	Desvio padrão
GPR	0,41	0,51
CDO	6,75	3,72
PI	0,08	0,28
CDGD	0,08	0,28
DEL	0,08	0,28
INOR	0,83	1,26
ABAX	5,50	1,62
NORMAIS	86,25	4,39
TOTAL	100	

Patologias espermáticas: GPR= gota proximal; CDO= cauda dobrada; PI= peça intermediária; CDGD=cauda dobrada com gota distal; DEL= delgado na base; INOR= cabeça isolada normal; ABAX= abaxial.

Os valores encontrados estão dentro dos padrões seminais desejáveis preconizados pelo CBRA (1998) (motilidade mínima de 70%, vigor mínimo de 3, e 30% de espermatozóides normais), para que o sêmen possa ser submetido ao processo de congelamento.

Os tempos transcorridos nos procedimentos laboratoriais para a criopreservação do sêmen de eqüídeos estão descritos na Tabela 8. Os valores de motilidade progressiva e vigor do sêmen fresco, pós-centrifugação, pós-resfriamento e descongelado estão apresentados nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Esses resultados são próximos aos descritos por CANISSO (2008) que trabalhou em condições semelhantes às do presente estudo.

Tabela 8 – Tempo médio (minutos) transcorrido entre a coleta e os procedimentos de congelamento de sêmen de jumento da Raça Pêga.

Nº Partidas	Coleta ao início da Centrifugação (min)	Fim da Centrifugação ao Início do Resfriamento (min)
13	6,07 ± 2,17	37,61 ± 9,26

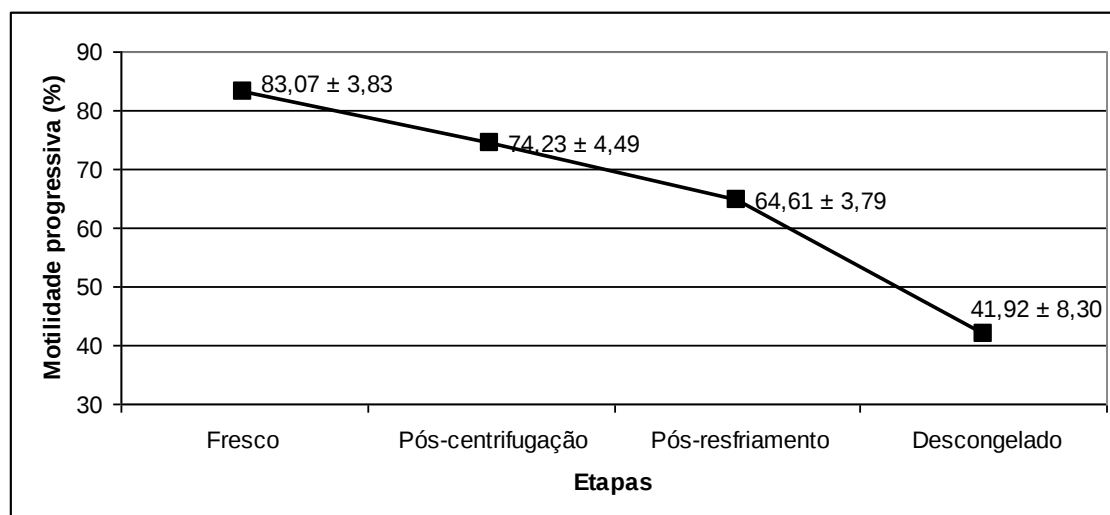


Figura 2 – Motilidade progressiva (%) média do sêmen fresco, pós-centrifugação, pós-resfriamento e descongelado do sêmen de jumento da Raça Pêga.

A motilidade progressiva no sêmen resfriado teve redução de 7% em relação ao sêmen fresco, demonstrando que os procedimentos realizados, provavelmente, foram capazes de proteger a célula espermática na faixa de

choque térmico pelo frio preconizado para o espermatozóide de garanhões (KAYSER *et al.*, 1992).

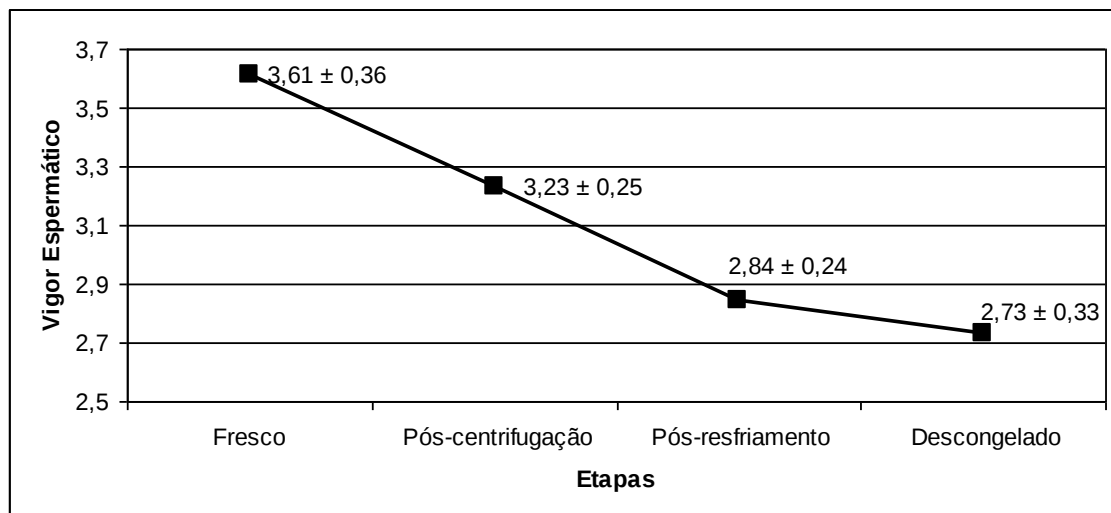


Figura 3 – Vigor espermático médio (0-5) do sêmen fresco, pós-centrifugação, pós-resfriamento e descongelado do sêmen de jumento da Raça Pêga.

Os valores encontrados para motilidade progressiva e vigor espermático, no presente estudo, foram similares aos encontrados na literatura (SILVA *et al.*, 1997; ARRUDA *et al.* 1986 e 1989; OLIVEIRA, 2005 e CANISSO, 2008) que relataram valores próximos a 40% de motilidade progressiva para sêmen asinino descongelado. Entretanto, PAPA *et al.* (1999) verificaram valores de motilidade progressiva superiores a 50% quando utilizaram M9H (Merck+Gema+Kenney e meio de cultura celular BME), associado ao glicerol para congelar sêmen de asininos.

O processo de criopreservação ocasiona redução da viabilidade espermática. Porém, a metodologia usada no experimento foi capaz de minimizar as lesões causadas durante o processamento. Isso mostra que os procedimentos precedentes, como diluição inicial (meio de Kenney), centrifugação (600g/15 minutos), resuspensão no meio diluidor de congelamento, envase (palheta 0,5 mL), resfriamento (35 minutos, - 0,5°C/minuto), estabilização (25 minutos) associado ao dispositivo desenvolvido por FÜRST *et al.* (2005) e congelamento (15 minutos, - 60 °C/minuto), foram eficazes para criopreservação de espermatozóides de jumento, uma vez que este decréscimo foi considerado baixo, do mesmo

modo como foi registrado por CANISSO (2008), que utilizou metodologia idêntica.

Os valores encontrados para motilidade progressiva, vigor espermático e dose inseminante, no presente estudo, estiveram dentro dos limites considerados normais para sêmen congelado/descongelado de garanhões, de acordo com as sugestões propostas pelo CBRA (1998).

Nas Figuras 4 e 5 estão representadas a longevidade (motilidade espermática progressiva e vigor espermático) dos espermatozóides no pós-descongelamento e nos tempos 30, 60 e 90 minutos do TTR. Foi observada queda gradativa e lenta da motilidade progressiva (Figura 4). As mudanças no transporte ativo e na permeabilidade da membrana plasmática da região da cauda dos espermatozóides podem ser os responsáveis pela queda da motilidade progressiva. Existem outros fatores que podem contribuir para redução da motilidade espermática, tais como, alteração na energia disponível ou os danos causados a elementos do axonema, podendo resultar em baixa motilidade, porém, sem alto índice de lesão à membrana plasmática (WATSON, 2000).

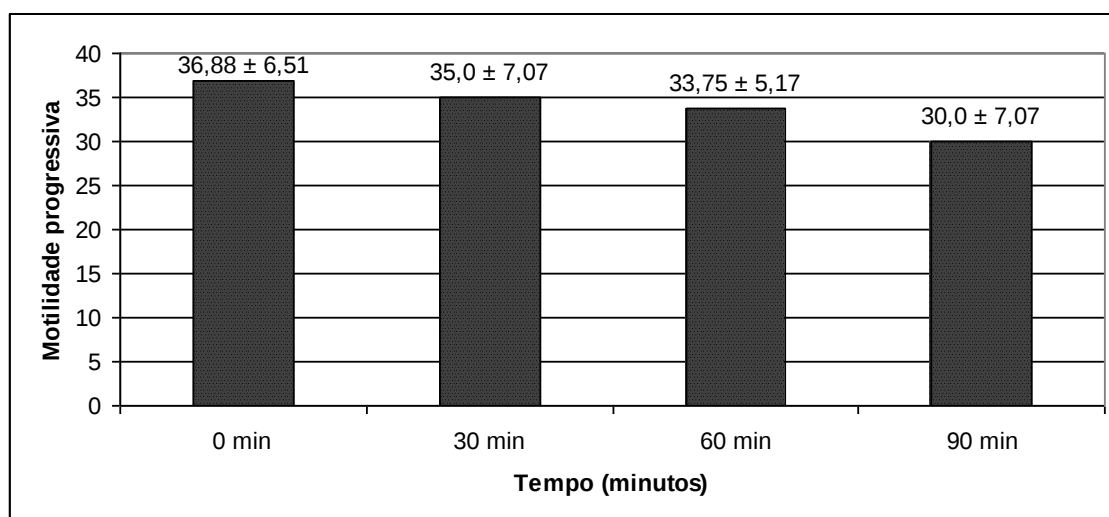


Figura 4 – Motilidade progressiva (%) do sêmen descongelado nos diferentes tempos do teste de termoresistência (TTR).

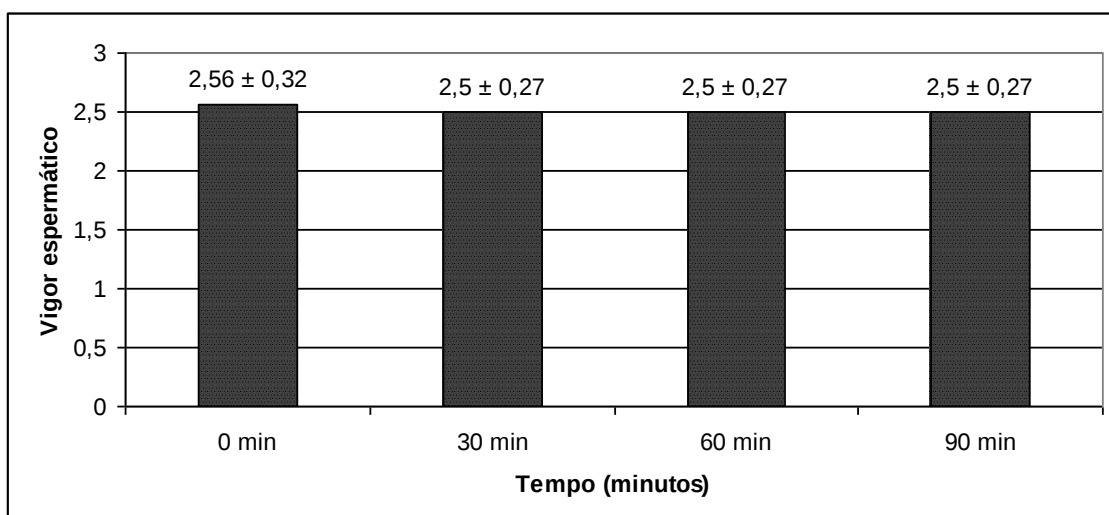


Figura 5 – Vigor espermático (0-5) do sêmen descongelado nos diferentes tempos do teste de termoresistência (TTR).

Os valores de longevidade do sêmen (motilidade e vigor) aos 90 minutos do TTR, relatados no presente estudo, encontram-se próximos aos de FÜRST (2006) e superiores aos encontrados por ZÚCCARI (1998); ambos os autores trabalharam com sêmen eqüino congelado com o diluidor de MARTIN *et al.* (1979). Com base nos achados do presente experimento para os valores de motilidade e vigor espermático médio no TTR, pode-se inferir que o metabolismo energético foi provavelmente preservado.

Os resultados da integridade de membrana plasmática pela fluorescência (iodeto de propídio e diaceto de carboxifluoresceína) estão apresentadas na Figura 6.

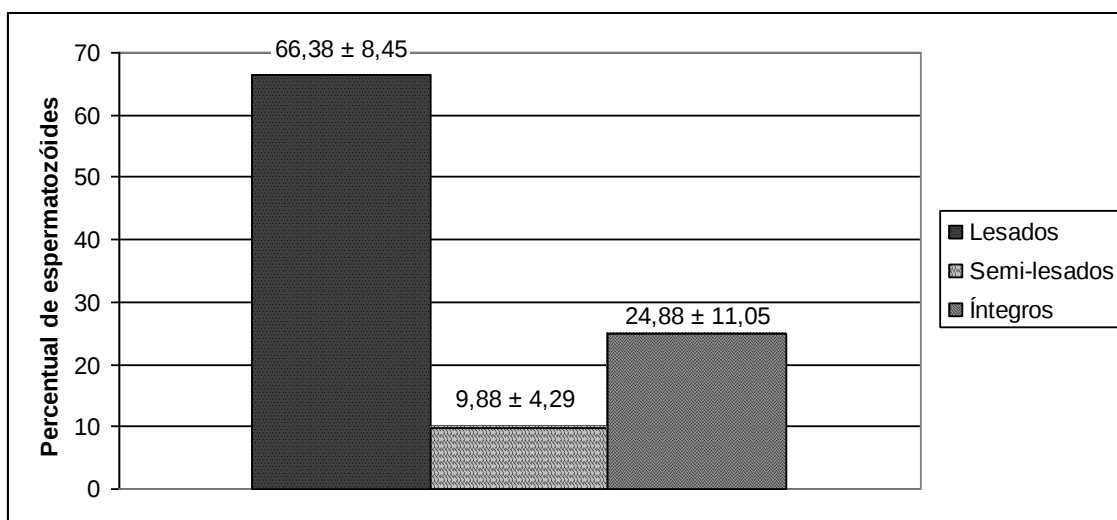


Figura 6 – Porcentagem de espermatozoides lesados, semi-lesados e intactos no teste de fluorescência do sêmen descongelado.

OLIVEIRA (2005) relatou porcentagem de espermatozóides íntegros de $38,9 \pm 11,2$ e $42,1 \pm 9,4$ para sêmen de jumento criopreservado em macrotubos de 2,5 mL e palhetas de 0,5 mL, respectivamente, valores esses próximos para os percentuais de células móveis, $37,6 \pm 9,1$ e $40,5 \pm 7,9$. Já os resultados do presente experimento não apontam correlação ($P>0,05$) entre essas variáveis. Para a motilidade pós-descongelção de 36,87% o número de espermatozóides íntegros e lesados (lesados + semilesados) foi de 24,87 e 76,25, respectivamente. Esses corroboram os de ZÚCCARI (1998) que relatou para sêmen eqüino motilidade pós-descongelamento de 40%, o número de espermatozóides íntegros e lesados de 21 e 79, respectivamente.

O espermatozóide é submetido a um estresse térmico intenso durante a congelação e, por isso, se espera um baixo percentual de células íntegras no descongelamento. Uma das possíveis causas de lesão da membrana plasmática, talvez, seja o efeito tóxico do glicerol ao espermatozóide do jumento (VIDAMENT, 2008).

4.2. Características foliculares

O diâmetro folicular inicial, intervalo (horas) da avaliação do diâmetro inicial até a ovulação e diâmetro do folículo pré-ovulatório estão expostas na Tabela 9. O diâmetro inicial médio foi de aproximadamente 33,10 mm. O diâmetro do folículo pré-ovulatório foi semelhante ($P>0,05$) entre os animais dos tratamentos sem hCG e com hCG. Esses valores estão dentro dos valores considerados normais por DAELS e HUGHES (1993) (30 a 60 mm); são similares aos relatados por SILVA FILHO *et al.* (1998), por VALLE *et al.* (2000 a,b) e por CARVALHO *et al.* (2001) que trabalharam com éguas mestiças e sem indutores da ovulação.

Tabela 9 – Valores médios de diâmetro (mm) folicular inicial, de tempo (horas) até a ovulação e de diâmetro (mm) do folículo pré-ovulatório de animais tratados sem e com hCG.

Tratamento	Diâmetro folicular inicial (mm)	Tempo até a ovulação (horas)	Diâmetro folículo pré-ovulatório (mm)
sem hCG	33,33 ± 4,2	64,25 ± 29,42 ^a	41,5 ± 6,26
com hCG	32,96 ± 2,47	48,03 ± 9,29 ^b	41,3 ± 4,16
Médias	33,10 ± 3,19	54,11 ± 20,72	41,37 ± 4,98

^{a, b} Valores com letras sobresscritas diferentes na mesma coluna são diferente (P<0,05), pelo teste F.

GASTAL *et al.* (2006) relataram que o diâmetro do folículo pré-ovulatório foi menor para os grupos de animais tratados com 2500 e 1500 UI de hCG ($38,3 \pm 0,2$ mm e $39,1 \pm 0,4$ mm), quando comparados ao grupo não tratado ($44,9 \pm 0,4$ mm). Esses autores concluíram que o tratamento com hCG exerce efeito depressivo no crescimento folicular 24 horas após a sua aplicação, reduzindo o diâmetro do folículo pré-ovulatório.

O tempo de crescimento do folículo de 33 mm até a ovulação, apresentou diferença (P<0,05) entre os animais dos tratamentos sendo de 48,03 h para o grupo tratado com hCG (Tabela 9). Esses resultados estão de acordo com os resultados da literatura (VOSS, 1993; BARBACINI *et al.*, 2000; SIEME *et al.*, 2003; GASTAL *et al.* (2006); INTERVET, 2008; MILLER, 2008; MOREL e NEWCOMBE, 2008; SAMPER, 2008), que citam ovulações ocorrendo até 48 horas após a aplicação do hCG, a partir de folículos com tamanho variando de 30 a 35 mm.

As taxas de crescimento folicular diária da detecção do estro à ovulação, da detecção de um folículo de 33 mm à ovulação (Tabelas 10 e 11) e do tempo de crescimento do folículo dominante da detecção do estro à ovulação (Tabela 10) foram semelhantes entre os animais dos tratamentos (P>0,05). O tempo de crescimento do folículo de 33 mm à ovulação foi menor (P<0,05) para o tratamento com hCG. A eficácia da utilização do hCG na indução da ovulação, foi comprovada nesse experimento, podendo ser uma medida viável na redução dos custos com mão de obra veterinária especializada.

Tabela 10 – Tempo (dias) e taxa de crescimento folicular diária (mm/dia) da detecção do estro à ovulação de animais tratados ou não com hCG.

Tratamento	Tempo início do estro à ovulação (dias)	Taxa de crescimento folicular diária (mm/dia)
sem hCG	3,98 ± 1,99	3,52 ± 1,76
com hCG	3,29 ± 1,49	4,07 ± 2,36
Médias	3,55 ± ,171	3,87 ± 2,15

Não houve diferença ($P>0,05$) entre tratamentos pelo teste F.

Tabela 11 – Tempo (dias) e taxa de crescimento folicular diária (mm/dia) do folículo de 33 mm à ovulação de animais tratados ou não com hCG.

Tratamento	Tempo até a ovulação (dias)	Taxa de crescimento folicular diária (mm/dia)
sem hCG	2,67 ± 1,22 ^a	3,42 ± 2,1
com hCG	2,00 ± 0,38 ^b	4,39 ± 2,94
Médias	2,25 ± 0,86	4,03 ± 2,67

^{a, b} Valores com letras sobscritas diferentes na mesma coluna são diferente ($P<0,05$), pelo teste F.

Nas condições do presente estudo, o uso de hCG não interferiu na taxa de crescimento folicular diário, bem como no diâmetro do folículo pré-ovulatório. Todavia, a dose de 2000 UI da gonadotrofina foi eficaz para indução da ovulação das éguas.

4.3. Fertilidade

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

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

As taxas de gestação aos 13 dias foram de 40% (10/25), para as inseminações realizadas pós-ovulação (tratamento 1), e de 26% (6/23) para as inseminações feitas pré-ovulação (tratamento 2). Não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) nas taxas de gestação entre os dois momentos de inseminação (Tabela 12).

Tabela 12 – Taxa de gestação aos 13 dias após ovulação de éguas inseminadas pré ou pós ovulação usando sêmen congelado/descongelado de jumento da Raça Pêga.

	T1 - Pós-ovulação		T2 - Pré-ovulação	
	Nº de IA's	Gestantes	Nº de IA's	Gestantes
Nº de ciclos	25	10	23	6
Total		40%		26%

Não houve diferença ($P>0,05$) entre tratamentos pelo teste do Qui-quadrado.

A maioria dos testes de fertilidade com sêmen congelado de jumentos utilizou esquemas de inseminação pós-ovulação. VIEIRA *et al.* (1985) inseminaram 20 éguas com sêmen congelado de jumento (250 milhões de espermatozóides viáveis) e encontraram 33% de fertilidade. ARRUDA *et al.* (1986), usando a mesma concentração espermática, inseminaram 16 éguas e obtiveram 44% de gestação. PAPA *et al.* (1999), trabalhando com sêmen de jumentos na dose de 800×10^6 de espermatozóides viáveis, obtiveram 66% de éguas gestantes. OLIVEIRA (2005) encontrou 40% de gestação em 10 éguas inseminadas no corpo do útero, utilizando dose inseminante de 800 milhões de espermatozóides. CANISSO (2008), usando doses de 300×10^6 de espermatozóides viáveis, obteve fertilidade de 50% e 53,3% com os diluidores de MARTIN *et al.* (1979) e de NAGASE e NIWA (1964) modificado, respectivamente. Entretanto, este autor, trabalhando em condições semelhantes, encontrou altas taxas de perdas embrionárias em éguas inseminadas com diluidor de MARTIN *et al.* (1979). Estas taxas foram de 6,67% (1/15 gestações) e 78,57% (11/14 gestações) para os diagnósticos realizados entre 13 para 25 e 25 para 35 dias, respectivamente. Estes resultados contrastam com os obtidos no presente experimento (Tabela 13), em que foram encontradas taxas de perdas embrionárias similares entre os dois tratamentos ($P>0,05$), sendo de 4% e de 11% entre 13 e 25 dias, para

os tratamentos 1 e 2, respectivamente. Não foram observadas mortes embrionárias entre os 25 e os 35 dias.

Tabela 13 – Taxa de prenhes aos 13, 25 e 35 dias de éguas inseminadas após pré e pós ovulação, usando sêmen congelado de jumento da Raça Pêga.

Momento IA	Número de gestações		
	13 dias	25 dias	35 dias
Pós-ovulação	40% (10/25)	36% (9/25)	36% (9/25)
Pré-ovulação	26% (6/23)	17% (4/23)	17% (4/23)

Não houve diferença ($P>0,05$) entre tratamentos pelo teste F.

Os resultados alcançados com inseminações pós-ovulação encontram-se próximos aos encontrados na literatura, mostrando que o uso do diluidor de MARTIN *et al.* (1979) na dose inseminante de 300 milhões de espermatozoides viáveis, é satisfatório para sêmen de jumentos.

Poucos são os dados encontrados sobre a inseminação artificial de éguas antes da ovulação, usando sêmen congelado de jumentos. Em quase todos os trabalhos encontrados na literatura, as inseminações ocorreram pós-ovulação com deposição do sêmen no corpo do útero. TRIMECHE *et al.* (1998) inseminaram jumentas uma vez por dia, a partir da detecção de um folículo de 30 mm até a ovulação, e obtiveram taxa de prenhes de 38%. OLIVEIRA (2005), inseminando jumentas antes e após a ovulação, não obteve nenhuma gestação. Esse mesmo autor, inseminando éguas pós-ovulação com deposição do sêmen no corpo uterino, obteve 40% de gestações (4/10). VIDAMENT *et al.* (2008), inseminando jumentas e éguas 24 e 48 horas antes da ovulação, com dose inseminante de 400 milhões de espermatozoides totais no corpo do útero, obtiveram taxas de prenhes por ciclo de estral 11% e 36%, jumentas e éguas, respectivamente. Todos esses resultados são superiores aos obtidos no presente experimento. Sendo assim, faz-se necessário uma comparação com esquemas de inseminação para sêmen congelado eqüino.

A hCG tem sido usada com agente indutor da ovulação em programas de inseminação artificial em tempo fixo, permitindo a redução no manejo das as éguas e levando à obtenção de resultados de fertilidade satisfatórios

(METCALF, 2007). BARBACINI *et al.* (2005) avaliaram diferentes protocolos de inseminação com sêmen eqüino congelado, e não encontraram diferença na taxa de prenhes de éguas inseminadas 24 e 40 horas após a aplicação de hCG (46%) e éguas inseminadas apenas uma vez após a ovulação (47%), usando dose de 800 milhões de espermatozóides totais.

MORRIS *et al.* (2003) utilizando apenas uma inseminação no corpo do útero, 32 horas após tratamento com hCG, obtiveram taxa de fertilidade de 67%. Segundo VIDAMENT *et al.* (1997) e VIDAMENT (2005), a fertilidade aumenta quando éguas são inseminadas duas vezes, a intervalos de 24 horas até a ovulação, quando comparados a apenas uma inseminação pré-ovulação.

Os resultados obtidos no presente experimento são inferiores aos citados com sêmen eqüino congelado. Porém, são superiores aos obtidos por ALIEV (1981) citado por SILVA FILHO *et al.* (1998) e por SATURNINO *et al.* (2002) que, inseminando éguas com sêmen eqüino congelado de garanhões, 37-48 horas antes da ovulação, obtiveram uma taxa de concepção de 20%.

No tratamento 2, somente quatro das 23 inseminações artificiais foram feitas antes e após a ovulação, e resultaram em apenas uma prenhes aos 13 dias. Os resultados aqui apresentados são inferiores (25% e 26,3%) aos obtidos por METCALF (2005), que conseguiu taxas de prenhes de 72% (32/44) e 70% (164/234) com inseminações pré-ovulação e pré e pós-ovulação, respectivamente. Esses resultados mostram que, tanto inseminações pré, quanto pré e pós-ovulação, apresentam índices de fertilidade similares entre si.

O intervalo de 20:16 horas da inseminação à ovulação, no tratamento 2 (Tabela 14), pode ter sido longo demais para a manutenção da viabilidade do espermatozóide asinino. Isto poderia explicar a pior taxa de gestação obtida nas inseminações pré-ovulação (26%), em relação aos estudos citados anteriormente. Nesse esquema de inseminação, os espermatozóides deveriam permanecer viáveis por um período de aproximadamente 20 horas. Porém, SIEME *et al.* (2003) e LOOMIS e SQUIRES (2005) evidenciaram

maior fertilidade quando as inseminações, com sêmen eqüino congelado, foram realizadas até 12 horas antes da ovulação. Portanto, a utilização de esquemas com inseminações realizadas 32 a 36 horas após a indução da ovulação com hCG, poderiam ser alternativa para diminuir o intervalo da inseminação à ovulação.

Tabela 14 – Intervalos médios (horas) do último controle folicular à inseminação, no sistema pós-ovulação, e da última inseminação à ovulação, no sistema pré-ovulação.

Tratamento: pós-ovulação → último controle à inseminação (horas)	Tratamento: pré-ovulação → última inseminação à ovulação (horas)
6:35	20:16

Nas inseminações pós-ovulação, a viabilidade do ovócito é a mais importante para a ocorrência da fecundação, e sua viabilidade no trato genital é de 8 a 12 horas (HUNTER, 1990; DANTAS, 1995). Assim, no tratamento pós-ovulação, as inseminações se concentraram em uma faixa de tempo em que o ovócito da égua estava viável (aproximadamente 6 horas e 35 minutos) (Tabela 14). Isso explica os resultados satisfatórios do sêmen congelado nesse esquema de inseminação (40%), quando comparados aos valores obtidos nos demais trabalhos (33% a 53%) que utilizaram esquemas de inseminação pós-ovulação, com sêmen congelado de jumento (VIEIRA *et al.*, 1985; ARRUDA *et al.*, 1986; OLIVEIRA, 2005; CANISSO, 2008).

5. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos pode-se chegar às seguintes conclusões:

- 1) O tempo total de até 90 minutos para o TTR (37°C) foi satisfatório para avaliar o sêmen descongelado de jumentos.
- 2) Os parâmetros físicos do sêmen criopreservado e os resultados de fertilidade obtidos com esta metodologia de congelamento e com o diluidor de MARTIN *et al.* (1979) se mostraram satisfatórios para criopreservação de sêmen de jumentos da raça Pêga.
- 3) O uso de inseminações de éguas após a ovulação, com dose de 300×10^6 de espermatozóides viáveis, resultou em índice de fertilidade satisfatório.
- 4) Ambos os momentos de inseminação (antes e após a ovulação) podem ser utilizados em éguas inseminadas com sêmen asinino congelado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W.; Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 147, 1987.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: **McKINNON, A.O.; VOSS, J.L.** (eds). **Equine Reproduction**. Philadelphia., Lea&Febiger, 1993. 715p.
- ALVARENGA, M.A.; LANDIM E ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M. *et al.* Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. **Proceedings...** Equine Veterinary Journal, v. 32, n. 6, p. 541-545, 2000.
- ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; MANZANO, A. Inseminação artificial de eqüídeos com sêmen congelado em palhetas de 0,5 ml. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 20., 1986, Cuiabá. **Anais...**Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso, 1986, p. 181.
- ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; BARBOSA, R.T.; MANZANO, A. Congelação do sêmen de jumentos: características reprodutivas de um doador. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, (Supl.1), p. 215-216, 1989.
- ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo, 2000. 120p. Tese (Tese de Livre Docência em Reprodução Animal) FMVZ – Universidade de São Paulo, 2000.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectantes on equine sperm motility, viability, and

- mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**. v. 22, n.6, p. 1061-1069, 2001.
- BARBACCINI, S.; ZAVAGLIA, G.; GULDEN, P.; *et al.* Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. **Equine Veterinary Education**, v.2, p.404–8, 2000.
- BARBACINI, S.; LOOMIS, P.; SQUIRES, E.L. The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen–thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.203–05, 2005.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, p.383-391, 1973.
- CANISSO, I.F. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da Raça Pêga**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Zootecnia, 2008. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- CARVALHO, G.R.; FONSECA, F.A.; SILVA FILHO, *et al.* Avaliação da Utilização do "Cio do Potro" na Coleta de Embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**.v.30 n.5 Viçosa set./out. 2001.
- COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P *et al.* Effects of centrifugation, glycerol level cooling to 5 °C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology**, v. 2, n. 1, p. 25-8 July, 1984.
- COOPER, G.M. **The cell: a molecular approach**. Washington: ASN Press, 1996. 673 p.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. Ed. Belo Horizonte: 1998. p. 25-27.
- COSTA, R.N. O jumento Pêga. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE EQÜIDEOCULTURA, 1 , Viçosa - MG. **Anais...** Viçosa – MG: Ed: Viçosa, UFV, 2007. p. 93-98. 2007.
- CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**.v.5; p.46-52, 2000.
- DANTAS, M.S. **Influência de dois sistemas de cobertura após a ovulação, sobre a fertilidade de éguas, reabsorção embrionária e sexo dos produtos**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1995. 59p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1995.

- DEALS, P.F.; HUGHES, J.P. The normal estrous cycle. In: **McKINNON, A.O.; VOSS, J.L.** (eds). **Equine Reproduction**. Philadelphia., Lea&Febiger, 1993. 124p.
- DEMICK, D.S.; VOSS, J.L. i PICKETT, B. W. Effect of cooling, storage with glycerolization and spermatozoal number in equine fertility. **Journal of Animal Science**. v.43, p.633-637, 1976.
- DELL'AQUA Jr, J.A. **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminando do sêmen congelado eqüino**. Botucatu, 2000, 81p. Tese (Mestrado) – 93p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. “Julio de Mesquita Filho”.
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; BURNS, P.J.; DRISCOLL, D.D. Fertility and characteristics of slow-cooled stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**. (Suppl.), n. 35, p. 649-650, 1987.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**. (Suppl.), v. 47, p. 243-255, 1993.
- FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; *et al.* Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v. 27, p.247-268, 1990.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v. 3, p. 1-13, 1986.
- FAYRER-HOSKEN, R.; ABREU-BARBOSA, C.; HEUSNER, G.; *et al.* Cryopreservation of Stallion Spermatozoa with INRA96 and Glycerol. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, 2008.
- FLEURY, J.J.; CASSOLI, P.D. Inseminação artificial em eqüino com baixa dose de sêmen congelado. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 27, p. 234, 1999.
- FÜRST, R. **Efeito do resfriamento no sêmen eqüino sobre sua congelabilidade**. 2000. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O. *et al.* Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 599-607, 2005.
- FÜRST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen eqüino**. Tese Doutorado – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

- GASTAL, E.L.; SILVA, L.A.; GASTAL, M.O.; *et al.* Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 186–190, 2006. (abstract).
- GEBERS, A.M. **Emissão diária de espermatozóides e algumas características reprodutivas de jumentos da raça Pêga**. Viçosa: Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1995. 90p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) DZO – UFV, 1995.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North Am.*: **Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.
- HAFEZ, E.S.E. Eqüinos. In: **Reprodução animal**. HAFEZ, E.S.E. ed. Traduzido por BARNABE, R.C. São Paulo. Editora Manole Ltda. 1995. Cap. 17, p 366-389.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. In: **Reprodução animal**. 7 ed. Editora Manole, 2004. 513p.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-28, 1992.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal Reproduction Microscopy Science**, v.76, p.84-97, 1957.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.
- HENRY, M.; OLIVEIRA, M.M.F.; DIAZ, A.P.; *et al.* Características do sêmen de jumentos da raça Nordestina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1987, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p. 72.
- HUNTER, R.H.H. Gamete lifespan in the mare's genital tract – Editorials. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n.6, p. 378-379, 1990.
- INTERVET, disponível em: <http://www.intervet.com.br>. Acesso em Janeiro de 2009.
- KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K.; *et al.* Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, n.4, p.601-614, 1992.
- KEITH, S.L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. Colorado, 1998. 104 f. Thesis (Master of Science) – Colorado State University, Fort Collins.

- KENNEY; R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; *et al.* Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 21, 1975, Lexington, KY, USA. **Proceedings...** American Association of Equine Practitioners, Lexington, KY, 1975, p. 327-335.
- KLOPPE, L.H.; VARNER, D.D.; ELMORE, K.N.; *et al.* Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.29, n.2; p. 429-439, 1988.
- KUNDU, C.N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUNDER, G.C. Developed of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Criobiology**, v. 40, p. 117-125, 2000.
- LEIPOLD, S.D.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. *et al.* Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. **Theriogenology**, v. 49, n. 8, p. 1537-1543, 1998.
- LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extend semen. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, p. 467-485, 1991.
- LOOMIS, P.R.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose- egg yolk and package in straws. **Journal of Animal Science**, v. 56, p.687-693, 1983.
- LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 191–200, 2001.
- LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, P.480-491, 2005.
- MARIANTE, A.S.; CAVALCANTI, N.; **Animais do descobrimento**. 1^a ed. Ministério da Agricultura e Abastecimento, EMBRAPA. Brasília, 2000. 228p.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility** (Supply.), n. 27, p. 47-51, 1979.
- MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; SCHEFFEN, B.; *et al.* Pregnancies following transfer of cattle-embryos preserved by vitification. **Cry-letters**, v. 7, p. 270-273, 1986.
- MAZUR, P. Basic concepts in freezing cells. In: **PROC. 1^o INTERNATIONAL CONF. DEEP FREEZING BOAR SEMEN**. Uppsala, Sweden, p. 91-111, 1985.

- MCDONALD, L.E. 1988. Hormones of the pituitary gland. In: **Booth, N.H., McDonald, L.E. (Eds.), Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, sixth ed. Iowa State University Press.
- MCKINNON, A.O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. **Australian Equine Veterinary Journal**, v. 14, n. 4, p. 156-175, 1996.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; *et al.* Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.
- METCALF, E.S. Optimizing pregnancy rates using frozen-thawed equine semen. **Animal Reproduction Science**, v.89, p297-299, 2005.
- METCALF, E.S. The efficient use of equine cryopreserved sêmen. **Theriogenology**, v. 68, p. 423-428, 2007.
- MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. **Theriogenology**, v. 70, p. 463-468, 2008.
- MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E.L.; *et al.* Determination of temperature and cooling rate which induce cold-shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 291-304, 1992.
- MOREL, M.C.G.D.; NEWCOMBE, J.R. The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 109. p. 189-199, 2008.
- MORRIS, L.H.A.; TIPLADY, C.; COOK, B.; *et al.* Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of frozen-thawed ejaculated and epididymal spermatozoa. In: **Havemeyer Foundation Workshop, 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer**. Saari, Finland, 6th-9th July, p. 12, 2000.
- MORRIS, L.H.A.; TIPLADY, C.; ALLEN, W.R. Pregnancy rates im mares after after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n.2 p. 197-201, 2003.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; *et al.* Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk an easy method cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.
- MURTHY, S.S.M. Some insight into de physical basis of the cryoprotetive action of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol. **Criobiology**, v. 36, p.84-96, 1998.

- NAGASE, H.; NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. I Factors affecting survival of spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5., 1964, Trento. **Proceedings...** Trento: International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1964, v.4, p.410-415.
- NEVES NETO, J.R.; MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P. Fertilidade do sêmen eqüino congelado com etilenoglicol ou glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, 1995, Belo Horizonte, MG: **Anais...** Belo Horizonte, MG: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1995, p. 292.
- NIELSEN, J.M.; KOFOED BOCK, T.S.; ERSBOLL, A.K. Factors associated with fertility in horses in a Danish equine practice after artificial insemination with frozen-thawed semen. **Animal Reproction Science**. Accepted Manuscript 2008.
- OLIVEIRA, J.V. **Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumento (Equus asinus) por meio de testes laboratoriais e fertilidade**, Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, 2005.108p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – FMVZ- Universidade Estadual Paulista, 2005.
- PAPA, F. O.; NEVES NETO, L.R.; LEME, D.P.; *et al.* A comparative study between the freezability and fertility of stallion semen using different extenders. Baltimore. **Proceedings...** Baltimore 1998, p. 140-141.
- PAPA, F.O.; MEIRA, C.; SIMON, J.J.; *et al.* Pregnancies in mares using donkey (eqqus asinus) frozen semen. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.27, p. 262, 1999.
- PARKS, E.J.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procederes on sperm membranas. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.
- PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. p. 769-789.
- QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 403-407, 1980.
- SAEG: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA–UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas – SAEG**. Versão 9.1. Viçosa, MG, 2007. 142p.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p.77-11, 2000.

- SAMPER, J.C.; MORRIS, C.A. Current methods for a stallion semen cryopreservation: A survey. **Theriogenology**, v. 49, p. 895-03, 1998.
- SAMPER, J.C. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. **Theriogenology**, v. 70, p. 445-447, 2008.
- SATURNINO, H.M.; SILVA FILHO, J.M.; SILVA, M.D.; *et al.* Efeito do intervalo das duas últimas inseminações sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p. 1143-1149, 2002.
- SIEME, H; SCHÄFER, T.; STOUT, T.A.E.; *et al.* The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology** v. 60, p. 1153–1164, 2003.
- SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic of the structure of cell membranes. **Science**, n.175, p. 720-731, 1972.
- SILVA FILHO, J.M.; OLIVEIRA Jr., E.F.; PALHARES, M.S.; *et al.* Avaliação da fertilidade de jumentas da raça pega, cobertas após a ovulação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 9(3): 133-139, 1986.
- SILVA FILHO, J.M.; VALLE, G.R.; SATURNINO, H.M.; *et al.* Influência do intervalo entre a inseminação artificial com sêmen diluído resfriado e transportado e a ovulação sobre a fertilidade de éguas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50 p.563-568, 1998.
- SILVA, S.S; HENRY, M.; NUNES, S.A. *et al.* Influência do sistema de envasamento sobre a qualidade espermática de jumentos (Equus asinus) avaliada “in-vitro” pós-descongelação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 21, n.3, p.140-146, 1997.
- SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; MCKINNON, A.O. Preservation of stallion semen *In*: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 33., 1987. **Proceedings...** 1987. p. 475-486.
- SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; *et al.* Principles of cryopreservation. **In: Cooled and frozen Stallion Semen**, b.09, 1999.
- TEIXEIRA, F.M.; LUIZ, A.T.; HENRY, M. Eficiência reprodutiva em jumentas da raça pêga. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 10(3): 165-177, 1985.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LANNOU, D. BARRIERE, P. Improvement of motility of post-thaw potou jackass sperm using gultamine. **Theriogenology**, v. 45, p. 1015-1027, 1996.

- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v.50, p.793-806, 1998.
- VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; *et al.* Efeito do bimestre dentro da estação de monta sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.52 n.4 Belo Horizonte Ago. 2000a.
- VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; *et al.* Efeito do Número de Inseminações Artificiais sobre a Fertilidade de Éguas Inseminadas com Sêmen Diluído, Resfriado a 14°C e Transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29 n.6 Viçosa nov./dez. 2000b.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, C.; YVON, J.M. *et al.* Equine frozen semen freezing ability and fertility field results. **Theriogenology**, v.48, p. 907-917, 1997.
- VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P. *et al.* Centrifugation and addition of glycerol at 22 °C instead of 4 °C improve frozen stallion semen motility and fertility. **Theriogenology**, v. 54, p. 907-919, 2000.
- VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I. *et al.* Advances in cryopreservation in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science**, v. 68. p. 201-218, 2001.
- VIDAMENT, M. ; DAIRE, J.M. ; YVON, J. M.; *et al.* Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, v. 58, p.1-3, 2002 (abstract).
- VIDAMENT, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 115–136, 2005.
- VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; MARTIN, F.X.; *et al.* Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Anim Reproduction Science**. Accepted Manuscript 2008.
- VIERA, R.C.; ARRUDA, R.P.; MANZANO, A. Inseminação intercornual de Inseminação com sêmen congelado em palhetas de 0,5 ml. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 22., 1985, Camburiu. **Anais...** Camburiu: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1985. p. 298.
- VOSS, J.L. Human chorionic gonadotropin. In: **McKINNON, A.O.; VOSS, J.L.** (eds). **Equine Reproduction**. Philadelphia., Lea&Febiger, 1993. 325p.

- WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Ed.) **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, p.189, 1981.
- WATSON, P.F. Recent developments e concepts in cryopreservation of spermatozoa e the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**. v. 60, p. 481-92, 2000.
- WBFSH. World Breeding Federation for Sport Horses. Disponível em: <http://www.wbfs.org>. Acesso em Janeiro de 2009.
- YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; *et al.* Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, p. 579-585, 2000.
- ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Botucatu: UNESP. Tese (Doutorado), 1998. 121p.