

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

**Criopreservação do sêmen asinino coletado de forma
fracionada e envasado em “FlatPacks” ou palhetas
de 0,55 mL: características espermáticas e taxa
de gestação de éguas com ovulação induzida**

Amanda Luiza Ribeiro Sales

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2011

Amanda Luiza Ribeiro Sales

Criopreservação do sêmen asinino coletado de forma fracionada e envasado em “FlatPacks” ou palhetas de 0,55 mL: características espermáticas e taxa de gestação de éguas com ovulação induzida

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. José Monteiro da Silva Filho

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2011**

S163c

Sales, Amanda Luiza Ribeiro, 1985-

Criopreservação do sêmen asinino coletado de forma fracionada e envasado em “FlatPacks” ou palhetas de 0,55ml: características espermáticas e taxa de gestação de éguas com ovulação / Amanda Luiza Ribeiro Sales. – 2011.

216p. : il.

Orientador: José Monteiro da Silva Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Asinino – Reprodução – Teses. 2. Sêmen congelado – Teses. 3. Sêmen – Resfriamento – Teses. 4. Égua – Inseminação artificial – Teses. 5. Fertilidade – Teses. I. Silva Filho, José Monteiro da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 926

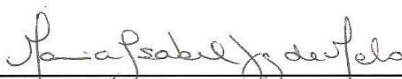
Dissertação defendida e aprovada em 28 de setembro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



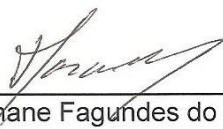
Prof. José Monteiro da Silva Filho
Presidente



Prof. Guilherme Ribeiro Valle



Profª. Maria Isabel Vaz de Melo



Prof. Ernane Fagundes do Nascimento



Prof. Helton Mattana Saturnino

DEDICATÓRIA

A todos que estiveram ao meu lado nesta fase e assim permanecerão por toda a minha vida. Dedico.

**“Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe? Eu só levo a certeza
de que muito pouco eu sei, ou nada sei...”**

Almir Sater e Renato Teixeira

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças para chegar até aqui e continuar seguindo em frente;

À Universidade Federal de Minas Gerais e à Escola de Veterinária, pela oportunidade de realização do curso;

Aos membros da banca, pela participação;

Ao professor José Monteiro, pelos ensinamentos e orientação;

À professora Maristela Palhares e ao professor Henrique Nunes, pela disponibilidade para realização das análises estatísticas;

Ao senhor Tarcisio Resende, por ter disponibilizado os animais e a infra-estrutura da fazenda, pela confiança em nós depositada e pela energia positiva durante toda a realização deste trabalho;

À família Resende, Dona Carmem, Tarcisinho, Mari e Fia, pela acolhida;

Aos funcionários da Fazenda Santa Edwiges, em especial ao Alexandre, Wisner, Gilmar, Ricardo, Dirceu e Zezé;

Às companheiras de experimento, Alice e Laura, pelos meses de convivência, pelo apoio e ajuda nas horas difíceis;

À minha família, Ari, Sônia, Lelê, Deca e D. Ana, por acreditarem na minha capacidade;

Ao Renato e a todos do Haras TRIO, pelo apoio, carinho, confiança e compreensão sempre;

Aos amigos, Celinho, Bellinha, Ana Paola, Bolivar, Hudson, Leopoldo e Ricardinho, pela força e amizade, pela compressão nos momentos em que me ausentei;

Às amigas Carol e Patrícia, pela companhia, incentivo, amizade, por toda força sempre;

Às companheiras de curso, Amandinha, Nicole, Raissa e Rute, pela ajuda na realização deste trabalho;

À estagiária Maria, pela colaboração durante os experimentos;

Ao Sr. Neymar, pela disponibilidade para avaliação das amostras de sêmen;

Aos funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, especialmente ao Fabinho, Tião, Luíz e Dário, por toda ajuda;

Ao professor Guilherme Ribeiro Valle, pelo exemplo e incentivo;

Aos animais, por todo carinho e alegria proporcionada.

Expresso meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO	
	RESUMO 23
	ABSTRACT 24
1.	INTRODUÇÃO 25
2.	REVISÃO DE LITERATURA 26
2.1.	Fatores a serem considerados no processo de congelamento e utilização do sêmen congelado de asininos 26
2.1.1.	Fatores inerentes ao reprodutor e ao sêmen 26
2.1.1.1.	Individualidade do reprodutor 26
2.1.1.2.	Biologia da célula espermática dos asininos 27
2.1.1.3.	Características do plasma seminal de equídeos 28
2.1.1.4.	Princípios da criopreservação 32
2.1.1.5.	Efeito da coleta fracionada, da centrifugação, com retirada do plasma seminal e da taxa de diluição sobre as características de motilidade espermática e taxa de gestação de éguas inseminadas 33
2.1.1.6.	Diluidores utilizados para a centrifugação do sêmen de asininos 35
2.1.1.7.	Diluidores utilizados para o congelamento do sêmen de asininos 35
2.1.1.7.1.	Macromoléculas utilizadas nos diluidores 36
2.1.1.7.2.	Crioprotetores utilizados nos diluidores 40
2.1.1.7.3.	Antioxidantes utilizados nos diluidores 42
2.1.1.7.4.	Outros aditivos utilizados nos diluidores 44
2.1.1.8.	Tipos de envasamento para o congelamento do sêmen de asininos 46
2.1.1.9.	Resfriamento do sêmen pré-congelamento 47
2.1.1.10.	Curvas de resfriamento e de congelamento utilizadas para o sêmen de asininos 48
2.1.1.11.	Concentração espermática por mL de sêmen diluído pré-congelamento 50
2.1.1.12.	Número de espermatozoides por dose inseminante 50
2.1.1.13.	Descongelamento do sêmen 51
2.1.2.	Fatores inerentes às fêmeas equinas 53
2.1.2.1.	Efeito da idade 53
2.1.2.2.	Efeito da categoria reprodutiva 56
2.1.2.3.	Hormônios e protocolos utilizados para o controle do cio e da ovulação em éguas 58
2.1.2.4.	Efeito do momento de deposição do sêmen em relação à ovulação 64
2.1.2.5.	Efeito do local de deposição do sêmen 66
2.1.2.6.	Efeito do número de inseminações por ciclo 68
2.2.	Fertilidade do sêmen asinino 70
3.	MATERIAL E MÉTODOS 73
3.1.	Localização, condições climáticas e período experimental 73
3.2.	Delineamento experimental e animais utilizados 74
3.2.1.	Experimento I: Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento rápida. 74
3.2.2.	Experimento II: Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento lenta. 74
3.2.3.	Experimento III: Sincronização, indução da ovulação, local de deposição do sêmen no sistema genital e taxa de gestação de fêmeas equinas inseminadas com sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks e congelado. 75
3.2.4.	Manejo reprodutivo e nutricional dos reprodutores 75
3.2.5.	Manejo reprodutivo e nutricional das éguas 75
3.2.6.	Coleta, pré-diluição, resfriamento, diluição final, envasamento, congelamento, descongelamento e avaliação do sêmen pós- descongelamento 76
3.2.6.1.	Coleta fracionada do sêmen 76
3.2.6.2.	Avaliação física, pré-diluição, resfriamento e diluição final do sêmen 77

3.2.6.3.	Envasamento do sêmen em FlatPacks	78
3.2.6.4.	Envasamento do sêmen em palhetas	78
3.2.6.5.	Congelamento do sêmen	78
3.2.6.6.	Avaliação do sêmen após o descongelamento	79
3.2.6.6.1.	Teste de termo resistência (TTR) dos ejaculados	79
3.2.7.	Diluidores utilizados	79
3.2.8.	Sincronização, indução e controle da ovulação, inseminação artificial e controle da gestação	80
3.2.8.1.	Controle reprodutivo das éguas	80
3.2.8.2.	Controle da ovulação	80
3.2.8.3.	Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) das éguas do experimento III	81
3.2.9.	Análises Estatísticas	81
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
4.1.	Experimento I - Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído e envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento rápida	88
4.1.1.	Comportamento sexual, características físicas do sêmen e protocolo utilizado para o congelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga	88
4.1.2.	Efeito do jumento sobre a motilidade e o vigor espermáticos no transcorrer do processo de congelamento e descongelamento do sêmen	92
4.1.3.	Efeito do jumento e do tipo de envasamento sobre a motilidade e o vigor espermáticos, observados após o descongelamento do sêmen	94
4.1.4.	Efeito do jumento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento	96
4.1.5.	Efeito do sistema de envasamento do sêmen sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento	97
4.2.	Experimento II: Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento lenta.	97
4.2.1.	Comportamento sexual, características físicas do sêmen e protocolo utilizado para o congelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga	97
4.2.2.	Efeito do jumento sobre a motilidade e vigor espermáticos no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen	100
4.2.3.	Efeito do jumento e do tipo de envasamento sobre a motilidade e vigor espermáticos, avaliados em diferentes períodos após o descongelamento do sêmen (0, 60 e 120 minutos)	102
4.2.4.	Efeito do jumento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento	105
4.2.5.	Efeito do sistema de envasamento do sêmen sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento	106
4.3.	Experimento III: Sincronização, indução da ovulação, local de deposição do sêmen no sistema genital e taxa de gestação de fêmeas equinas inseminadas com sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks e congelado.	106
4.3.1.	Distribuição das éguas segundo o edema uterino no momento da aplicação da Hcg	106
4.3.2.	Distribuição dos jumentos por local de deposição do sêmen no sistema genital das éguas	107
4.3.3.	Distribuição das ovulações das éguas submetidas à aplicação da hCG	107
4.3.4.	Taxa de gestação de éguas inseminadas com sêmen congelado em FlatPacks de jumentos da raça Pêga, depositado no corpo ou no ápice do corno uterino	109
5.	CONCLUSÕES	115
6.	PROPOSTAS FUTURAS	116
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
8.	ANEXOS	140

LISTA DE FIGURAS		
Figura 3.1a	Tronco de contenção, coberto, utilizado para realização das coletas de sêmen e inseminações artificiais.	81
Figura 3.1b	Tronco de contenção, coberto, utilizado para realização das coletas de sêmen e inseminações artificiais.	83
Figura 3.2a	Vagina artificial modelo aberta	83
Figura 3.2b	Lubrificação do interior da vagina artificial com vaselina sólida.	83
Figura 3.3	Copo coletor	83
Figura 3.4a	Coleta fracionada, necessária a sincronia de dois técnicos à sua realização	84
Figura 3.4b	Coleta fracionada, necessária a sincronia de dois técnicos à sua realização	84
Figura 3.5a	Balcão refrigerador horizontal	84
Figura 3.5b	Recipientes com amostras de sêmen pré-diluídas, colocados em béquers de vidro, contendo 500 mL de água à 37°C, no momento em que procedeu-se ao resfriamento, dentro do balcão refrigerador.	84
Figura 3.6	FlatPacks	85
Figura 3.7	Envase do sêmen em FlatPack, utilizando-se uma sonda	85
Figura 3.8	Fechamento do FlatPack, utilizando-se uma seladora elétrica.	85
Figura 3.9	Bandejas utilizadas para o congelamento do sêmen.	85
Figura 3.10	Envase do sêmen em palhetas de 0,55 mL, utilizando-se uma bomba de vácuo.	85
Figura 3.11	Vedação das palhetas com álcool polivinílico.	85
Figura 3.12	Caixa de congelamento	86
Figura 3.13	Pré-congelamento do sêmen. FlatPacks colocados em bandejas metálicas, mantidos à 3 cm de altura da lâmina de nitrogênio líquido	86
Figura 3.14	Congelamento do sêmen. FlatPacks colocados em bandejas metálicas, sendo imersos no nitrogênio líquido.	86
Figura 3.15a	Retirada dos FlatPacks da caixa de congelamento, com o auxílio de pinça metálica.	86
Figura 3.15b	Armazenamento dos FlatPacks em botijão contendo nitrogênio líquido.	86
Figura 3.16	Inseminação artificial de égua, com sêmen asinino descongelado, utilizando-se pipeta rígida para deposição do sêmen no corpo do útero.	86
Figura 3.17a	Imagem ultrassonográfica do útero com ausência de edema uterino intramural	87
Figura 3.17b	Imagem ultrassonográfica do útero com edema uterino intramural grau 1	87
Figura 3.17c	Imagem ultrassonográfica do útero com edema uterino intramural grau 2	87
Figura 3.17d	Imagem ultrassonográfica do útero com edema uterino intramural grau 3	87
Figura 3.18	Controle da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo, em éguas submetidas à aplicação da hCG, quando de um folículo $\geq 3,4$ cm em um dos ovários.	87

LISTA DE TABELAS		
Tabela 2.1	Fertilidade de éguas e/ou jumentas cobertas ou inseminadas com sêmen asinino a fresco, diluído, resfriado ou congelado.	71
Tabela 3.1	Dados meteorológicos médios do período experimental	73
Tabela 3.2	Composição dos diluidores utilizados nos experimentos I(a), I(b) e II.	80
Tabela 4.1	Comportamento sexual, características físicas do sêmen e protocolo utilizado para o congelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga.	89
Tabela 4.2	Análise dos fatores que influenciaram a motilidade espermática do sêmen no transcorrer do processo de congelamento e após o descongelamento.	92
Tabela 4.3	Efeito do jumento sobre a motilidade espermática no transcorrer do processo de congelamento e após o descongelamento do sêmen.	92

Tabela 4.4	Efeito do jumento sobre o vigor espermático no transcorrer do processo de congelamento e após o descongelamento do sêmen.	93
Tabela 4.5	Análise dos fatores que influenciaram a motilidade espermática do sêmen após o descongelamento.	94
Tabela 4.6	Efeito do jumento e do tipo de envasamento do sêmen sobre a motilidade espermática avaliada após o descongelamento do sêmen.	95
Tabela 4.7	Efeito do jumento e do tipo de envasamento do sêmen sobre o vigor espermático, avaliado após o descongelamento do sêmen.	95
Tabela 4.8	Efeito do jumento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento, considerando-se a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3) isoladamente ou quando agrupados (motilidade $\geq 30\%$ e vigor ≥ 3).	96
Tabela 4.9	Efeito do sistema de envasamento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento, considerando-se motilidade ($\geq 30\%$) e vigor (≥ 3) isoladamente ou quando agrupados (motilidade $\geq 30\%$ e vigor ≥ 3).	97
Tabela 4.10	Comportamento sexual, características físicas do sêmen e protocolo utilizado para o congelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga.	98
Tabela 4.11	Análise dos fatores capazes de influenciar a motilidade espermática do sêmen de cinco jumentos, no transcorrer do processo de congelamento e após o descongelamento do sêmen.	100
Tabela 4.12	Efeito do jumento e do momento de avaliação do sêmen, sobre a motilidade espermática no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen.	100
Tabela 4.13	Efeito do jumento e do momento de avaliação do sêmen sobre o vigor espermático no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen.	101
Tabela 4.14	Análise dos fatores capazes de influenciar a motilidade espermática do sêmen de cinco jumentos, submetidos à duas formas de envasamento e avaliado em diferentes momentos, após o descongelamento.	103
Tabela 4.15	Efeito do jumento e do tipo de envasamento sobre a motilidade espermática avaliada após diferentes períodos do descongelamento do sêmen (0, 60 e 120 minutos)	103
Tabela 4.16	Efeito do jumento e do tipo de envasamento sobre o vigor espermático avaliado à diferentes períodos após o descongelamento do sêmen (0, 60 e 120 minutos)	103
Tabela 4.17	Efeito do jumento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento, considerando-se a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3) isoladamente ou quando agrupados (motilidade $\geq 30\%$ e vigor ≥ 3)	105
Tabela 4.18	Efeito do sistema de envasamento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento, considerando-se a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3) isoladamente ou quando agrupados (motilidade $\geq 30\%$ e vigor ≥ 3)	106
Tabela 4.19	Distribuição das éguas segundo o escore de edema uterino, quando da aplicação da hCG	107
Tabela 4.20	Distribuição dos jumentos por local de deposição do sêmen no sistema genital das éguas	107
Tabela 4.21	Distribuição das ovulações de éguas submetidas à aplicação de hCG, quando de um folículo com $3,76 \pm 0,21$ e $3,61 \pm 0,05$ cm em um dos ovários para os tratamentos I e II, respectivamente	108
Tabela 4.22	Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado em FlatPacks de jumentos da raça Pêga, depositado no corpo ou no ápice do corno uterino	109

ANEXOS

8.1	Ficha individual de coletas de sêmen	140
8.2	Ficha de controle reprodutivo individual das éguas	141
8.3.	Análises Estatísticas Referentes ao Experimento I – Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento rápida.	142
8.3.1.	Análises estatísticas referentes à tabela 4.1.	142
Análise 1	Comparação do número de montas para os jumentos, no experimento 1	142
Análise 2	Comparação da motilidade para os jumentos, no experimento 1	142
Análise 3	Comparação do número de espermatozoides/mL, para os jumentos, no experimento 1	142
Análise 4	Comparação do número de espermatozoides móveis/mL, para os jumentos, no experimento 1	143
Análise 5	Comparação do volume do diluidor 1, para os jumentos, no experimento 1	143
Análise 6	Comparação do volume do diluidor 2, para os jumentos, no experimento 1	143
Análise 7	Comparação da taxa de diluição, para os jumentos, no experimento 1	144
Análise 8	Comparação da concentração espermática da dose inseminante, para os jumentos, no experimento 1	144
Análise 9	Comparação do tempo coleta pré-diluição, para os jumentos, no experimento 1	144
Análise 10	Comparação do tempo coleta resfriamento, para os jumentos, no experimento 1	145
Análise 11	Comparação do tempo coleta à diluição final, para os jumentos, no experimento 1	145
Análise 12	Comparação do tempo coleta ao resfriamento, para os jumentos, no experimento 1	145
Análise 13	Comparação do tempo coleta ao congelamento, para os jumentos, no experimento 1	146
Análise 14	Comparação do número real de doses, para os jumentos, no experimento 1	146
Análise 15	Comparação do número potencial de doses, para os jumentos, no experimento 1	146
Análise 16	Comparação do número de espermatozoides móveis/ejaculado, para os jumentos, no experimento 1	147
Análise 17	Comparação do volume do ejaculado, para os jumentos, no experimento 1	147
Análise 18	Comparação do número de espermatozoides totais, para os jumentos, no experimento 1	148
Análise 19	Comparação do vigor espermático, para os jumentos, no experimento 1	148
Análise 20	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 3 e 5	148
Análise 21	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 3 e 4	148
Análise 22	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 3	149
Análise 23	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 3	149
Análise 24	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 4 e 5	149
Análise 25	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 5	149
Análise 26	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 5	149
Análise 27	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 4	149
Análise 28	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 4	150
Análise 29	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 2	150
8.3.2.	Análises estatísticas referentes às tabelas 4.3 e 4.4	150
Análise 30	Comparações dos valores de motilidade espermática no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen, para o experimento 1	150
Análise 31	Comparações dos valores de vigor espermático no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen, para o experimento 1	150
Análise 32	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos, para o experimento 1.	151
Análise 33	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos fresco e pré-diluído	151
Análise 34	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos fresco e pós-diluído	151
Análise 35	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e fresco	151
Análise 36	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos pós-diluído e pré-diluído	151
Análise 37	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e pré-diluído	152
Análise 38	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e pós-diluído	152
Análise 39	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos, para o exp.1	152
Análise 40	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos pós-diluído e pré-diluído	152

Análise 41	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos fresco e pré-diluído	152
Análise 42	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e pré-diluído	153
Análise 43	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos fresco e pós-diluído	153
Análise 44	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e pós-diluído	153
Análise 45	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e fresco	153
Análise 46	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos, para o exp.1	153
Análise 47	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos fresco e pré-diluído	154
Análise 48	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos fresco e pós-diluído	154
Análise 49	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos descongelado e fresco	154
Análise 50	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos pós-diluído e pré-diluído	154
Análise 51	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos descongelado e pré-diluído	154
Análise 52	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos descongelado e pós-diluído	155
Análise 53	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos, para o exp.1	155
Análise 54	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos pós-diluído e pré-diluído	155
Análise 55	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos fresco e pré-diluído	155
Análise 56	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e pré-diluído	155
Análise 57	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos fresco e pós-diluído	156
Análise 58	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e pós-diluído	156
Análise 59	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e fresco	156
Análise 60	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos, para o exp.1	156
Análise 61	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos pós-diluído e pré-diluído	156
Análise 62	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos fresco e pré-diluído	157
Análise 63	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e pré-diluído	157
Análise 64	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos fresco e pós-diluído	157
Análise 65	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e pós-diluído	157
Análise 66	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e fresco	157
Análise 67	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre jumentos	158
Análise 68	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 5	158
Análise 69	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 4 e 5	158
Análise 70	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 5	158
Análise 71	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 3 e 5	158
Análise 72	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 4	159
Análise 73	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 2	159
Análise 74	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 3	159
Análise 75	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 4	159
Análise 76	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 3 e 4	159
Análise 77	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 3	160
Análise 78	Comparação do vigor espermático no tempo pré-diluição entre jumentos	160
Análise 79	Comparação do vigor espermático no tempo pós-diluição entre jumentos	160
Análise 80	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre jumentos	160
Análise 81	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 4 e 5	161
Análise 82	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 3 e 4	161
Análise 83	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 4	161
Análise 84	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 4	161
Análise 85	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 3 e 5	161
Análise 86	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 5	162
Análise 87	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 5	162
Análise 88	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 3	162
Análise 89	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 3	162
Análise 90	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 2	162
8.3.3.	Análises estatísticas referentes às tabelas 4.6 e 4.7	163
Análise 91	Compara motilidade e vigor por avaliador ao descongelamento no experimento 1	163
Análise 92	Compara a motilidade entre avaliadores ao descongelamento no experimento 1	163
Análise 93	Comparação do vigor espermático entre os avaliadores, ao descongelamento	163

Análise 94	Comparação da motilidade espermática ao descongelamento	163
Análise 95	Motilidade ao descongelamento por jumento e tipo de envase	163
Análise 96	Motilidade ao descongelamento por jumento	164
Análise 97	Motilidade ao descongelamento por tipo de envase	164
Análise 98	Comparação do vigor espermático ao descongelamento	164
Análise 99	Vigor espermático ao descongelamento por jumento e tipo de envase	164
Análise 100	Vigor espermático ao descongelamento por jumento	164
Análise 101	Vigor espermático ao descongelamento por tipo de envase	164
Análise 102	Comparação do vigor espermático entre os tipos de envase, ao descongelamento	165
Análise 103	Comparação do vigor espermático entre jumentos, ao descongelamento	165
Análise 104	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 3 e 4, ao descongelamento	165
Análise 105	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 4, ao descongelamento	165
Análise 106	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 4 e 5, ao descongelamento	165
Análise 107	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 4, ao descongelamento	166
Análise 108	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 3, ao descongelamento	166
Análise 109	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 3 e 5, ao descongelamento	166
Análise 110	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 3, ao descongelamento	166
Análise 111	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 5, ao descongelamento	166
Análise 112	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 2, ao descongelamento	167
Análise 113	Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 5, ao descongelamento	167
8.3.4.	Análises estatísticas referentes às tabelas 4.8 e 4.9	167
Análise 114	Avaliação dos ejaculados por jumento, segundo a motilidade (>30%), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	167
Análise 115	Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo a motilidade (>30%), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	167
Análise 116	Avaliação dos ejaculados, por jumento, segundo o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	168
Análise 117	Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	168
Análise 118	Avaliação dos ejaculados, por jumento, segundo a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	168
Análise 119	Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	168
8.4.	Análises Estatísticas Referentes ao Experimento II – Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento lenta.	169
8.4.1.	Análises estatísticas referentes à tabela 4.10	169
Análise 120	Comparação do número de montas/ejaculado para os jumentos, no experimento II	169
Análise 121	Comparação da motilidade para os jumentos, no experimento II	169
Análise 122	Comparação do número de espermatozoides/mL, para os jumentos, no experimento II	169
Análise 123	Comparação do número de espermatozoides móveis/mL, para os jumentos, no experimento II	170
Análise 124	Comparação da taxa de diluição, para os jumentos, no experimento II	170
Análise 125	Comparação da concentração espermática da dose inseminante, para os jumentos, no experimento II	170
Análise 126	Comparação do intervalo de tempo da coleta à pré-diluição, para os jumentos, no experimento II	171
Análise 127	Comparação do intervalo de tempo da coleta à diluição final, para os jumentos, no experimento II	171
Análise 128	Comparação do intervalo de tempo da coleta ao congelamento, para os jumentos, no experimento II	171
Análise 129	Comparação do volume do ejaculado, para os jumentos, no experimento II	172
Análise 130	Comparação do número de espermatozoides totais, para os jumentos, no experimento II	172

Análise 131	Comparação do número de espermatozoides móveis por ejaculado, para os jumentos, no experimento II	172
Análise 132	Comparação do número potencial de doses, para os jumentos, no experimento II	173
Análise 133	Comparação do número real de doses produzidas, para os jumentos, no experimento II	173
Análise 134	Comparação do volume de diluidor 1 (D1), para os jumentos, no experimento II	173
Análise 135	Comparação do volume de diluidor 2 (D2), para os jumentos, no experimento II	174
Análise 136	Comparação do intervalo de tempo da coleta ao resfriamento, para os jumentos, no experimento II	174
Análise 137	Comparação do vigor espermático, para os jumentos, no experimento II	175
8.4.2.	Análises estatísticas referentes às tabelas 4.12 e 4.13	175
Análise 138	Comparações dos valores de motilidade e vigor espermáticos, entre os avaliadores, no momento do descongelamento do sêmen	175
Análise 139	Comparações dos valores de motilidade espermática, entre os avaliadores, no momento do descongelamento do sêmen	175
Análise 140	Comparações dos valores de vigor espermático, entre os avaliadores, no momento do descongelamento do sêmen	175
Análise 141	Comparações dos valores de motilidade espermática no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen	176
Análise 142	Valores totais médios de motilidade espermática por jumento, independentemente do tempo	176
Análise 143	Valores totais médios de motilidade espermática por tempo, independentemente do jumento	176
Análise 144	Comparações dos valores de vigor espermático no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen	177
Análise 145	Valores totais médios de vigor espermático por jumento, independentemente do tempo	177
Análise 146	Valores totais médios de vigor espermático por tempo, independentemente do jumento	177
Análise 147	Comparação dos valores de motilidade espermática nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen	178
Análise 148	Comparação dos valores de vigor espermático, do jumento 2, nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen	178
Análise 149	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos fresco e pré-diluído	178
Análise 150	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos pós-diluído e pré-diluído	178
Análise 151	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e pré-diluído	178
Análise 152	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos fresco e pós-diluído	179
Análise 153	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e fresco	179
Análise 154	Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e pós-diluído	179
Análise 155	Comparação dos valores de vigor espermático, do jumento 5, nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen	179
Análise 156	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos fresco e pré-diluído	179
Análise 157	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos fresco e pós-diluído	180
Análise 158	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos descongelado e fresco	180
Análise 159	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos pós-diluído e pré-diluído	180
Análise 160	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos descongelado e pré-diluído	180
Análise 161	Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos descongelado e pós-diluído	180
Análise 162	Comparação dos valores de vigor espermático, do jumento 3, nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen	181
Análise 163	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos fresco e pré-diluído	181
Análise 164	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos pós-diluído e pré-diluído	181
Análise 165	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e pré-diluído	181
Análise 166	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos fresco e pós-diluído	181
Análise 167	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e fresco	182
Análise 168	Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e pós-diluído	182
Análise 169	Comparação dos valores de vigor espermático, do jumento 4, nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen	182

Análise 170	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos fresco e pré-diluído	182
Análise 171	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos fresco e pós-diluído	182
Análise 172	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e fresco	183
Análise 173	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos pós-diluído e pré-diluído	183
Análise 174	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e pré-diluído	183
Análise 175	Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e pós-diluído	183
Análise 176	Comparação dos valores de vigor espermático, do jumento 1, nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen	183
Análise 177	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos pós-diluído e pré-diluído	184
Análise 178	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos fresco e pré-diluído	184
Análise 179	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e pré-diluído	184
Análise 180	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos fresco e pós-diluído	184
Análise 181	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e pós-diluído	184
Análise 182	Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e fresco	184
Análise 183	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre jumentos	185
Análise 184	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 5	185
Análise 185	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 3 e 5	185
Análise 186	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 5	185
Análise 187	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 4	185
Análise 188	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 3 e 4	186
Análise 189	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 4	186
Análise 190	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 3	186
Análise 191	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 2	186
Análise 192	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 3	186
Análise 193	Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 4 e 5	186
Análise 194	Comparação do vigor espermático no tempo pré diluição entre jumentos	187
Análise 195	Comparação do vigor espermático no tempo pós diluição entre jumentos	187
Análise 196	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre jumentos	187
Análise 197	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 3 e 4	187
Análise 198	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 4	187
Análise 199	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 4 e 5	188
Análise 200	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 4	188
Análise 201	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 3	188
Análise 202	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 3 e 5	188
Análise 203	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 3	188
Análise 204	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 5	188
Análise 205	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 2	189
Análise 206	Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 5	189
8.4.3.	Análises estatísticas referentes às tabelas 4.15 e 4.16	189
Análise 207	Compara os valores de motilidade e vigor espermáticos, por avaliador, no momento do descongelamento do sêmen, no experimento II	189
Análise 208	Comparação do vigor espermático entre os avaliadores, ao descongelamento	189
Análise 209	Efeito do tipo de envasamento, do tempo e do jumento sobre a motilidade espermática	189
Análise 210	Efeito do tempo e do jumento sobre a motilidade espermática	189
Análise 211	Comparação do efeito do jumento, do tipo de envasamento e do período de avaliação sobre a motilidade espermática, quando do descongelamento do sêmen	190
Análise 212	Comparação do efeito do jumento, do tipo de envasamento e do período de avaliação sobre o vigor espermático, quando do descongelamento do sêmen	191
Análise 213	Comparação dos efeitos do tipo de envasamento e do período de avaliação, sobre o vigor espermático, por jumento	192
Análise 214	Comparação do efeito do período de avaliação e do tipo de envase sobre o vigor espermático, para o jumento 1	193
Análise 215	Comparação do vigor espermático do jumento 1, nos tempos descongelado e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas	193

Análise 216	Comparação do vigor espermático do jumento 1, nos tempos descongelado e TTR 60, para as amostras envasadas em palhetas	193
Análise 217	Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento, nos dois tipos de envasamento	193
Análise 218	Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento para a amostra envasada em palheta, e TTR 120, para o FlatPack	193
Análise 219	Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento para palheta, e TTR 60, para FlatPack	194
Análise 220	Comparação do vigor espermático do jumento 1, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas	194
Análise 221	Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 120, para palheta.	194
Análise 222	Comparação do vigor espermático do jumento 1, no tempo TTR 120, para os dois tipos de envase	194
Análise 223	Comparação do vigor espermático do jumento 1, no tempo TTR 60, para FlatPack, e TTR 120, para palheta	194
Análise 224	Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 60, para palheta	195
Análise 225	Comparação do vigor espermático do jumento 1, no tempo TTR 120, para FlatPack, e TTR 60, para palheta	195
Análise 226	Comparação do vigor espermático do jumento 1, no tempo TTR 60, nos dois tipos de envasamento	195
Análise 227	Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento e no tempo TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack	195
Análise 228	Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento e no tempo TTR 60, para as amostras envasadas em FlatPack	195
Análise 229	Comparação do vigor espermático do jumento 1, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack	196
Análise 230	Comparação do efeito do período de avaliação e do tipo de envase sobre o vigor espermático, para o jumento 2	196
Análise 231	Comparação do efeito do período de avaliação e do tipo de envase sobre o vigor espermático, para o jumento 3	196
Análise 232	Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento, nos dois tipos de envasamento	196
Análise 233	Comparação do vigor espermático do jumento 3, nos tempos descongelado e TTR 60, para as amostras envasadas em palhetas	197
Análise 234	Comparação do vigor espermático do jumento 3, nos tempos descongelado e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas	197
Análise 235	Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento para palheta, e TTR 60, para FlatPack	197
Análise 236	Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento para palheta, e TTR 120, para o FlatPack	197
Análise 237	Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 120, para palheta.	197
Análise 238	Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 60, para palheta	198
Análise 239	Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento e no tempo TTR 60, para as amostras envasadas em FlatPack	198
Análise 240	Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento e no tempo TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack	198
Análise 241	Comparação do vigor espermático do jumento 3, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas	198
Análise 242	Comparação do vigor espermático do jumento 3, no tempo TTR 60, para FlatPack, e TTR 120, para palheta	198
Análise 243	Comparação do vigor espermático do jumento 3, no tempo TTR 120, para os dois tipos de envase	199

Análise 244	Comparação do vigor espermático do jumento 3, no tempo TTR 60, nos dois tipos de envasamento	199
Análise 245	Comparação do vigor espermático do jumento 3, no tempo TTR 120, para FlatPack, e TTR 60, para palheta	199
Análise 246	Comparação do vigor espermático do jumento 3, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack	199
Análise 247	Comparação do efeito do período de avaliação e do tipo de envase sobre o vigor espermático, para o jumento 4	199
Análise 248	Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento, nos dois tipos de envasamento	200
Análise 249	Comparação do vigor espermático do jumento 4, nos tempos descongelado e TTR 60, para as amostras envasadas em palhetas	200
Análise 250	Comparação do vigor espermático do jumento 4, nos tempos descongelado e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas	200
Análise 251	Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento para palheta, e TTR 60, para FlatPack	200
Análise 252	Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento para a amostra envasada em palheta, e TTR 120, para o FlatPack	200
Análise 253	Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 60, para palheta	201
Análise 254	Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 120, para palheta	201
Análise 255	Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento e no tempo TTR 60, para as amostras envasadas em FlatPack	201
Análise 256	Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento e no tempo TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack	201
Análise 257	Comparação do vigor espermático do jumento 4, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas	201
Análise 258	Comparação do vigor espermático do jumento 4, no tempo TTR 60, nos dois tipos de envasamento	202
Análise 259	Comparação do vigor espermático do jumento 4, no tempo TTR 120, para FlatPack, e TTR 60, para palheta	202
Análise 260	Comparação do vigor espermático do jumento 4, no tempo TTR 60, para FlatPack, e TTR 120, para palheta	202
Análise 261	Comparação do vigor espermático do jumento 4, no tempo TTR 120, para os dois tipos de envase	202
Análise 262	Comparação do vigor espermático do jumento 4, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack	202
Análise 263	Comparação do efeito do período de avaliação e do tipo de envase sobre o vigor espermático, para o jumento 5	203
Análise 264	Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento, nos dois tipos de envasamento	203
Análise 265	Comparação do vigor espermático do jumento 5, nos tempos descongelado e TTR 60, para as amostras envasadas em palhetas	203
Análise 266	Comparação do vigor espermático do jumento 5, nos tempos descongelado e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas	203
Análise 267	Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento para palheta, e TTR 60, para FlatPack	203
Análise 268	Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento para a amostra envasada em palheta, e TTR 120, para o FlatPack	204
Análise 269	Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 60, para palheta	204
Análise 270	Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 120, para palheta	204

Análise 271	Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento e no tempo TTR 60, para as amostras envasadas em FlatPack	204
Análise 272	Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento e no tempo TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack	204
Análise 273	Comparação do vigor espermático do jumento 5, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas	205
Análise 274	Comparação do vigor espermático do jumento 5, no tempo TTR 60, nos dois tipos de envasamento	205
Análise 275	Comparação do vigor espermático do jumento 5, no tempo TTR 120, para FlatPack, e TTR 60, para palheta	205
Análise 276	Comparação do vigor espermático do jumento 5, no tempo TTR 60, para FlatPack, e TTR 120, para palheta	205
Análise 277	Comparação do vigor espermático do jumento 5, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack	205
Análise 278	Comparação do vigor espermático do jumento 5, no tempo TTR 120, para os dois tipos de envase	206
Análise 279	Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen	206
Análise 280	Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 4, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen	206
Análise 281	Comparação do vigor espermático entre jumentos 3 e 4, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen	206
Análise 282	Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 4, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen	206
Análise 283	Comparação do vigor espermático entre jumentos 4 e 5, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen	207
Análise 284	Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 3, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen	207
Análise 285	Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 5, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen	207
Análise 286	Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 2, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen	207
Análise 287	Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 3, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen	207
Análise 288	Comparação do vigor espermático entre jumentos 3 e 5, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen	208
Análise 289	Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 5, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen	208
Análise 290	Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em palhetas, no tempo TTR 60	208
Análise 291	Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em palhetas, no tempo TTR 120	208
Análise 292	Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	208
Análise 293	Comparação do vigor espermático entre jumentos 3 e 4, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	209
Análise 294	Comparação do vigor espermático entre jumentos 4 e 5, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	209
Análise 295	Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 4, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	209
Análise 296	Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 4, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	209
Análise 297	Comparação do vigor espermático entre jumentos 3 e 5, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	209
Análise 298	Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 3, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	210

Análise 299	Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 3, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	210
Análise 300	Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 5, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	210
Análise 301	Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 3, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	210
Análise 302	Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 5, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	210
Análise 303	Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 5, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	211
Análise 304	Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 2, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen	211
Análise 305	Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em FlatPacks, no tempo TTR 60	211
Análise 306	Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em FlatPacks, no tempo TTR 120	211
8.4.4.	Análises estatísticas referentes às tabelas 4.17 e 4.18	212
Análise 307	Avaliação dos ejaculados, por jumento, segundo a motilidade (>30%), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	212
Análise 308	Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo a motilidade (>30%), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	212
Análise 309	Avaliação dos ejaculados, por jumento, segundo o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	212
Análise 310	Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	212
Análise 311	Avaliação dos ejaculados, por jumento, segundo a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	213
Análise 312	Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)	213
8.5.	Análises Estatísticas Referentes ao Experimento III: Sincronização, indução da ovulação, inseminação artificial e fertilidade de fêmeas equinas inseminadas com sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks e congelado.	213
8.5.1.	Análises estatísticas referentes à tabela 4.22	213
Análise 313	Valores totais médios das variáveis utilizadas para avaliação das éguas, de acordo com o local de deposição do sêmen	213
Análise 314	Compara a idade das éguas (anos), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	214
Análise 315	Comparação do tamanho do folículo (cm), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	214
Análise 316	Comparação do intervalo de tempo da administração da hCG à 1ª IA (horas), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	214
Análise 317	Comparação do número de espermatozoides por dose inseminante na 1ª IA, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	214
Análise 318	Comparação do intervalo de tempo da administração da hCG à 2ª IA (horas), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	214
Análise 319	Comparação do número de espermatozoides por dose inseminante na 2ª IA, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	214
Análise 320	Comparação do intervalo de tempo da administração da hCG à ovulação (horas), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	214
Análise 321	Comparação do intervalo de tempo entre as duas últimas palpções (horas), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	215
Análise 322	Compara as categorias reprodutivas, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	215
Análise 323	Comparação do grau de edema uterino, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	215

Análise 324	Comparação do grau de edema uterino, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	215
Análise 325	Comparação do momento da última palpação em relação à ovulação, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	215
Análise 326	Compara a distribuição dos jumentos, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen	216

RESUMO

Realizaram-se três experimentos na Fazenda Santa Edwiges, localizada no município de Lagoa Dourada – MG, durante o período de setembro de 2010 a fevereiro de 2011, representando a estação fisiológica de reprodução dos equídeos nesta região. Estes estudos objetivaram: a) Avaliar os parâmetros seminais *in vitro*, da fração rica do sêmen, obtida por coleta fracionada, no transcorrer do processo de resfriamento, congelamento e descongelamento do sêmen (Experimentos I e II); b) Testar a eficiência do sêmen asinino, coletado de forma fracionada, envasado em FlatPacks e congelado, sobre a taxa de gestação de éguas inseminadas (Experimento III); c) Descrever o período entre a indução, pela administração da hCG, e a ocorrência da ovulação nas éguas. Nos experimentos I e II, utilizaram-se cinco jumentos da raça Pêga como doadores de sêmen. Após a coleta, a fração rica do sêmen foi submetida a um protocolo de congelamento, utilizando-se, nos dois experimentos, o diluidor proposto por Nagase e Niwa (1964) modificado, contendo 20% de gema de ovo e 3,5% de glicerol. Após a diluição, submeteu-se o sêmen às duas curvas de resfriamento, pré-congelamento, rápida (Experimento I) ou lenta (Experimento II). Posteriormente, o sêmen foi envasado em FlatPacks (5 mL) ou palhetas de 0,55 mL. Para o congelamento utilizou-se um protocolo preconizado por Martin *et al.* (1979), com modificações. No experimento III, inseminou-se 16 éguas mestiças, submetidas à indução da ovulação pela administração de 1.666 UI de hCG, na presença de um folículo ≥ 34 mm de diâmetro em um dos ovários e edema uterino intramural, sendo o sêmen depositado no corpo do útero (TI) ou no ápice do corno uterino (TII). Observou-se até 71,19% (42/59) de ejaculados aprovados nos experimentos *in vitro* (motilidade $\geq 30\%$; vigor ≥ 3). Entretanto, a taxa de gestação obtida foi de 0%. As características seminais diferiram entre os jumentos, evidenciando a presença de grande variação individual. O percentual de ejaculados aprovados foi influenciado pelo reprodutor, tipo de envasamento e pela curva de resfriamento utilizada, sendo os melhores resultados obtidos para as amostras envasadas em palhetas, quando da utilização de uma curva de resfriamento lenta. A administração de 1.666 UI de hCG foi eficiente para promover a indução da ovulação, sendo que a maioria ocorreu dentro de 30 a 42 horas, após a indução. A remoção do plasma seminal, utilizando a coleta fracionada, associada à utilização de um diluidor contendo 20% de gema de ovo e 3,5% de glicerol, exerceram forte efeito contraceptivo. Tais resultados mostram que, nem sempre, os resultados encontrados *in vitro*, correspondem àqueles encontrados *in vivo*.

Palavras chave: jumento, coleta fracionada, sêmen congelado, taxa de gestação

ABSTRACT

The present study was conducted from September of 2010 to February of 2011, in Lagoa Dourada, Minas Gerais, the southwest region of Brazil. The objectives of this study were evaluate a) *in vitro characteristics* of the sperm-rich fraction of jackass semen, using fractional collection of semen carried out by the split-ejaculate method throughout of cooling, freezing and thawing process (Experiments I and II – EI and EII), b) pregnancy rates of the mares inseminated with frozen jackass semen packed in FlatPacks (EIII), c) time interval between the use of hCG and ovulation in mares. In EI and EII the sperm-rich fraction of five Pêga jackasses was frozen using modified Nagase e Niwa (1964) extender, with 20% of egg yolk and 3.5% of glycerol. After dilution two cooling rates were used: a fast one in EI and a slow one in EII and semen was packed in FlatPacks (05 mL) or in straws (0.55 mL). A modified protocol by Martin *et al.* (1979) was used for freezing. In EIII 16 mares received hCG (1.666 UI) to induce ovulation when they had a follicle with ≥ 3.4 cm of diameter and uterine edema. The inseminations were carried out in the uterine body (T1) or in the tip of the uterine horn (T2). Overall 71.19% of the post-thaw semen was approved on *in vitro* experiments (motility $\geq 30\%$; vigor ≥ 3), but the pregnancy rates/cycle were 0%. The jackasses used were different about seminal characteristics, with huge individual variation. The approved post-thaw semen was affected by jackasses, cooling rates and kind of package, with best results for semen processed in a slow cooling rate and packed in straws. hCG (1.666 UI) was efficient to induce ovulation in a time interval of 30-42 hours pos-induction. The seminal plasma removal, using split-ejaculate method, associated with 20% of egg yolk and 3.5% of glycerol extender had a contraceptive effect. The results showed that *in vitro* results do not always reflect the *in vivo* results.

Keywords: jackass, split-ejaculate method, frozen semen, pregnancy rates

1. INTRODUÇÃO

A equideocultura exerce um importante papel sócio-econômico no Brasil, como no mundo. Assim, a população mundial de equídeos está estimada em 113.473.522 de cabeças, sendo 58.770.171 equinos, 43.496.677 asininos e 11.206.674 muares (FAO, 2008). O rebanho brasileiro é composto por 7.986.023 animais, sendo que os equinos contribuem com 5.541.702 de cabeças, os asininos com 1.130.795 e os muares com 1.313.526 de cabeças. A população nacional de equinos é a quarta maior do mundo e tem se mantido estável na última década (IBGE, 2008). Já o complexo do agronegócio equino no Brasil movimenta cerca de R\$ 7,5 bilhões, gerando em torno de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (Almeida e Silva, 2010).

A potencialização do crescimento da equideocultura mundial tem se dado pela utilização das biotecnologias da reprodução. Dentre elas, a inseminação artificial é a de maior efeito na produção equídea (Canisso, 2008). Outra biotecnologia de fundamental importância é a criopreservação do sêmen, sendo que as metodologias utilizadas no processo de congelamento do sêmen de asininos não diferem daquelas desenvolvidas para utilização em garanhões (Canisso *et al.*, 2008). Porém, essa conduta não é a mais adequada, pois apesar de o sêmen asinino possuir várias características similares às dos equinos, cada espécie apresenta algumas particularidades importantes (Nishikawa, 1959; Henry *et al.*, 2009).

Têm sido apresentadas como vantagens da criopreservação do sêmen dos equídeos: a capacidade de expansão da utilização do sêmen de reprodutores de alto mérito genético para a inseminação de jumentas, assim como para a inseminação de éguas visando a produção de muares de trabalho ou de marcha para exposições, a conservação de material genético de algumas raças ameaçadas de extinção (Canisso, 2008), a utilização do sêmen de animais valiosos, idosos, ou que já vieram a óbito, a prevenção de enfermidades oriundas do trânsito e do contato entre animais, além da facilidade de armazenamento e transporte, ultrapassando as dificuldades geográficas que interferem na reprodução desta espécie (Squires *et al.*, 1998). Entretanto, os altos custos do processo de congelamento assim como as baixas

taxas de gestação resultantes da inseminação artificial com sêmen congelado são citados como pontos negativos da utilização desta técnica (Cottorello, 2002).

O primeiro estudo envolvendo o congelamento de sêmen de asininos foi realizado por Polge e Minotakis (1964), utilizando diluidor a base de gema de ovo e glicerol, seguindo o protocolo utilizado para o congelamento de sêmen bovino. Posteriormente, alguns trabalhos foram realizados por Krause e Grove (1967), Kreuchauf (1984), Piao *et al.* (1988), Trimeche *et al.* (1998) e Alvarez *et al.* (2004). Dentre os trabalhos mais recentes, o realizado por Vidament *et al.* (2005) e Jepsen *et al.* (2010), embora apresentando resultados satisfatórios quanto à motilidade espermática pós-descongelamento, resultaram em baixas taxas de gestação quando utilizado na inseminação de éguas e jumentas.

No Brasil, o primeiro estudo neste sentido teve como autores Vieira *et al.* (1985), trabalhando com o congelamento do sêmen de um jumento da raça Pêga. Já Arruda *et al.* (1986) trabalharam com jumentos da raça Brasileira e cavalos Puro Sangue Árabe. A iniciativa de se comparar diferentes métodos de envase para o congelamento do sêmen asinino se deu com os trabalhos de Silva *et al.* (1997), seguido por Papa *et al.* (2002). Mais recentemente, Oliveira *et al.* (2006) avaliaram diferentes tipos de crioprotetores e Canisso *et al.* (2007), compararam dois tipos de diluidores para o congelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga, obtendo resultados superiores a 50% de gestação em éguas da raça Campolina.

Diante da real necessidade de utilização da inseminação artificial e do congelamento do sêmen equídeo, para o progresso da equideocultura mundial, se faz necessário o desenvolvimento de novos trabalhos neste sentido, visando-se o aperfeiçoamento destas biotecnologias a fim de se obter resultados de fertilidade satisfatórios.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: a) Avaliar a eficiência da fração rica do sêmen, obtida por coleta fracionada e envasada em FlatPack ou palhetas de 0,55 mL, para o congelamento do sêmen asinino, tendo como pontos finais a avaliação dos parâmetros seminais *in vitro*; b) Descrever o intervalo de

tempo entre a indução da ovulação, pela administração da hCG, e a ocorrência da mesma; c) Testar a eficiência do sêmen asinino coletado de forma fracionada, envasado em FlatPack e congelado, sobre a taxa de gestação de éguas inseminadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fatores a serem considerados no processo de congelamento e utilização do sêmen congelado de asininos

Em virtude de pertencerem à mesma família “Equidae”, os equinos e os asininos são tidos como similares do ponto de vista social e reprodutivo, recebendo erroneamente o mesmo tipo de manejo e condutas relacionadas à reprodução. Entretanto, os asininos apresentam algumas características comportamentais e seminais peculiares, as quais devem ser levadas em consideração quando se deseja organizar o manejo reprodutivo e o processamento do sêmen destes animais (Nishikawa, 1959; Henry *et al.*, 2009).

É nítida a escassez de trabalhos referentes ao processamento e à utilização do sêmen asinino. Além disso, grande parte dos existentes baseia-se apenas na avaliação *in vitro* dos parâmetros seminais, extrapolando os resultados assim obtidos como os possíveis de serem alcançados quando de inseminações de éguas ou jumentas (Nishikawa, 1959) ou ainda, são conduzidos sem um delineamento experimental adequado, utilizando-se apenas um pequeno número de éguas inseminadas com o sêmen congelado (Canisso, 2008). Vidament (2005), analisando os resultados obtidos durante 20 anos de congelamento de sêmen na França, concluiu que para a determinação confiável da taxa de gestação utilizando-se sêmen congelado, é necessária a utilização de 100 ciclos de éguas ou jumentas por tratamento.

Desta forma, torna-se importante o conhecimento das peculiaridades dos asininos para descrever as técnicas mais adequadas ao processamento do sêmen destes animais, visando alcançar altos índices de eficiência reprodutiva, não observados quando apenas se extrapola as técnicas utilizadas em outras espécies, sem respeitar as diferenças inerentes à espécie em questão.

2.1.1. Fatores inerentes ao reprodutor e ao sêmen

2.1.1.1. Individualidade do reprodutor

O reprodutor é uma importante fonte de variação que deve ser levada em consideração ao se analisar dados que envolvam a fertilidade (Palhares, 1997). Porém, vários autores tendem a considerar a fêmea como o principal fator relacionado aos baixos índices de fertilidade, prejudicando uma avaliação mais detalhada do macho (Pimentel, 1989). O fato de não haver seleção para fertilidade na espécie equina está altamente correlacionado aos baixos índices de fertilidade observados nestes animais (Merk, 1986; Hughes, 1991).

Tem sido descritas como restrições à criopreservação do sêmen de equinos, a falta de homogeneidade da qualidade do sêmen dos reprodutores, no que se refere à avaliação dos parâmetros de motilidade total e progressiva; a concentração e morfologia espermáticas; a viabilidade *in vitro*; o tempo necessário para a capacitação, bem como o tempo no qual os espermatozoides permanecem viáveis no sistema genital da fêmea. Essas variações também são observadas entre os ejaculados de um mesmo indivíduo, tendo estes fatores uma influência significativa sobre as taxas de gestação em éguas (Amann *et al.*, 1987; Silva Filho, 1994).

A concentração espermática, juntamente com a percentagem de espermatozoides que apresenta morfologia e motilidade espermática normais, compõem os parâmetros seminais que mais influenciam as taxas de gestação. Sendo assim, a determinação destes parâmetros é de fundamental importância ao se realizar a análise da qualidade de um ejaculado (Kenney *et al.*, 1983). Alterações da morfologia espermática apresentam grande variação entre os indivíduos durante o período reprodutivo, influenciando a determinação da eficiência reprodutiva do garanhão (Hellander *et al.*, 1991; Hammes *et al.*, 1996). Outro fator que apresenta variação entre indivíduos é a capacidade de formação do reservatório espermático na tuba uterina de éguas, sendo que os reprodutores que possuem fertilidade superior apresentam maior número de espermatozoides móveis na tuba uterina, após a inseminação, do que aqueles considerados subférteis (Scott *et al.*, 1995). A susceptibilidade

ao estresse oxidativo também é variável entre indivíduos e ejaculados. Consequentemente, a incidência e a severidade do dano oxidativo também variam (Maia e Bicudo, 2009).

Variações individuais e entre ejaculados de um mesmo reprodutor também são observadas em asininos, no que diz respeito aos parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermáticos, podendo estas influenciar os resultados de prenhez obtidos com o seu uso (Mann, *et al.*, 1963; Ferreira, 1993; Santos, 1994; Rossi, 2008; Contri *et al.*, 2010).

A presença da fração gelatinosa no ejaculado ocorre em menor frequência no jumento que no garanhão e, quando presente, encontra-se em menor volume nos jumentos (Kreuchauf, 1984; Henry *et al.*, 1987; Mello *et al.*, 2000; Dalmau, 2003). Esta característica possui grande variação entre os indivíduos, sendo que diversos fatores podem estar envolvidos, valendo salientar a idade do animal (Lambert e Mckenzie, 1940), a época do ano em que foram realizadas as coletas (Nishikawa, 1959) e a frequência de coleta do sêmen (Berliner *et al.*, 1938). Existe ainda uma relação entre a duração da cobrição e o volume da fração gelatinosa, ou seja, quanto mais longa for a cobrição, maior será o volume de gel encontrado (Canisso *et al.*, 2010).

De um modo geral, apenas 50% das células espermáticas permanecem viáveis após o processo de criopreservação, quando se baseia em parâmetros de motilidade e integridade da membrana para determinar essa viabilidade (Curry, 2000). Tischner (1979) avaliou o comportamento do sêmen de 36 garanhões frente ao processo de congelamento e estabeleceu a seguinte classificação, considerando-se os parâmetros seminais: sêmen bom - presença de espermatozoides com índice satisfatório, resultado alcançado por apenas 20% dos reprodutores; sêmen razoável/suficiente - resultados correspondentes a 60% dos reprodutores; sêmen pobre/insuficiente - resultados obtidos por 20% dos garanhões. Assim, de acordo com o autor, parece haver uma congelabilidade específica para cada indivíduo, que não sofre influência da estação do ano. Além disso, os valores de motilidade espermática pós-descongelamento não dependem totalmente dos valores encontrados antes do processo de congelamento.

Pickett e Amann (1993) também estudaram a congelabilidade do sêmen de garanhões e observaram a seguinte classificação dos reprodutores: animais de boa congelabilidade, atingida por 25% a 30% dos indivíduos; de moderada congelabilidade, obtida por 30% a 50% dos indivíduos e os apresentando baixa congelabilidade, que responderam por 25% a 40% da população estudada.

Em estudo conduzido por Miró *et al.* (2003), observou-se que a viabilidade espermática do sêmen de asininos, após o processo de congelamento e descongelamento, variou de 23% a 60%, sendo notável a variação entre os indivíduos. A ausência de bons resultados neste sentido é uma das razões pelo qual o congelamento do sêmen não vem sendo amplamente utilizado em equídeos (Curry, 2000).

2.1.1.2. Biologia da célula espermática dos asininos

O espermatozoide é uma célula alongada que se divide em cabeça e cauda, sendo completamente envolvido pela membrana plasmática. A cabeça contém o núcleo espermático, formado por uma cromatina altamente condensada, tendo o DNA e as proteínas como os seus principais componentes. As proteínas, chamadas de histonas espermáticas, são responsáveis pela estabilidade do DNA nuclear, sendo esta obtida pela conjugação entre eles via ligações sulfidrílicas. Também na cabeça encontra-se o acrossoma, estrutura formada por uma dupla camada de membranas, localizada entre a porção anterior do núcleo e a membrana plasmática (Garner e Hafez, 2004). Ele possui enzimas hidrolíticas que participam do processo de fertilização e se trata de uma estrutura bastante susceptível às lesões provocadas pelo choque térmico (Watson, 1981).

A cauda do espermatozoide é dividida em colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal (Garner e Hafez, 2004). O colo é o segmento da cauda que se conecta à cabeça do espermatozoide. A peça intermediária contém várias mitocôndrias que são responsáveis pela produção da energia necessária à motilidade da célula. Essas mitocôndrias localizam-se ao redor do axonema, composto por dois filamentos

centrais envolvidos por nove pares de microtúbulos. O axonema compreende a parte central da peça intermediária, estando presente em todo o comprimento da cauda, sendo o elemento propulsor do espermatozoide. A peça principal é o segmento mais extenso da cauda (Amann e Graham, 1993), sendo composta pelo axonema em sua porção central e por uma membrana fibrosa que confere estabilidade aos elementos contráteis da cauda. Já a peça terminal é constituída apenas pelo axonema recoberto pela membrana plasmática (Garner e Hafez, 2004).

A cabeça do espermatozoide asinino é maior e mais arredondada que a do equino (Nishikawa, 1959; Mann *et al.*, 1963). Além disso, observa-se uma maior ocorrência de inserção abaxial da peça intermediária nos espermatozoides de jumentos em relação aos de garanhões (El Wishy, 1975). Porém, em trabalho realizado por Launay (1990), não foram observadas diferenças na estrutura dos espermatozoides quando comparou-se a espécie equina com a asinina, da raça Poitou.

A célula espermática é revestida externamente pela membrana plasmática, composta por uma bicamada lipídica, contendo fosfolipídeos, glicolipídeos, colesterol e proteínas (Alberts *et al.*, 2004). Estas proteínas são classificadas como integrais ou periféricas, sendo as integrais retiradas da membrana apenas pela ação de detergentes ou solventes, enquanto as periféricas podem ser removidas facilmente, uma vez que são solúveis nos diluidores de sêmen ou na água (Watson, 1981). A membrana plasmática possui uma conformação conhecida como modelo “mosaico fluido”, sendo a extremidade hidrofílica dos fosfolipídeos localizada externamente, com a cadeia de ácidos graxos prolongando-se para o interior da membrana. Esta conformação faz com que a cadeia de ácidos graxos forme uma barreira hidrofóbica, permitindo a passagem da água e de moléculas nela dissolvidas apenas com grande dificuldade (Amann e Pickett, 1987; Davies Morel, 1999).

As proteínas encontram-se entremeadas aos componentes lipídicos da membrana plasmática e são responsáveis por mediar o transporte de moléculas através desta. Este posicionamento das proteínas permite uma conexão entre membrana plasmática e estruturas tais como o citoesqueleto, a matrix extracelular ou uma célula adjacente.

Outras proteínas por sua vez, exercem função de receptores, realizando a detecção e tradução de sinais químicos do ambiente celular (Alberts *et al.*, 2004). Por ser impermeável à grande maioria das moléculas e metabolicamente ativa, a membrana plasmática exerce a função de isolar a célula espermática do meio exterior e regular as reações entre célula e meio, controlando o fluxo de água e eletrólitos (Cooper, 1996). À temperatura corporal, a membrana plasmática é fluida, devido à natureza dos fosfolipídeos. A fluidez e a flexibilidade da membrana podem ser afetadas por diversos fatores, sendo a temperatura o fator mais significativo (Amann e Pickett, 1987). A distribuição e as interações entre lipídeos e as proteínas da membrana plasmática são complexas e ocorrem de maneira diferente nos diversos segmentos que a compõem, caracterizando assim os domínios de membrana. Desta forma, é possível que a resistência ao processo de congelamento seja diferente entre os diversos segmentos do espermatozoide. A manutenção dos domínios de membrana é de extrema importância para a preservação das funções espermáticas, estando eles envolvidos nos processos de capacitação, reação acrossômica e fecundação (Parks e Graham, 1992).

Alterações na conformação da membrana plasmática podem levar a uma organização anormal dos fosfolipídeos e das proteínas, de forma a permitir a passagem de moléculas através de sua estrutura, de maneira rápida, fugindo às condições normais. Estas alterações podem ser provocadas pelo processo de resfriamento do sêmen e são totalmente indesejáveis (Amann e Pickett, 1987).

2.1.1.3. Características do plasma seminal de equídeos

A porção fluida do ejaculado, na qual os espermatozoides estão presentes, é conhecida como plasma seminal (Garner e Hafez, 2004). Ele é constituído de uma mistura de fluidos secretados do testículo, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, estando envolvido em um grande número de funções espermáticas e eventos que precedem a fertilização (Kareskoski e Katila, 2008).

Estudos comprovam que no plasma seminal existem substâncias moduladoras da resposta inflamatória uterina pós-cobertura, que auxiliam na limpeza uterina de éguas susceptíveis à endometrite pós-cobertura (Troedsson, 1999). Além disso, o plasma seminal contém ocitocina e prostaglandinas, que promovem a contração uterina, visando o transporte dos gametas masculinos até o local da fertilização (Katila, 2001). Observa-se também a presença de substâncias antioxidantes capazes de minimizar os efeitos da peroxidação lipídica, tais como a cisteína, ergotioneína e glutatona peroxidase (Amann e Graham, 1993).

Apesar do importante papel do plasma seminal no transporte e fisiologia do gameta masculino, este parece não ser o meio ideal para a preservação dos espermatozoides, já que sua presença em grandes proporções provoca uma redução da motilidade espermática, quando de um longo período de estocagem do sêmen sob refrigeração. No entanto, pequenas quantidades melhoram a sobrevivência das células espermáticas (Squires *et al.*, 1999). Os efeitos deletérios do plasma seminal podem ser reduzidos ao realizar-se a coleta e diluição somente da fração do ejaculado rica em espermatozoides, ou pelo uso de altas taxas de diluição do sêmen.

A concentração média de proteínas encontradas no plasma seminal de equinos, segundo Töpfer-Petersen *et al.* (2005) e Ribas (2006), encontra-se por volta de 10 mg/mL. Com relação à composição das frações do ejaculado, Fonseca (2006) encontrou uma concentração de proteínas de 17mg/mL na fração rica e 14,5mg/mL na fração pós-espermática. O autor não encontrou diferenças quanto à composição iônica das frações.

Muitos estudos têm focado na identificação e caracterização bioquímica das proteínas do plasma seminal, embora pouco se saiba, até o momento, sobre a sua origem e suas funções específicas. Apesar disto foram caracterizadas oito proteínas do plasma seminal do garanhão (HSP-1 a HSP-8), com baixo peso molecular (14 a 30 kDa). Todas essas proteínas, com exceção da HSP-4, se ligam à superfície espermática no momento da ejaculação. A maior parte das proteínas do plasma seminal do garanhão, compreendendo de 70 a 80% do total de

proteínas, são HSP-1 e HSP-2 (Calvete *et al.*, 1994).

Nos garanhões, a ejaculação ocorre em forma de jatos, variando em número de 04 a 13, com um valor médio de 08 jatos por ejaculado (Tischner e Kosiniak, 1992). No trabalho realizado por Kosiniak (1975), foram observados de 06 a 09 jatos consecutivos, sendo que a composição de cada um deles foi variável, com aproximadamente 70% dos espermatozoides observados no ejaculado total, presentes nos três primeiros jatos. Tischner *et al.* (1974) coletaram cada jato de sêmen em um tubo coletor, permitindo assim a avaliação individual de cada jato. Eles descreveram que 80% do total de espermatozoides ejaculados encontravam-se nos três primeiros jatos. Assim, o primeiro jato continha 40%, o segundo 25% e o terceiro 15% do número de espermatozoides presentes no ejaculado total. Posteriormente, Magistrini (2000) descreveu a presença de 05 a 08 jatos durante a ejaculação, observando também uma variação na composição de cada um deles.

O ejaculado dos equídeos é composto pela fração pré-espermática, fração rica em espermatozoides e pela fração gelatinosa (Nishikawa, 1959; Mann *et al.*, 1963; Kreuchauf, 1984; Davies Morel, 1999). A fração pré-espermática contém as secreções oriundas das glândulas bulbouretrais que são as primeiras a serem liberadas no momento da ejaculação. Na fração rica em espermatozoides estão presentes as secreções oriundas do epidídimo e das ampolas, sendo esta a fração intermediária do ejaculado. Constituindo a fração gelatinosa, ou seja, a última fração do ejaculado, apresentam-se as secreções advindas das glândulas vesiculares (Kreuchauf, 1984).

A concentração total de proteínas é menor na fração pré-espermática e maior na primeira fração do ejaculado (Koskinen *et al.*, 2002). Quando as proteínas foram isoladas e identificadas no ejaculado fracionado, a maior parte das proteínas do plasma seminal foram HSP-1, HSP-2 e HSP-4 e estavam presentes nas três frações estudadas, com quantidades variando significativamente entre os garanhões. Diferenças foram observadas entre as frações, quanto à quantidade de HSP-2, sendo que as maiores concentrações foram encontradas na fração rica em espermatozoides (Kareskoski *et al.*, 2005).

A proteína HSP-7 é homóloga à espermaesina suína AWN, e pode estar envolvida na interação espermatozoide-zona pelúcida (revisado por Töpfer-Petersen *et al.*, 2005). Nos ganhões, ela é sintetizada nos testículos, ductos epididimários e glândula vesicular (Hoshiba e Sinowatz, 1998).

Pesch *et al.* (2006) determinaram as concentrações de diversas enzimas e avaliaram a sua correlação com as variáveis analisadas quando da avaliação do sêmen equino. A lactato desidrogenase (LDH) mostrou-se como um importante fator, atuando na função e metabolismo espermáticos, já que se correlacionou fortemente com o volume de sêmen, com a concentração espermática, com o percentual de espermatozoides vivos e mortos e com a patomorfologia.

As concentrações de fosfatase alcalina (FA) e fosfatase ácida (FAC), de aspartato aminotransferase (AAT) e de γ -glutamyltransferase (GGT) foram negativamente correlacionadas com o volume de sêmen, embora positivamente correlacionadas com a concentração espermática, o que poderia indicar a sua origem testicular ou epididimária. As concentrações de GGT e LDH também foram correlacionadas com a motilidade espermática total e progressiva. A atividade da AAT e o conteúdo proteico total do plasma seminal mostraram-se correlacionados com a congelabilidade do sêmen equino (Bittmar e Kosiniak, 1992).

Na fração rica do ejaculado, encontraram-se altas concentrações de β -glucuronidase (BG), o que pode indicar uma possível origem testicular ou epididimária dessa enzima (Kareskoski *et al.*, 2006). Juntamente com outras enzimas, a BG do acrossoma participa da dispersão das células do cumulus (Rethinaswamy *et al.*, 1994).

As quantidades de eletrólitos e de elementos traços variam entre as diferentes frações do plasma seminal, existindo diferenças entre ganhões quanto à concentração de alguns desses componentes. Assim, as concentrações de cálcio, fosfato inorgânico e magnésio são maiores na fração rica do ejaculado (Kareskoski *et al.*, 2005). No ganhão, aproximadamente 60-75% do cálcio total encontrado no plasma seminal é ionizado, sendo a sua concentração positivamente correlacionada com o volume do

ejaculado, o que indica serem as glândulas sexuais acessórias as principais contribuidoras com o cálcio no plasma seminal (Kareskoski e Katila, 2008).

As concentrações de ferro, zinco e cobre foram negativamente correlacionadas com o volume de sêmen, sendo que as concentrações de ferro e zinco foram também correlacionadas à concentração espermática. As concentrações de ferro e cobre variaram entre amostras normais e nas apresentando decréscimo da qualidade espermática (Pesch, 2006).

Frações contendo fluido pré-espermático apresentam maiores concentrações de cloro e sódio (Kareskoski *et al.*, 2005), o que poderia afetar a sobrevivência espermática durante o armazenamento (Padilla e Foote, 1991; Kareskoski *et al.*, 2006). Incluir o fluido pré-espermático nas doses inseminantes deveria ser evitado, uma vez que não beneficia a motilidade espermática durante o armazenamento e não contribui para a concentração espermática do ejaculado (Katila *et al.*, 1994).

A composição do plasma seminal dos equinos não é a mesma nos diferentes jatos do ejaculado (Magistrini, 2000). Portanto, a longevidade espermática durante o resfriamento pode variar nas diferentes frações do ejaculado.

A interação entre a membrana plasmática do espermatozoide e os componentes específicos do plasma seminal parece interferir na sua susceptibilidade aos prejuízos causados pelo estresse térmico (Aurich, 2005). Os resultados de Kankofer *et al.* (2005) sugerem que para uma maior atividade de algumas enzimas antioxidantes, certa quantidade de plasma seminal deve ser mantida no ejaculado, no momento da sua diluição. Variações individuais na composição do plasma seminal podem exercer influência na motilidade espermática pós-resfriamento (Amann e Pickett, 1987; Brinsko *et al.*, 2000; Akcay *et al.*, 2006).

Nishikawa (1975) sugere a remoção do plasma seminal antes do congelamento, visando-se a manutenção da motilidade pós-descongelamento. Relaciona, ainda, o efeito negativo do plasma seminal à alta concentração de cloreto de sódio encontrada no mesmo. Dentro do mesmo contexto, Kaya *et al.* (2002) observaram uma

correlação negativa entre motilidade e viabilidade espermáticas com as concentrações de sódio e potássio do ejaculado.

Varner *et al.*, (1987) mostraram que a fração rica manteve uma motilidade superior ao restante do ejaculado, quando armazenada à 25°C por 12 a 24 horas. Estudo mais recente sugeriu que pode haver diferenças na congelabilidade, mensuradas pela motilidade, entre sucessivas frações do ejaculado equino (Katila *et al.*, 2002).

Ribas (2006), trabalhando com sêmen equino, observou uma correlação positiva entre a concentração de proteínas totais do plasma seminal com a motilidade, o vigor, o teste hiposmótico e a percentagem de espermatozoides vivos. Segundo Maxwell e Johnson (1999), existe uma concentração mínima de proteínas que deve estar presente no plasma seminal para que possam ser adsorvidas na membrana plasmática e possam reverter as lesões provocadas pelo estresse térmico durante o congelamento.

Moore *et al.* (2005b) verificaram que, embora a exposição do sêmen por 15 minutos à concentrações de plasma seminal, variando de 0 a 80% antes da criopreservação, não tenham afetado a motilidade total, progressiva e a integridade da membrana plasmática, uma incubação por duas a seis horas com 20% de plasma seminal foi deletéria à viabilidade espermática, quando comparada à preservação com 5% de plasma.

Tem sido observado que a ausência de plasma seminal, no sêmen equino diluído em meio à base de leite, reduziu significativamente a motilidade espermática quando refrigerado por 24 horas (Jasko *et al.*, 1992). Entretanto, Love *et al.* (2005) observaram melhor preservação da motilidade espermática e da integridade do DNA, na ausência de plasma seminal, quando o ejaculado foi diluído e refrigerado por 48 horas.

A adição de plasma seminal de garanhões apresentando boa congelabilidade, ao sêmen de garanhões com baixa motilidade espermática pós-descongelamento, aumentou significativamente a motilidade progressiva do segundo grupo. A integridade de membrana foi melhor preservada e, além disso, a adição de plasma seminal de garanhões de baixa

congelabilidade diminuiu a motilidade progressiva do sêmen dos garanhões com boa motilidade pós-descongelamento (Aurich *et al.*, 1996).

No que se refere às proteínas do plasma seminal de equinos, tem sido observado que a sua adição, notadamente das com massa molecular superior a 10 kDa, concentradas dez vezes, ao diluidor de congelamento, melhorou as características espermáticas pós-descongelamento. Por outro lado, o congelamento com proteínas de massa molecular inferior a 10 kDa teve efeito prejudicial à motilidade e integridade acrossômica (Fagundes, 2003). Já Barreto (2007) observou que a adição de proteínas do plasma seminal ao diluidor de congelamento teve um efeito negativo sobre as motilidades total e progressiva, dependendo da dose incorporada. No entanto, no experimento realizado por Fagundes (2003), utilizou-se plasma seminal oriundo do mesmo garanhão (plasma autólogo), diferentemente da metodologia utilizada no trabalho de Barreto (2007), quando um “pool” de plasma seminal, oriundo dos cinco garanhões estudados foi utilizado para a concentração das proteínas.

A célula espermática é capaz de gerar e degradar as espécies de oxigênio reativas (ROS), as quais, em pequenas quantidades, são necessárias para o funcionamento normal da célula. Também é conhecida a susceptibilidade dos espermatozoides de mamíferos aos efeitos citotóxicos das ROS e ao estresse oxidativo. A geração excessiva de ROS pode transpor a capacidade de defesa antioxidante do sistema intracelular dos espermatozoides, que é fraco, devido à escassez de citoplasma, tornando-o susceptível ao estresse oxidativo. O plasma seminal é rico em antioxidantes e oferece proteção aos espermatozoides, compensando a sua baixa disponibilidade de enzimas que exercem esta função (Maia e Bicudo, 2009). Os redutores de ROS, presentes no plasma seminal, são: o ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, superóxido dismutase (SOD), glutatona e outros tios, taurina, hipotaurina e vitamina E (Zini *et al.*, 2000).

Os componentes do plasma seminal responsáveis pelos bons resultados de congelabilidade do sêmen permanecem desconhecidos, sendo que as diferenças individuais no conteúdo destas

substâncias estabilizadoras no plasma seminal podem explicar os diferentes índices de resistência ao congelamento, observados entre garanhões (Aurich *et al.*, 1996).

Os estudos disponíveis acerca dos efeitos do conteúdo do plasma seminal sobre os espermatozoides são dispersos e muitas vezes conflitantes, o que pode ser visto como um importante motivador para mais pesquisas na área (Kareskoski e Katila, 2008).

2.1.1.4. Princípios da criopreservação

A utilização da inseminação artificial pode ser maximizada se os espermatozoides forem congelados, uma vez que se trata da melhor alternativa para a troca/distribuição de material genético de alta qualidade, à longas distâncias (Roca *et al.*, 2006). O armazenamento à temperaturas entre 15° e 18°C não interrompe completamente o metabolismo dos espermatozoides e não impede a multiplicação bacteriana, o que reduz o tempo de armazenamento do sêmen. Teoricamente, quanto mais baixa a temperatura de armazenamento, menor seria o metabolismo espermático e maior poderia ser o tempo de estocagem do sêmen (Weitze, 1987). No entanto, vários fatores impedem o avanço da utilização do sêmen equino congelado. Dentre eles, a baixa qualidade espermática pós-descongelamento tem sido um fator de grande relevância. Além disso, trata-se de um processo longo e trabalhoso, o que torna inviável o seu uso na rotina de algumas propriedades (Saravia *et al.*, 2005).

O uso do sêmen congelado na indústria equina tem apresentado várias vantagens, notadamente a redução dos gastos e do estresse relacionados ao transporte da égua e/ou do potro. Além disso, esta técnica viabiliza a utilização do reprodutor em momentos nos quais não seria possível a monta natural ou a utilização do sêmen a fresco ou resfriado, como no caso da participação do animal em atividades esportivas. Destaca-se, ainda, a sua utilização quando o garanhão está inapto à reprodução ou mesmo quando vem a óbito (Melo, 2005).

Para sobreviverem ao processo de criopreservação, os espermatozoides necessitam de nutrientes, proteção físico-química e uma

curva de congelamento adequada (Arruda, 2000). Além disso, eles precisam ser férteis, sendo assim necessária a manutenção de algumas características, tais como da morfologia adequada, metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, estabilidade das membranas plasmática e acrossômica, bem como a presença de enzimas necessárias à fertilização (Squires *et al.*, 1999).

Durante o processo de criopreservação, o sêmen deve ser resfriado, passando da temperatura corporal à temperatura ambiente, ou seja, de 37°C para 20°C, sem que ocorram lesões nos espermatozoides quando estes se encontram diluídos em diluidor adequado (Moran *et al.*, 1992). Isto ocorre devido à fase de transição, quando a membrana plasmática passa do seu estado líquido cristalino para o estado de gel. Para diminuir este efeito, se faz necessário o controle da taxa de resfriamento, no momento em que a temperatura reduz de 19° para 8° C, que deve ser feito pela adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluidor, além do uso de curvas de resfriamento lentas (-0,05°C/min) (Graham, 1996).

Uma vez realizado de maneira inadequada, o processo de resfriamento promove a ocorrência de um fenômeno conhecido como choque pelo frio (“cold shock”), responsável por induzir danos irreversíveis aos espermatozoides, representados por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou retrógrado), perda rápida de motilidade, queda do metabolismo, além de danos nas membranas plasmática e acrossômica (Graham, 1996; Squires *et al.*, 1999).

Durante o processo de congelamento do sêmen ocorrem vários processos físico-químicos que mantêm a integridade, viabilidade e fertilidade espermáticas. Este processo envolve os seguintes eventos: redução da temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento (Medeiros *et al.*, 2002). Tais eventos podem promover danos celulares devido à mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações nas membranas dos espermatozoides, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade exercida pelos crioprotetores (Ball e Vo, 2001).

Uma vez que o congelamento seja realizado de maneira lenta, o descongelamento também deve ocorrer da mesma forma, permitindo a fusão dos cristais de gelo extracelulares. O descongelamento destes cristais provoca a diluição dos solutos, seguida da reidratação celular que ocorre lentamente. Se o sêmen for descongelado de maneira rápida, os cristais extracelulares descongelam-se também em alta velocidade, permitindo a passagem de água do meio para o interior das células rapidamente, provocando o inorgitamento e danos à membrana plasmática (Amman e Pickett, 1987; Holt, 2000). Entretanto, quando o processo de congelamento for realizado de maneira rápida, os espermatozoides poderão não ter passado, ainda, pela desidratação. Assim, à medida que o gelo extracelular derreter, não haverá passagem rápida de água através da membrana para o interior da célula (Amman e Pickett, 1987). O sêmen congelado de forma rápida deve ser descongelado da mesma maneira, impedindo que o gelo intracelular que se formou durante o congelamento não se recrystalize (Amman e Pickett, 1987; Watson, 1995).

Os principais danos sofridos pela célula no processo de criopreservação ocorrem durante o resfriamento e o descongelamento (Furst, 2006). Sendo assim, para se obter resultados satisfatórios pós-descongelamento, é necessário que haja uma perfeita interação entre diluidor, crioprotetor, curva de resfriamento e de aquecimento, minimizando a formação de cristais de gelo, a desidratação celular e as lesões causadas pelo choque térmico (Jasko, 1994; Cottorello, 2002).

2.1.1.5. Efeito da coleta fracionada, da centrifugação, com retirada do plasma seminal e da taxa de diluição sobre as características de motilidade espermática e taxa de gestação de éguas inseminadas

Os efeitos negativos do plasma seminal, durante o armazenamento do sêmen de equídeos, podem ser reduzidos pela realização da coleta fracionada (Tischner *et al.*, 1974; Varner *et al.*, 1987; Mello *et al.*, 2000), obtendo-se apenas a fração rica em espermatozoides; da centrifugação do sêmen com eliminação total ou parcial do plasma seminal associada a ressuspensão dos espermatozoides em meio diluidor adequado

(Padilla e Foote, 1991; Moore *et al.*, 2005b); da filtração do sêmen, que permite a obtenção da fração rica com menor ocorrência de danos mecânicos às células espermáticas, em comparação à centrifugação (Alvarenga *et al.*, 2012); da utilização de uma taxa de diluição ideal, sendo esta capaz de reduzir os efeitos tóxicos do plasma seminal (Palmer, 1984; Jasko *et al.*, 1991).

A realização da coleta fracionada do sêmen se tornou possível devido à utilização da vagina artificial aberta. Esse tipo de coleta possui vantagens em relação à total, permitindo a separação da fração gelatinosa do sêmen e da fração rica em espermatozoides, além de uma menor ocorrência de contaminação bacteriana. Tem sido descrito que a fração rica em espermatozoides, correspondente aos três primeiros jatos, seria mais resistente ao resfriamento do que o ejaculado total (Varner *et al.*, 1987; Lindeberg *et al.*, 1998). Mesmo com todas estas vantagens apresentadas, esta forma de coleta não é utilizada na rotina, devido à falta de praticidade do método que exige a presença de dois técnicos para a coleta, além do risco de perda de parte do ejaculado (Tischner e Kosiniak, 1992).

De acordo com Pickett e Amann (1993), para o sêmen destinado ao processo de congelamento, as coletas devem ser realizadas a cada três ou quatro dias, a fim de obter-se a concentração espermática máxima em cada coleta.

Para a realização da coleta de sêmen de maneira correta, a vagina artificial precisa fornecer ao reprodutor, pressão e temperatura adequadas na região da base do pênis (Tischner e Kosiniak, 1992). A temperatura no interior da vagina artificial, no momento da coleta, deve estar entre 42°C e 45°C (Davies-Morel, 1999), sendo que a pressão exercida no pênis deve variar em torno de 66 mm Hg (Tischner e Kosiniak, 1992; Katila, 2001). Desta forma, a vagina será bem aceita pelo reprodutor, permitindo que a ejaculação ocorra de forma normal e completa (Davies-Morel, 1999).

Durante a coleta, os espermatozoides não podem ser expostos a danos mecânicos, à luz direta, nem a temperaturas muito baixas ou muito altas. Todo o material que entra em contato com os espermatozoides deve ser previamente lavado,

seco, estar aquecido e ser livre de substâncias tóxicas às células (resíduos de sabão ou detergentes). Também deve ser dada atenção especial aos materiais utilizados durante todo o processo de coleta e manipulação do sêmen, pois estes podem ser tóxicos e prejudicar os espermatozoides (Lindeberg *et al.*, 1998).

O volume de sêmen oriundo da coleta fracionada é menor que o proveniente da coleta total do ejaculado. Já os dados de concentração espermática por mL foram superiores no sêmen fracionado, quando comparado ao ejaculado total. A fração espermática rica representa 45,3% do volume e 73,2% da concentração espermática, quando comparado ao ejaculado total. O tipo de coleta (fracionada ou total) não influencia a motilidade ou a viabilidade espermática. A coleta fracionada do sêmen associada à centrifugação antes do congelamento, resultou em um aumento da motilidade progressiva pós-descongelamento e da integridade da membrana, quando comparada às frações ricas não submetidas à centrifugação ou à ejaculados não fracionados e centrifugados (Sieme *et al.*, 2004).

Dados de longevidade e integridade espermáticas do sêmen asinino não foram superiores quando o sêmen foi coletado de forma fracionada e preservado a 5°C, em comparação à coleta do ejaculado total preservado da mesma maneira (Mello *et al.*, 2000). Por outro lado, Dalmau (2003), trabalhando com sêmen asinino, observou maior longevidade espermática para os ejaculados obtidos por meio de coleta total, seguida de centrifugação ($37,05 \pm 2,26$ horas), em comparação àqueles coletados de forma total sem posterior centrifugação ($22,30 \pm 1,10$ horas), ou àqueles coletados de forma fracionada ($27,90 \pm 1,75$ horas).

Estudos sobre os efeitos da centrifugação no sêmen equino são conflitantes; no entanto, a avaliação tem se baseado apenas na motilidade espermática pós-centrifugação (Len *et al.*, 2010). Alguns estudos demonstraram queda da motilidade espermática após a centrifugação (Jasko *et al.*, 1991; Kareskoski *et al.*, 2006). Entretanto, outros estudos não evidenciaram qualquer efeito deletério sobre a motilidade espermática (Martin *et al.*, 1979; Lyle e Ferrer, 2004). Adicionalmente, a centrifugação foi benéfica à motilidade do sêmen equino diluído e resfriado (Brinsko *et al.*, 2000).

Considerando-se que os efeitos da centrifugação sobre as células espermáticas do equino ainda não foram completamente elucidados, recomenda-se o uso de baixas velocidades de centrifugação durante a preparação do sêmen (de 400 x g a 600 x g) (Cochran *et al.*, 1984; Jasko *et al.*, 1991; Jasko *et al.*, 1992; Brinsko *et al.*, 2000). Entretanto, a utilização destas velocidades, quando do processamento do sêmen fresco, resulta na perda de 20 a 30% dos espermatozoides no sobrenadante (Cochran *et al.*, 1984; Heitland *et al.*, 1996).

Len *et al.* (2010) não verificaram alteração das motilidades progressiva média e total no sêmen diluído e centrifugado a 900 x g por 10 minutos, imediatamente após o processo de centrifugação. Esses resultados estão de acordo com os observados por Lyle e Ferrer (2004). Naquele estudo, a ressuspensão do pellet, após centrifugação à 900 x g por 10 minutos, não afetou a motilidade espermática após o resfriamento por 24 horas. Segundo os autores, componentes do plasma seminal (como espécies reativas ao oxigênio), que podem ter efeito deletério sobre a motilidade dos espermatozoides armazenados, foram removidos com o plasma seminal durante a centrifugação (Parinaud *et al.*, 1997). O mesmo estudo mostrou que o sêmen não submetido à centrifugação apresentou os maiores valores de espermatozoides móveis e viáveis, com acrossomas não reativos. Assim, recomendaram que a centrifugação seja utilizada durante o processamento do sêmen resfriado somente quando necessário, ou seja, em ganhões oligospermicos ou apresentando sêmen de baixa congelabilidade, nos quais a remoção do plasma seminal possa aumentar a qualidade do sêmen em questão (Len *et al.*, 2010).

A centrifugação do sêmen à 600 xg por 10 minutos ou à 900 xg por 10 minutos (Len *et al.*, 2010) não causou danos às membranas plasmáticas nem acrossômicas, com base nas análises realizadas imediatamente após a centrifugação ou após resfriamento por 24 horas. Talvez a remoção das espécies reativas de oxigênio do plasma seminal, durante a centrifugação, possam ter reduzido os danos na membrana plasmática, causados pelo processo de capacitação, induzido por elas (Ford, 2004).

Alvarenga *et al.* (2010), na intenção de diminuir os danos mecânicos às células espermáticas durante a remoção do plasma seminal, desenvolveram um novo método de filtração, que utiliza um filtro composto por uma membrana hidrofílica sintética (Sperm Filter; Botupharma, Botucatu, Brasil), capaz de reter as células espermáticas e permitir apenas a passagem do plasma seminal. Este método se mostrou tão eficiente quanto a centrifugação, no que diz respeito à remoção do plasma seminal em equinos, além de promover menores danos à membrana plasmática, menor crescimento bacteriano no sêmen e de ser mais prático para utilização a campo, uma vez que a presença da centrifuga não se faz necessária (Alvarenga *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado por Vidament *et al.* (2001), envolvendo a redução do volume de plasma seminal por meio da centrifugação, antes do congelamento, observou-se resultados superiores aos da coleta fracionada do sêmen de garanhões. Sendo assim, a realização da coleta fracionada sem a centrifugação subsequente do sêmen para eliminar os efeitos indesejáveis do plasma seminal não promoveu um aumento da qualidade do sêmen, após o processo de congelamento e descongelamento. Por outro lado, ao se realizar a coleta do sêmen utilizando-se a vagina artificial aberta obtêm-se uma menor contaminação do mesmo, sendo esta uma vantagem interessante quando o seu armazenamento se fizer necessário.

Entretanto, quando o sêmen se destinar ao congelamento, o método de coleta fracionada apresenta uma desvantagem, ocasionada pelo volume final que se torna muito grande, devido à presença, ainda, de boa parte do plasma seminal e do diluidor de congelamento (Davies Morel, 1999; Fonseca, 2006).

Varner *et al.* (1987) e Katila *et al.* (2002) descreveram que a fração rica possui uma qualidade superior quando comparada ao ejaculado total. Porém, trabalhos utilizando a coleta fracionada seguida do resfriamento do sêmen, mostraram que as últimas frações do ejaculado permaneceram com uma maior motilidade em relação ao que observou-se com a fração rica (Katila *et al.*, 2002; Akcay *et al.*, 2006).

Diante da diversidade de resultados encontrados na literatura é necessário um maior aprofundamento neste assunto, a fim de se descrever a técnica mais adequada de coleta e processamento do sêmen asinino.

2.1.1.6. Diluidores utilizados para a centrifugação do sêmen de asininos

Os principais diluidores utilizados para a centrifugação do sêmen de equídeos incluem uma solução de sacarose à 11% (Piao *et al.*, 1988), solução glicose-EDTA (Martin *et al.*, 1979), solução de ringer lactato associado ao diluidor de leite em pó desnatado-glicose (Miró *et al.*, 2005), os diluidores INRA 82 e 96, e o leite desnatado ultrapasteurizado (UHT) (Vidament, 2005; Rota *et al.*, 2008).

A utilização destes diluidores é variável dependendo da localidade e da facilidade de sua aquisição. A grande parte dos diluidores utilizados para a centrifugação são os mesmos utilizados comercialmente para o resfriamento do sêmen de equídeos, principalmente aqueles contendo o leite em pó desnatado como base (Squires *et al.*, 1999; Miró *et al.*, 2005; Papa *et al.*, 2005; Rota *et al.*, 2008). A proporção de uma parte de sêmen para uma de diluidor é descrita como sendo a mais adequada aos protocolos que utilizam a centrifugação para concentrar e retirar o plasma seminal (Squires *et al.*, 1999; Arruda, 2000; Papa *et al.*, 2005), visando a redução dos efeitos indesejáveis que o plasma seminal exerce sobre os espermatozoides, quando presente em grande quantidade (Love *et al.*, 2002; Aurich, 2008).

2.1.1.7. Diluidores utilizados para o congelamento do sêmen de asininos

O aumento da utilização da inseminação artificial, nos animais de produção, foi diretamente associado à descoberta do diluidor, que possui a função de manter e até mesmo de melhorar a qualidade do sêmen (Berliner, 1942). Os diluidores de sêmen são soluções com função de conferir proteção aos espermatozoides, diante das condições adversas e prolongar a sua viabilidade durante o processamento, além de aumentar o volume da dose inseminante e

auxiliar na avaliação do sêmen (Pickett e Shiner, 1994; Darenius, 1998).

Os diluidores utilizados para o sêmen de equídeos são compostos por água, tampões e substâncias não iônicas, açúcares e diferentes tipos de macromoléculas e antibióticos (Amann e Pickett, 1987). Um determinado diluidor, para ser considerado adequado, deve oferecer: pressão osmótica ideal à célula espermática de acordo com o tipo de processamento do sêmen; equilíbrio mineral apropriado; combinação adequada de nutrientes; capacidade neutralizante de catabólitos espermáticos; proteção contra variações de temperatura, principalmente contra o frio; capacidade de estabilizar membranas e sistemas enzimáticos; ausência de microorganismos patogênicos; baixo custo; fácil aquisição; baixa irritabilidade ao aparelho genital, bem como ausência de toxicidade aos espermatozoides (Amann e Pickett, 1987; Silva Filho, 1994).

Dentre os diluidores utilizados para o congelamento do sêmen de jumentos, com sucesso, podem ser citados o T2-94 (Trimeche, *et al.*, 1998) e o M9H (Papa *et al.*, 1999). Ao trabalharem com sêmen congelado de jumentos, para a inseminação de jumentas da raça Poitou, Trimeche *et al.* (1998), obtiveram sucesso quando da utilização de um protocolo caracterizado pelo envase do sêmen congelado em palhetas de 0,55 mL, à uma concentração de 60×10^6 de espermatozoides/dose. Após o descongelamento, o sêmen foi processado de duas maneiras distintas: com ou sem a retirada do glicerol, utilizando o diluidor T2-94. Foram realizadas inseminações sucessivas a partir de um folículo de 30 mm, com uma dose inseminante de 600×10^6 espermatozoides até a ovulação. Ao final de quatro ciclos, os resultados obtidos foram de oito éguas gestantes, das 21 inseminadas com o sêmen sem glicerol, sendo que nenhuma égua concebeu, das 17 que receberam o sêmen com glicerol. Já Papa *et al.* (1999) obtiveram duas gestações (66%) em éguas inseminadas com o sêmen de jumento, congelado em diluidor M9H, à base de Merk-gema (Martin *et al.*, 1979), adicionado de meio à base de leite desnatado e glicose (Kenney *et al.*, 1975), acrescido de Basal Medium Eagle (BME).

Silva *et al.* (1997), utilizaram o diluidor à base de lactose-EDTA, descrito por Martin *et al.*

(1979) e obtiveram valores de motilidade pós-descongelamento em torno de 30%. Ao trabalharem com o congelamento de sêmen de jumentos da raça Poitou, Trimeche *et al.* (1996) utilizaram o diluidor INRA 82, descrito por Palmer (1984) com 2% de gema de ovo e 2,5% de glicerol, no qual realizou várias modificações visando definir um diluidor de congelamento, capaz de proporcionar uma maior qualidade espermática pós-descongelamento.

Snoeck *et al.* (2001), relataram que alguns ganhões apresentaram melhor resposta ao congelamento com determinado diluidor do que com outros. Entretanto, apesar da existência de vários diluidores para o congelamento do sêmen de equídeos, Papa *et al.* (2002), observaram que não existia um diluidor capaz de manter a mesma qualidade e fertilidade do sêmen fresco.

2.1.1.7.1. Macromoléculas utilizadas nos diluidores

Algumas substâncias, dentre as quais os lipídeos, proteínas e macromoléculas, são eficientes para a proteção das células espermáticas durante o processo de congelamento, sem que para isso necessitem penetrar nos espermatozoides, podendo-se citar a gema de ovo, o leite, alguns açúcares e a albumina sérica bovina (Keith, 1998).

Lardy e Phillips (1939) foram os primeiros a utilizarem a gema de ovo como componente de diluidor seminal para equinos. Posteriormente, ela passou a ser extremamente utilizada em diluidores para o sêmen de todas as espécies domésticas (Pace e Grahman, 1974), tendo a função de proteger os espermatozoides contra o choque pelo frio, de forma a preservar a motilidade espermática e as membranas acrossômicas, bem como reduzir a perda de enzimas (Holt, 2000). Berliner (1942), tendo como base os trabalhos anteriormente realizados por Phillips (1939), foi o pioneiro na utilização da gema de ovo em diluidores seminais de jumentos e ganhões na rotina de uma central de reprodução equídea nos Estados Unidos.

A partir daí, vários trabalhos tem sido realizados utilizando-se a gema de ovo como componente importante do diluidor para o sêmen resfriado e congelado de ganhões (Nagase *et al.*, 1966;

Oshida, 1967; Martin *et al.*, 1979; Klug, 1992) e também para o sêmen de jumentos (Vieira *et al.*, 1985; Arruda *et al.*, 1989; Santos, 1994; Papa *et al.*, 1999; Mello *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2006; Vidament *et al.*, 2009).

A gema de ovo de galinha é a mais utilizada para a formulação de diluidores para equídeos, porém, tem sido descrito que a gema de ovo de codorna exerce maior efeito protetor aos espermatozoides durante o processo de congelamento e descongelamento em comparação à de galinha (Trimeche *et al.*, 1997).

Embora exerça uma função crioprotetora de maneira eficaz, a incorporação da gema de ovo nos diluidores para a produção de sêmen congelado em larga escala e, principalmente, para a exportação, apresenta algumas restrições. Primeiramente, porque a composição bioquímica do diluidor é de difícil controle, uma vez que vários fatores relacionados às poedeiras tais como: idade, genética, nutrição e administração de medicamentos podem influenciar a quantidade e a qualidade da composição da gema do ovo (Murata *et al.*, 2003). Outra restrição é o fato de que vários países têm imposto barreiras à importação do sêmen congelado nestes meios, em função do controle sanitário de doenças avícolas.

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo têm sido descritas como responsáveis pelos fatores de proteção contra o choque pelo frio, como proposto por Bogart e Mayer (1950) e reafirmado por Pace e Graham (1974). A LDL corresponde a dois terços dos sólidos totais presentes na gema de ovo de galinha e se encontra na parte solúvel da gema. Ela é composta por 83 a 89% de lipídeos e por 11 a 17% de proteínas. Com relação à fração lipídica, os triglicérides correspondem a 69%, os fosfolipídeos a 26% e o colesterol a 5% (Cook e Martins, 1969).

O mecanismo pelo qual a LDL protege os espermatozoides armazenados à baixas temperaturas ainda não está bem elucidado. Hipotetiza-se que a fração lipídica da LDL possa ser a responsável por conferir proteção celular frente ao choque térmico (Watson, 1981). São descritas quatro hipóteses para a possível ação das LDL sobre os espermatozoides. A primeira sugere uma possível associação das LDL à

membrana plasmática, que promoveria uma estabilidade da última, com consequente proteção à célula espermática (Foulkes, 1977; MacDonald e Foulkes, 1981). A segunda hipótese descreve que os fosfolipídeos presentes na LDL poderiam formar um filme protetor na interface entre os ácidos graxos e a água, estabilizando fisicamente a membrana e doando fosfolipídeos e colesterol que poderiam ser incorporados a ela (Graham e Foote, 1987). De acordo com a terceira teoria, as LDL poderiam competir com peptídeos catiônicos (<5 KDa) deletérios presentes no plasma seminal pela ligação na membrana espermática, conferindo proteção à mesma (Vishwanath *et al.*, 1992). Outra hipótese, descrita por Manjunath *et al.* (2002) e Bergeron *et al.* (2004), trabalhando com sêmen de touros, sugere que as LDL poderiam interagir com as proteínas presentes no plasma seminal destes animais, as proteínas do plasma seminal bovino - BSP's, do inglês "Bovine Seminal Plasma Proteins", de forma a inibir a sua ligação aos fosfolipídeos da membrana plasmática, com consequente inibição do efluxo de colesterol e fosfolipídeos e da capacitação espermática.

É desejável que o sêmen seja diluído o mais rápido possível, logo após a sua coleta. A não diluição promove a exposição dos espermatozoides às altas concentrações de BSP's, com consequente remoção lipídica contínua, promovendo uma menor resistência ao choque térmico e ao resfriamento e/ou congelamento. Utilizando-se diluidores à base de gema de ovo, as LDL são capazes de interagir com a maior parte das BSP's presentes no plasma seminal, evitando a ocorrência de maiores alterações na membrana plasmática das células espermáticas (Bergeron e Manjunath, 2006). Além disso, é descrito que espermatozoides com baixas concentrações de colesterol em sua membrana plasmática são mais susceptíveis ao choque térmico.

No sêmen diluído com gema de ovo, em torno de 80% das BSP's são sequestradas pelas LDL, não se associando aos espermatozoides (Bergeron *et al.*, 2004). Desta forma, o efluxo de colesterol e fosfolípidos é menor, mantendo a viabilidade espermática por um período mais longo. As BSP's participam do processo de capacitação espermática, retirando o colesterol e os fosfolípidos da membrana plasmática, e a ligação

das células espermáticas às células da tuba uterina (Manjunath e Therien, 2002). A redução da associação entre as BSP's e as células espermáticas, observada na presença da gema de ovo, pode ser um fator que explique os menores índices de fertilidade apresentados pelo sêmen criopreservado ou resfriado em comparação ao sêmen fresco (Bergeron e Manjunath, 2006), uma vez que a capacitação é fundamental para a fertilização do ovócito. Provavelmente, um mecanismo similar ocorra para equídeos (Canisso, 2008).

Os diluidores utilizados para a criopreservação do sêmen equino contêm de 02 a 20% de gema de ovo em sua composição (Keith, 1998). De acordo com Parks *et al.* (1981), o colesterol, quando em altas concentrações, pode exercer um efeito negativo sobre a célula espermática, ocasionando a infertilidade do sêmen de humanos e garanhões (Sugkraroek *et al.*, 1991; Brinsko *et al.*, 2005). Foi descrito que a presença do colesterol seja capaz de induzir um estado de decapacitação, inibindo a reação acrossômica (Davis, 1978). Em trabalho realizado por Mann *et al.* (1963), utilizando-se a fração espermática rica, observou-se uma possível interação entre o percentual de gema no diluidor e a quantidade de plasma seminal.

Quando o percentual de plasma seminal foi reduzido pela realização da coleta fracionada, melhores resultados de longevidade espermática foram obtidos quando da utilização de maior percentual de gema no diluidor. Entretanto, para a diluição do sêmen a fresco de jumentos, coletado de forma total, Silva (1988) utilizou o diluidor de Nagase e Niwa (1964) modificado, contendo 20% de gema de ovo, obtendo taxas de gestação ao final de três estações de monta consecutivas de 68,3%, 82,3% e 92,1% respectivamente. Utilizando o mesmo diluidor, Ferreira (1993) obteve uma taxa de gestação por ciclo de 80%, para o sêmen armazenado por 24 horas a 5°C e de 75,9%, para o sêmen armazenado por 48 horas. Bedford *et al.* (1995), trabalhando com sêmen de garanhões, observaram uma redução da taxa de recuperação de embriões em éguas inseminadas com diluidor acrescido de gema de ovo, sendo o sêmen livre de plasma.

Este diluidor à base de gema de ovo vem sendo amplamente utilizado no Brasil, apresentando

resultados de fertilidade similares ou até mesmo superiores aos obtidos com o diluidor de leite em pó desnatado-glicose (Kenney *et al.*, 1975) (Carvalho, 1992; Silva Filho *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 2000). No mesmo trabalho citado anteriormente, Ferreira (1993) comparou dois diluidores, sendo um à base de gema de ovo e outro à base de leite, para a preservação de sêmen asinino sob refrigeração entre 4°C e 6°C. A partir de 24 horas de armazenamento, a autora observou valores de motilidade espermática total, progressiva e vigor superiores para o sêmen diluído em meio à base de gema de ovo.

Em outro trabalho, Silva Filho (1994) comparou a fertilidade de éguas inseminadas com o sêmen in natura ou diluído, nos seguintes diluidores: lactose-gema, glicina-gema, leite desnatado-glicose, obtendo-se taxas de gestação, ao primeiro ciclo (71,43%; 61,54%; 78,57% e 78,57%) e de gestação/ciclo (70,59%; 56,25%; 81,25% e 83,33%) respectivamente, não observando-se diferenças estatísticas entre os tratamentos.

O leite é um meio isotônico utilizado como diluidor para a preservação espermática, tanto na sua versão integral, quanto na desnatada e ultrapasteurizada (UHT). Sua ação nos diluidores tem sido atribuída à sua fração proteica, que pode atuar como tampão contra mudanças de pH e como agente quelante, contra a presença de metais pesados no meio (Boeta e Quintero, 2000). Ele vem sendo empregado para diluir e armazenar o sêmen fresco ou resfriado, entretanto, ao utilizar-se um diluidor à base de leite, glicose e glicerol para a criopreservação do sêmen equino, obteve-se um excelente resultado pós-descongelamento (McCall e Sorensen, 1971).

As micelas de caseína do leite são capazes de conferir proteção aos espermatozoides equinos durante o resfriamento (Choong e Wales, 1962; Martin, 1966; Battellier *et al.*, 1997). As caseínas são compostas por diversos elementos, dentre eles, os fosfocaseinatos nativos e a β -lactoglobulina apresentaram uma influência positiva sobre a sobrevivência espermática. Porém, o mecanismo de ação pelos quais estes componentes exercem sua função crioprotetora ainda não está claro (Battellier *et al.*, 1997).

Kenney *et al.* (1975) desenvolveram um diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose, comumente chamado de diluidor de mínima contaminação, sendo este amplamente utilizado por vários pesquisadores ao longo dos anos visando manter as características seminais em trabalhos *in vitro* (Varner *et al.*, 1987; Ferreira, 1993), como para avaliar a fertilidade do sêmen submetido à diferentes tratamentos (Douglas-Hamilton *et al.*, 1987; Silva Filho, 1994; Rossi, 2008).

O diluidor INRA96 contém os parafosfocaseinatos, elementos presentes no leite, responsáveis pela proteção dos espermatozoides frente às injúrias ocorridas durante o processo de resfriamento. Este diluidor mostrou-se superior em relação a outros diluidores à base de leite quando da avaliação da capacidade de manutenção da viabilidade espermática, por diferentes períodos (Batellier *et al.*, 1997).

Ao trabalharem com o sêmen asinino diluído em leite desnatado UHT para a inseminação de jumentas, Rozas (2005) alcançou taxas de gestação por ciclo de 25,66% e 47,36%, respectivamente, para duas estações de monta subsequentes. Posteriormente, Rossi (2008) avaliou dois diluidores, sendo um à base de leite em pó desnatado-glicose e o outro à base de glicina-gema de ovo para a inseminação de éguas com sêmen asinino diluído e resfriado por até 12 horas, não sendo observadas diferenças estatísticas, quanto às taxas de gestação por ciclo, entre os tratamentos (51% e 49%). Vidament *et al.* (2009), também utilizando sêmen asinino diluído em leite UHT, resfriado e armazenado a 4°C por até 8 horas, obtiveram uma taxa de gestação por ciclo de 45%, quando inseminaram éguas e jumentas.

Os açúcares atuam na desidratação celular através da pressão osmótica, reduzindo a quantidade de água que pode vir a se congelar no interior da célula e assim, as injúrias causadas pela formação dos cristais de gelo (Aisen *et al.*, 2002). Tem sido descrito que alguns açúcares que exercem a função de crioproteção celular, servem como substrato energético para os espermatozoides durante a incubação (Yildiz *et al.*, 2000), conferindo, além disso, proteção à membrana plasmática durante o congelamento e o descongelamento, por meio de interações

diretas com a membrana (De Leeuw *et al.*, 1993).

Por restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolipídios, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema. Normalmente, os dissacarídeos, sacarose e trealose, são mais efetivos para a estabilização da bicamada do que os monossacarídeos (De Leeuw *et al.*, 1993), mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e a manutenção de lipídeos numa fase fluida, na ausência de água (Anchordoguy *et al.*, 1987; Crowe *et al.*, 1987).

A glicose difere de outros açúcares utilizados para a preparação de diluidores pelo fato de não ser ionizada e de ser utilizada pelo espermatozoide para a produção de energia, de forma a aumentar a sua longevidade. Quando uma solução de glicose é usada em um diluidor, a sobrevivência durante o armazenamento é maior, embora o número de espermatozoides que sobrevivem ao choque térmico não aumente significativamente (Bogart e Mayer, 1950).

A lactose parece estar envolvida na proteção espermática exercida pelo leite. Desta forma, quando associada à diluidores compostos de caseínas, melhorou a sua eficiência. Entretanto, sozinha, não foi suficiente para proteger as células espermáticas (Bergeron e Manjunath, 2006).

A rafinose tem sido o açúcar mais utilizado na criopreservação do sêmen de ratos, visando promover a hipertonidade necessária à desidratação celular antes do congelamento (Storey *et al.*, 1998). Para a criopreservação do sêmen equino, demonstrou-se melhores resultados quando da sua utilização em relação ao uso da sacarose. Assim, foi sugerida uma associação de glicose-lactose-rafinose nos diluidores de sêmen (Nagase, 1967).

A proteção conferida pela trealose se dá pelo efeito osmótico associado às suas interações específicas com os fosfolipídios de membrana (Keith, 1998; Aisen *et al.*, 2002). Ela atua repondo água da interface membrana-solução, além de interagir diretamente com os grupos polares dos fosfolipídios durante a desidratação e o congelamento, reduzindo as interações de “Van der Waals” entre as cadeias de hidrocarbonetos

(Aisen *et al.*, 2002) e, com isso, estabilizando a membrana (Storey *et al.*, 1998).

O uso de metilcelulose associada à acetamida (crioprotetor intracelular ou penetrante) e trealose, no congelamento do sêmen de coelhos, melhorou a motilidade espermática em relação ao que observou-se quando da utilização da acetamida isoladamente. O percentual de espermatozoides vivos com acrossomas intactos também foi superior no diluidor contendo metilcelulose e trealose, em relação ao utilizando apenas a acetamida. Demonstrou-se, assim, que a associação de crioprotetores confere maior proteção às células espermáticas, em relação à utilização dos crioprotetores penetrantes, isoladamente. Além disso, alguns crioprotetores, quando associados, podem potencializar os efeitos de outros (Dalimata e Graham, 1997).

A albumina sérica bovina (BSA) é uma proteína plasmática sanguínea que também vem sendo utilizada nos diluidores de sêmen de várias espécies animais. Ela possui propriedades estimulantes e tem influência positiva sobre a manutenção da motilidade espermática (Muller *et al.*, 1998). Em espermatozoides equinos, a BSA tem função quelante do cálcio ionóforo, reduzindo a sua capacidade de desencadear alterações similares ao processo de capacitação espermática. Por outro lado, tem sido descrito que a BSA, quando em grande quantidade, aumenta a capacitação espermática (Parrish *et al.*, 1989). Não há relatos da utilização de BSA nos diluidores para resfriamento do sêmen asinino, sendo a sua adição restrita apenas aos diluidores de congelamento (Jepsen *et al.*, 2010).

2.1.1.7.2. Crioprotetores utilizados nos diluidores

Em 1789, Spallanzani relatou que espermatozoides de sapo poderiam fertilizar ovócitos após o seu congelamento e descongelamento. No entanto, apenas após a descoberta acidental de Polge *et al.* (1949) de que o glicerol atuava como crioprotetor de células é que o uso desta técnica iniciou-se, dando origem aos programas de inseminação artificial com sêmen congelado, especialmente de bovinos.

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio para que haja uma proteção das células espermáticas durante os processos de criopreservação e descongelamento (Graham, 1996; Squires *et al.*, 1999; Arruda, 2000). Eles são importantes para evitar a formação de gelo intracelular (Medeiros *et al.*, 2002), quando ligando-se à água no citoplasma alteram seu ponto de fusão. Além disso, quando se ligam com a água livre, formam pontes de hidrogênio bastante extensas, interferindo, assim, no seu ponto de cristalização (Benchimol, 1996). Dessa forma, existe menor probabilidade de formação de cristais de gelo lesivos às células espermáticas.

Estes componentes são classificados como penetrantes ou intracelulares e não penetrantes ou extracelulares (Graham, 1996; Arruda, 2000), dependendo de sua habilidade em adentrar ou não às células espermáticas (Jasko, 1994; Keith, 1998).

Os principais crioprotetores penetrantes utilizados para o congelamento do sêmen de equídeos são o glicerol, o propilenoglicol, o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido, a acetamida, a dimetil formamida (DMF) e a metilformamida (Keith, 1998; Gomes *et al.*, 2002; Oliveira, 2006; Vidament *et al.*, 2009), sendo que atuam intra e extracelularmente na proteção espermática, por meio de propriedades de ligação com a água ou por propriedades coligativas (Watson, 1979).

Dos crioprotetores não penetrantes merecem ênfase os açúcares, as lipoproteínas da gema de ovo, a proteína do leite (fosfoparacaseinato nativo), a metilcelulose, a pentoxifilina, dentre outros (Keith, 1998; Moussa *et al.*, 2002), que atuam somente no compartimento extracelular. Eles exercem proteção via efeitos osmóticos, promovendo um meio hipertônico que provoca a saída de água do meio intracelular, levando à desidratação dos espermatozoides e diminuindo a probabilidade de se formarem cristais de gelo no interior das células (Amann e Pickett, 1987).

Nos protocolos de congelamento envolvendo o sêmen de equídeos, o crioprotetor mais usado é o glicerol (Martin *et al.*, 1979; Loomis *et al.*, 1983; Cochran *et al.*, 1984; Papa, 1987; Graham, 1996). Diversos autores relatam a importância da interação dos diluidores de congelamento com os crioprotetores (Papa *et al.*, 1998; Arruda, 2000;

Papa *et al.*, 2002; Neves Neto, 2004), sendo um fator importante para a preservação do sêmen equino durante a criopreservação.

Embora os crioprotetores sejam fundamentais para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de congelamento, eles podem também, exercer efeitos tóxicos e diminuir as taxas de gestação, quando presentes em altas concentrações (Rossi *et al.*, 2003). Assim, altas concentrações de glicerol têm sido responsabilizadas por baixas taxas de gestação do sêmen congelado (Alvarenga *et al.*, 2005), por efeitos tóxicos nos espermatozoides (Fahy, 1986; Hammerstedt e Graham, 1992) e, por efeitos contraceptivos em éguas (Pace e Sullivan, 1975).

Os efeitos deletérios dos crioprotetores estão relacionados a diversos fatores, valendo salientar o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, a indução da fusão desta membrana e a inibição da atividade enzimática (Fahy, 1986). Parte desta toxicidade se deve também à injúria bioquímica, resultante da adição direta do crioprotetor sobre os componentes celulares. Outros autores afirmam que a verdadeira toxicidade do glicerol é devido ao estresse osmótico, já que o mesmo penetra nas membranas celulares mais facilmente que outros crioprotetores (Amann e Pickett, 1987; Hammersted e Graham, 1992).

Vidament *et al.*, (2009) compararam a resistência dos espermatozoides de jumentos e de garanhões, no sêmen fresco diluído, resfriado ou congelado no meio INRA 82, quando da inseminação artificial de éguas e jumentas. O sêmen de ambas as espécies apresentou extrema sensibilidade à altas concentrações de glicerol, quando toleraram concentrações máximas de 2,2%, similarmente ao que se observa nos espermatozoides do varrão, exatamente a espécie doméstica que apresenta menor tolerância ao glicerol.

Apesar de o glicerol apresentar toxicidade, é essencial ao congelamento do sêmen (Amann e Pickett, 1987). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas visando determinar a concentração adequada do crioprotetor, de forma a não produzir efeitos deletérios sobre as células espermáticas. Assim, a concentração de glicerol mais utilizada atualmente nos diluidores varia de 2 a 5% (Vidament *et al.*, 2001), embora concentrações de glicerol de 2,5% para

garanhões e de menos de 2,2% para jumentos, tenha sido sugerida como ideal para o congelamento do sêmen dessas espécies (Vidament, 2005; Vidament *et al.*, 2009).

Pesquisas recentes com crioprotetores para o sêmen de equídeos têm apontado resultados mais favoráveis quando da utilização de amidas como crioprotetores. Estas apresentaram melhores resultados quando comparadas ao uso associado ou isolado do glicerol (Alvarenga *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Vidament *et al.*, 2009), tanto para o sêmen de garanhões como de jumentos.

Vidament *et al.* (2001) estudaram o efeito da DMF, bem como da sua associação com o glicerol, sobre a motilidade e fertilidade do sêmen equino. Relataram que a velocidade espermática aumentou na presença de 5% de DMF. Entretanto, a combinação de 5% de DMF com 3% ou 5% de glicerol diminuiu a velocidade espermática. Concluíram, neste estudo, que a utilização de 2% de DMF apresentou um efeito adequado como crioprotetor para os espermatozoides de equinos. Além disso, observaram que nenhuma das associações testadas entre os dois crioprotetores teve maior eficiência que o uso isolado de um deles.

O tempo de equilíbrio é o período necessário para que o crioprotetor penetre na célula espermática, caso seja esta a sua função, desidratando-a e alterando o meio intracelular e extracelular, de forma a protegê-la durante o processo de criopreservação (Oliveira, 2007).

Para Ohata *et al.* (2005), o tempo de equilíbrio é importante para a criopresevação do sêmen suíno, por manter uma melhor integridade acrossômica e proporcionar maior longevidade às células, apesar de não haver diferenças na motilidade progressiva pós-descongelamento. Berndston e Foote (1969) descreveram que, mesmo na presença de um intervalo de 10 segundos entre a adição do glicerol e o congelamento, não observou-se diferenças na qualidade espermática pós-descongelamento, para o sêmen de bovinos.

Garanhões com menor viabilidade do sêmen a fresco tenderam a apresentar um aumento no percentual de espermatozoides mortos, após o período de equilíbrio, na presença de um diluidor

de congelamento. Neild *et al.* (2003) sugerem que tal fato possa ser atribuído à uma maior susceptibilidade ao glicerol.

Ao trabalhar com sêmen congelado de equinos, Snoeck (2003), observou que a presença ou não do glicerol, duas horas antes do congelamento do sêmen, não alterou a qualidade espermática pós-descongelamento. Por outro lado, Furst (2006) observou que o tempo de equilíbrio de 60 minutos melhorou a congelabilidade do sêmen equino, desde que associada à curva de resfriamento lenta, proposta em seu trabalho.

Em estudo conduzido por Mello (2005), observou-se melhora significativa da motilidade espermática, bem como redução do grau de lesões nos espermatozoides, ao utilizar-se um diluidor baseado no INRA 82, contendo 5% de DMF, sendo este adicionado ao sêmen de forma gradativa. Neste experimento, utilizou-se uma curva de resfriamento de 0,25°C/min, da temperatura ambiente até 5°C, respeitando-se um tempo de equilíbrio de 60 minutos, previamente ao congelamento em vapor de nitrogênio.

Diferentemente, Osorio (2006) avaliou o efeito da adição fracionada de DMF a um diluidor baseado no INRA 82, não observando qualquer interação entre o método de adição fracionada, tempo de equilíbrio à 5°C e a curva de congelamento, uma vez não terem sido observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, quanto à manutenção das características espermáticas, pós-descongelamento, avaliadas *in vitro*.

A utilização de diversos crioprotetores e suas respectivas combinações pode minimizar e controlar os processos deletérios que ocorrem nas células espermáticas, durante o congelamento e descongelamento (Squires *et al.*, 1999; Arruda, 2000, Osorio, 2006). Desta forma, torna-se possível a obtenção de melhores resultados de motilidade e viabilidade pós-descongelamento, com consequente aumento das taxas de gestação (Rossi *et al.*, 2003).

2.1.1.7.3. Antioxidantes utilizados nos diluidores

O processo de criopreservação submete as células espermáticas ao estresse oxidativo,

prejudicando a qualidade do sêmen após o processo de congelamento e descongelamento, com consequente redução das taxas de gestação obtidas, quando utiliza-se o sêmen equino congelado (Maia e Bicudo, 2009).

A produção excessiva de radicais livres ou de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e/ou a insuficiência das defesas antioxidantes no sêmen levam à disfunção espermática, resultando em um impacto negativo sobre a fertilidade. No entanto, essas ROS exercem um papel-chave na regulação da competência funcional das células espermáticas, uma vez que o radical superóxido (O_2^-), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) estão envolvidos no mecanismo de capacitação, hiperativação da motilidade, reação acrossômica e fertilização (Aitken, 1995; Maia e Bicudo, 2009).

Os danos provocados pelos radicais livres podem ocorrer por dois mecanismos principais, ou seja, pela agressão à membrana espermática, reduzindo a motilidade e a habilidade dos espermatozoides de se ligarem ao oócito ou pela capacidade que os ROS possuem em causar danos diretos ao DNA espermático, comprometendo assim o material genético paterno (Reghini *et al.*, 2010).

A adição de antioxidantes aos diluidores utilizados para o resfriamento e congelamento do sêmen auxilia na proteção dos espermatozoides contra os danos induzidos pelos radicais livres sobre a sua motilidade, viabilidade, produção de energia e integridade do DNA, bem como na interrupção da reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas, em diversas espécies de animais (Maia e Bicudo, 2009). Dentre os antioxidantes mais comumente adicionados aos diluidores de sêmen, destacam-se a catalase, a glutatona reduzida (GSH), a glutatona peroxidase e a vitamina E (Reghini *et al.*, 2010).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular. Ela exerce também a função da destoxificação envolvendo diferentes substratos (Ferreira e Matsubara, 1997). Maia (2006) observou que a suplementação do diluidor com os antioxidantes trolox-C ou catalase, individualmente, resultou em maior integridade

das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides ovinos. A percentagem de espermatozoides viáveis, com acrossoma intacto, foi maior no diluidor ao qual adicionou-se catalase, sendo que o trolox-C exerceu também efeito similar ao da catalase, embora em proporção inferior.

A glutathiona reduzida (GSH) está presente em todas as células vivas aeróbicas, sendo o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (Nordberg e Arnér, 2001). Segundo Ferreira e Matsubara (1997), a GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a das lesões resultantes da exposição à vários agentes. Além disso, participa da destoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação.

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos (ex: peróxidos de lipídios na membrana celular) para seus alcoois correspondentes, convertendo GSH em glutathiona oxidada (GSSG) (Ferreira e Matsubara, 1997).

A superóxido dismutase (SOD) foi a primeira enzima metabolizadora de ROS a ser descoberta. É considerada uma fonte de peróxido de hidrogênio celular (Ferreira e Matsubara, 1997).

A vitamina E (α -tocoferol e seus derivados) é o antioxidante lipossolúvel animal mais predominante (Nordberg e Arnér, 2001). Ela protege as células de radicais livres de oxigênio, *in vivo* e *in vitro*, e parece ser o inibidor primário de ROS encontradas em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos e no plasma seminal (Sikka, 2004), protegendo as células do estresse oxidativo (Kagan *et al.*, 1992).

A vitamina E apresenta uma atuação sinérgica com a vitamina C (Buettner, 1993). Sarlos *et al.* (2002), trabalhando com sêmen de carneiro, observaram que a adição de antioxidantes prolonga o período de conservação do sêmen, melhora a motilidade dos espermatozoides e reduz o grau de danos celulares. Entretanto, deve-se enfatizar que os efeitos da vitamina E podem variar de acordo com a dose utilizada,

uma vez que, em alguns casos, ela pode estimular a oxidação (Valença e Guerra, 2007).

A vitamina C ou ascorbato é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante. O ascorbato atua juntamente com a GSH de forma a proteger as células dos danos oxidativos (Nordberg e Arnér, 2001). Porém, quando em dose elevada ou na presença de metais (ferro ou cobre) ele pode agir também como um pró-oxidante (Ferreira e Matsubara, 1997).

Outro anti-oxidante que pode ser também adicionado aos diluidores para o sêmen equino é a cisteína. Ela possui a capacidade de penetrar através das membranas celulares e exercer sua ação antioxidante, protegendo a célula contra o estresse oxidativo. Em um estudo realizado por Reghini *et al.* (2010), avaliou-se a relação entre a produção de radicais livres e a sua eliminação, via adição do antioxidante N-acetilcisteína a um diluidor comercial de sêmen equino. Neste experimento, avaliou-se os parâmetros de motilidade espermática e integridade de membrana em sêmen equino diluído e conservado a 5°C ou 15°C, com diferentes concentrações de N-acetilcisteína. Os parâmetros de motilidade total e progressiva, bem como de integridade da membrana plasmática, avaliados pré e pós-resfriamento, não apresentaram diferenças estatísticas quando da presença de concentrações de 1mM, 5mM, 10mM, 15mM ou 20mM de N-acetilcisteína adicionadas a uma dose de 50 milhões de espermatozoides, quando comparadas ao que observou-se no grupo controle (0mM). Desta forma, concluiu-se que esta substância pode ser adicionada aos diluidores preconizados para o resfriamento de sêmen equino sem lesar os espermatozoides. No entanto, estudos devem ser realizados visando-se avaliar o seu efeito antioxidante, utilizando-se dosagem de ROS nas amostras e assim, o efeito desta substância no sêmen da espécie equina.

Observou-se uma grande diversidade de opiniões na literatura envolvendo o efeito preventivo das substâncias antioxidantes adicionadas aos diluidores, uma vez que alguns estudos relatam efeitos positivos da adição destas substâncias, enquanto outros não observaram qualquer benefício. Esta variação de resultados foi observada dentro de uma mesma espécie, podendo estar relacionada à idade, à raça dos animais utilizados, à composição do diluidor, à

forma de conservação do sêmen, às doses e combinações dos antioxidantes, dentre outros fatores. O estabelecimento de um padrão para a utilização de antioxidantes no sêmen de cada espécie possibilitará uma maior uniformidade dos resultados obtidos, bem como a recomendação de quais e em que concentrações deveriam ser os antioxidantes utilizados, evitando-se assim a ocorrência de danos oxidativos provocados pelas ROS aos espermatozoides (Soares e Guerra, 2009).

2.1.1.7.4. Outros aditivos utilizados nos diluidores

Algumas substâncias que não os crioprotetores podem atuar indiretamente nas células espermáticas, melhorando a sua sobrevivência ao congelamento (Holt, 2000). Modificações na composição dos diluidores para a preservação do sêmen equino refrigerado têm sido estudadas, visando-se um aumento da longevidade espermática. Diferentes antibióticos, tampões, açúcares e mais recentemente, a adição de agentes indutores de funcionalidade da célula espermática estão sendo investigados a fim de se obter uma melhor preservação do ejaculado de garanhões com baixa qualidade seminal (Nunes, 2006).

A utilização de antibióticos nos diluidores é recomendada a fim de se minimizar o crescimento bacteriano durante o armazenamento do sêmen até o momento da inseminação (Arruda, 2000). Entretanto, estes não devem interferir na qualidade seminal ou mesmo impedir o estabelecimento da microflora vaginal, o que poderia favorecer o crescimento de microorganismos patogênicos (Darenius, 1998). Os antibióticos mais utilizados nos diluidores tem sido a penicilina G potássica, a estreptomicina, a amicacina, a polimixina B e a kanamicina (Jasko *et al.*, 1993).

Em um estudo conduzido por Varner *et al.* (1993), avaliou-se a longevidade espermática de garanhões, utilizando-se um diluidor à base de leite, acrescido de penicilina G (1000UI/mL) e/ou sulfato de amicacina (1000µg/mL). A adição dos dois antibióticos foi benéfica, quando da avaliação do sêmen após 24 horas de armazenamento, sendo que o sêmen diluído na presença de penicilina e amicacina apresentou

maior viabilidade que o diluído na ausência de antibióticos.

No mesmo sentido, Beker (1997) avaliou os efeitos da adição de penicilina G potássica e do sulfato de estreptomicina a um diluidor à base de gema de ovo, sobre as características físicas do sêmen asinino resfriado. Em grande parte dos resultados observou-se uma motilidade total superior ao se utilizar o diluidor sem antibiótico, desde a primeira avaliação, realizada logo após a diluição, até o quarto dia de armazenamento. A motilidade progressiva também apresentou resultados superiores nas amostras diluídas na ausência de antibiótico.

A capacidade fecundante dos espermatozoides é influenciada pelas concentrações de colesterol na membrana plasmática da célula espermática. Entretanto, quando presente em altas concentrações, é capaz de interferir negativamente nesta célula (Parks *et al.*, 1981). Tal interferência se dá através da inibição da reação acrossômica (Davis, 1978), contribuindo assim para os resultados de infertilidade observados, quando da utilização do sêmen equino e humano (Sugkraroek *et al.*, 1991; Brinsko *et al.*, 2005). Resultados similares foram encontrados por Zahn *et al.* (2002) e Jepsen *et al.* (2010), quando o excesso de colesterol agregado à membrana plasmática prejudicou a capacidade fecundante dos espermatozoides de equídeos submetidos ao processo de congelamento.

Por outro lado, a baixa relação entre colesterol: fosfolípidos na membrana espermática dos equídeos é um fator determinante da sua maior vulnerabilidade ao processo de congelamento (Amann e Pickett, 1987), uma vez que quanto menor a concentração de colesterol, maior é a susceptibilidade da célula frente ao choque térmico. A partir daí, vários estudos foram conduzidos na tentativa de se aumentar a relação colesterol: fosfolípidos incorporando-se colesterol à membrana espermática de equídeos por meio da utilização da ciclodextrina como carreador, aumentando-se assim a resistência da célula espermática.

A ciclodextrina é um oligossacarídeo macrocíclico, solúvel em água, formada por um centro hidrofóbico com capacidade de acomodação de substâncias apolares. Sendo assim, complexos de inclusão são formados,

elevando ainda mais a sua solubilidade em meios aquosos (Pitha *et al.*, 1988). As β -ciclodextrinas apresentam uma maior afinidade pelos esteroides em comparação aos outros lipídios e, devido à sua alta especificidade pelo colesterol, a formação destes compostos (β -ciclodextrinas - colesterol) se torna capaz de modificar efetivamente o metabolismo do colesterol (Yancey *et al.*, 1996).

Os primeiros autores a utilizarem as ciclodextrinas para a incorporação de colesterol às membranas plasmáticas foram Klein *et al.* (1995). A metil- β -ciclodextrina e seu complexo de inclusão com o colesterol são capazes de alterar o conteúdo deste na membrana plasmática, devido à formação de uma nova reserva de colesterol em sua fase aquosa. A incubação das células com a ciclodextrina isoladamente faz com que ocorra a retirada do colesterol da membrana (Atger *et al.*, 1997). Entretanto, ao realizar-se a incubação da membrana plasmática sem colesterol associada ao complexo de inclusão, ocorre a restauração do colesterol da membrana (Klein *et al.*, 1995). Na célula espermática, tem sido descrito que o colesterol está presente em todas as membranas, estando a sua maior concentração nas membranas acrossomal e mitocondrial (Moore *et al.*, 2005a).

A adição do complexo colesterol – ciclodextrina aos diluidores de sêmen tem demonstrado um aumento da viabilidade espermática pós-congelamento em algumas espécies domésticas. Ao trabalharem com sêmen congelado de garanhões, Combes *et al.* (2000) observaram melhora da viabilidade espermática pós-descongelamento quando da incorporação do colesterol à membrana espermática, sendo este carregado pela ciclodextrina.

Em um trabalho realizado por Alvarez *et al.* (2006), avaliou-se o efeito da adição de colesterol carregado por ciclodextrinas durante o processo de congelamento do sêmen de jumentos da raça Zamorano-Leonés. O sêmen foi armazenado à 20 ou 37°C durante 15 minutos, em concentrações que variaram de 0 a 3 mg de colesterol-ciclodextrina / 120×10^6 espermatozoides. Em seguida, o sêmen foi congelado utilizando-se o diluidor proposto por Martin *et al.* (1979), contendo 2,5% de glicerol. Os autores concluíram ter a adição do complexo

colesterol-ciclodextrina ao sêmen pré-congelamento influenciado positivamente a motilidade e viabilidade espermáticas pós-descongelamento. Concluiu-se também que a melhor temperatura para a adição de colesterol carregado pela ciclodextrina foi a de 20°C. Além disso, a melhor concentração de colesterol-ciclodextrina foi de 2,0 mg / 120×10^6 milhões de espermatozoides, quando observou-se uma maior porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma intacto, em comparação ao grupo controle.

Resultados similares foram descritos por Rozas (2005), quando observou-se que a incubação de sêmen asinino com 1,5 ou 2,0 mg de ciclodextrina para cada 120×10^6 de espermatozoides, antes do resfriamento, resultou em aumento das motilidades total e progressiva, bem como da integridade da membrana plasmática. A adição de tampões ao diluidor também se faz necessária a fim de se manter a estabilidade do pH do diluidor (Arruda, 2000).

Vários pesquisadores têm concluído que a adição de substâncias com propriedades detergentes em diluidores à base de gema de ovo melhorou a motilidade pós-descongelamento, a integridade acrossomal e a sobrevivência espermática. Nesse sentido, o surfactante mais empregado é o lauril trietanolamina sulfato de sódio, conhecido como orvus-es-paste (OEP), sendo este adicionado ao diluidor na proporção de 0,5 a 1,5% (Holt, 2000). O OEP tem a capacidade de dispersar os componentes da gema de ovo, melhorando a interação do diluidor com a superfície da membrana plasmática, o que explicaria os melhores resultados de motilidade e integridade acrossomal obtidos (Jonhson *et al.*, 2000). Porém, a utilização deste aditivo em diluidores que não sejam à base de gema de ovo resultou em efeitos indesejáveis sobre as células espermáticas, com consequente diminuição da motilidade.

O mecanismo exato de atuação do OEP ainda não está completamente elucidado, porém acredita-se que ele atue de forma indireta através da sua propriedade emulsificadora (Pettitt e Buhr, 1998), ou por meio do favorecimento da formação de microcristais de gelo, de formato angular, durante o processo de congelamento (Braga, 2007).

O uso de OEP no sêmen equino foi introduzido por Martin *et al.* (1979), sendo que os autores adicionaram 0,08mL de OEP para cada 20 mL de diluidor à base de solução salina, gema de ovo, lactose e glicerol. Este procedimento resultou no desenvolvimento do clássico diluidor alemão mundialmente utilizado até os dias atuais (Samper e Morris, 1998).

Com a redução da temperatura, a permeabilidade da membrana plasmática aumenta e com isso, um maior influxo de íons cálcio é observado. Este elemento é de extrema importância nos eventos ocorridos próximos à fecundação, durante a capacitação espermática, reação acrossômica e hiper ativação da motilidade espermática. Entretanto, com o aumento do influxo de cálcio estes eventos ocorrem prematuramente, o que é indesejável para o processo da fertilização. Desta forma, a adição de substâncias quelantes de cálcio aos diluidores tem sido utilizada visando-se inibir o influxo precoce de cálcio durante a criopreservação, permitindo a ocorrência da fecundação de maneira adequada (Holt, 2000).

Dentre os quelantes utilizados nos diluidores para o sêmen de equídeos, enfatiza-se o ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA), que é o mais comum. Ele possui a capacidade de estabelecer fortes ligações com íons metálicos bivalentes tais como o cálcio e o magnésio. Desta forma, estes íons ficam indisponíveis no meio extracelular, impedindo o influxo de cálcio e, conseqüentemente, o início prematuro da capacitação espermática e da reação acrossômica (Jonhson *et al.*, 2000).

2.1.1.8. Tipos de envasamento para o congelamento do sêmen de asininos

Inicialmente, o sêmen de equídeos foi congelado em ampolas de vidro (Polge e Minotakis, 1964). Entretanto, logo a seguir, nos trabalhos realizados por Nagase *et al.* (1966), Oshida (1967) e por Merkt *et al.* (1975), o sêmen passou a ser congelado em forma de pellets. Porém estes métodos de armazenagem em pellets apresentavam dificuldades de identificação, bem como a ocorrência da contaminação do sêmen, inviabilizando o seu uso (Davies Morel, 1999).

No final da década de 70, Martin *et al.* (1979) utilizaram o macrotubo como tipo de envase

para o sêmen congelado, sendo que neste mesmo período, Tischner (1979) realizava o congelamento do sêmen em tubos de alumínio. Os métodos que empregam o macrotubo e o tubo de alumínio utilizam grandes volumes, que dificultam o armazenamento, além de estarem associados a uma curva de resfriamento inadequada (Davies Morel, 1999).

A partir da década de 80, as palhetas francesas de polipropileno, com capacidade de 0,55 mL vêm sendo amplamente utilizadas, sendo este o método de envase preferencial até os dias atuais (Amann e Pickett, 1987; Nascimento, 2006). O envase em palhetas oferece vantagens em relação aos demais, salientando-se a praticidade no momento do envase e vedação, a possibilidade de se identificar cada palheta permanentemente, a facilidade de aquisição deste material e principalmente, o fato de propiciar um congelamento homogêneo do sêmen (Arruda *et al.*, 1986). Entretanto, ao trabalhar com sêmen de jumentos, Oliveira (2005) não observou diferenças significativas entre o congelamento realizado em palhetas francesas de 0,55 mL ou em macrotubo de 2,5 mL. Por outro lado, Papa *et al.* (1991) observaram que a motilidade espermática das amostras de sêmen envasadas em palhetas foi superior às acondicionadas em macrotubos, correspondendo a 36% e 26% respectivamente, após a realização do teste de termo resistência.

O sêmen também pode ser armazenado em palhetas de 0,25 mL (Dell'Aqua Júnior, 2000). Este mesmo autor concluiu que as palhetas de 0,25 mL e as de 0,55 mL apresentaram resultados similares quanto aos parâmetros de motilidade e vigor espermáticos. Entretanto, o sêmen congelado em palhetas de 0,25 mL e descongelado a 65°C por 6 segundos apresentou maior integridade de membrana. As palhetas de pequeno volume, como as de 0,25mL, por serem mais finas, possuem uma maior área de contato, proporcionando um congelamento mais rápido e mais homogêneo (Squires *et al.*, 1998).

A forma de envase mais utilizada para a espécie suína é o Macrotubo de 5 mL (Minitub, Alemanha). Porém, seu diâmetro de 5,4 mm, impede um congelamento e descongelamento rápidos do sêmen. Assim, durante os processos de congelamento e descongelamento ocorrem diferenças significativas entre as temperaturas

do centro e da periferia do macrotubo, podendo levar à redução da motilidade pós-descongelamento (Eriksson, 2000). A fim de contornar esses problemas, vários pesquisadores têm utilizado palhetas, de 0,25 mL e 0,55 mL para congelar o sêmen suíno (Bwanga *et al.*, 1990). Embora melhorias na viabilidade espermática *in vitro* têm sido alcançadas, estas embalagens ainda não são adaptadas para o uso prático, uma vez que é necessário um grande número de palhetas para obter-se uma dose inseminante. Desta forma, o grande número de palhetas pode ser um fator limitante para o armazenamento do sêmen congelado.

Neste contexto, foi desenvolvido um novo método de envase para o sêmen suíno, o FlatPack. O FlatPack é feito de polietileno, com espessura de 0,2 mm, 30 cm de comprimento e 22 mm de largura. Suas dimensões permitem que os processos de congelamento e descongelamento ocorram de maneira mais rápida e mais uniforme, quando comparado às palhetas de maior diâmetro (Macrotubos) (Eriksson e Rodríguez-Martínez, 2000; Saravia *et al.*, 2005).

Em estudo conduzido por Eriksson (2000), observou-se uma taxa de parto de 73% e uma média de 10,7 leitões nascidos vivos, com o uso de sêmen congelado em FlatPacks, correspondendo a uma redução de 6,5% na taxa de parto e de 0,3 leitões nascidos. Esses dados são satisfatórios, uma vez que observa-se na literatura uma redução de 10 a 30% na taxa de parto (Paquignon *et al.*, 1980) e de 1-3 leitões por leitegada (Paquignon *et al.*, 1980), em relação aos resultados obtidos com o sêmen a fresco diluído.

Saravia (2008) avaliaram a possibilidade de congelamento de amostras super concentradas de sêmen suíno em baixo volume (2×10^9 /mL em FlatPacks de 0,7 mL), para a utilização em inseminação intra-uterina profunda em porcas. Como controle foram utilizadas palhetas de 0,55 mL e FlatPacks de 5 mL. Embora a motilidade não diferisse entre os tratamentos testados, a integridade da membrana plasmática foi superior para o sêmen envasado em FlatPack de 5 mL (54%) e de 0,7 mL (49%), quando comparados à palhetas de 0,55 mL (38%).

Até o momento não existem relatos na literatura mundial da utilização do FlatPack como uma alternativa para o envase do sêmen congelado de equídeos.

2.1.1.9. Resfriamento do sêmen pré-congelamento

Uma das grandes dificuldades encontradas no processo de congelamento do sêmen equino é a baixa resistência dos espermatozoides ao resfriamento. Diante de tal dificuldade, busca-se dentro de novos protocolos, amenizar a curva de resfriamento, principalmente nas faixas de temperatura consideradas críticas aos espermatozoides (Watson e Morris, 1987; Vidament *et al.*, 2000).

Os danos causados pelo estresse térmico são decorrentes de danos estruturais diretos, como a ruptura das membranas, ou indiretos, por alterações das funções celulares (Squires *et al.*, 1999). Dentre as alterações incluem-se a perda da motilidade espermática, batimentos flagelares anormais, danos às membranas plasmática e acrossomal, redução do metabolismo, e perda de componentes intracelulares (Pickett e Amann, 1987). Tem sido descrito que o resfriamento influencia mais a fertilidade do que a motilidade espermática, sendo esta influência decorrente do efeito do resfriamento sobre outros elementos da membrana celular, tais como as proteínas envolvidas no transporte de íons (Amann e Graham, 1993).

A membrana plasmática, afetada pelo frio, pode sofrer mudanças na permeabilidade associadas às mudanças funcionais e metabólicas, que juntas prejudicam a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides (Amann e Graham, 1993).

A resistência ao choque pelo frio varia de acordo com a espécie animal. Essa afirmação é válida tanto para o tipo de dano ocorrido como para a temperatura em que esses danos se iniciam (temperatura da fase de transição). Tal variação se deve às diferenças na composição das membranas espermáticas, particularmente no que se refere à proporção de fosfolípidos presentes nas membranas dos mamíferos (Pickett e Komarek, 1966; Amann e Pickett, 1987; Drobnis *et al.*, 1993). Uma maior resistência ao choque

pelo frio é observada naquelas espécies em que as membranas apresentam uma alta relação colesterol: fosfolípides. No caso dos equinos e suínos essa relação é baixa, fazendo com que os seus espermatozoides sejam mais sensíveis ao resfriamento (Amann e Pickett, 1987; Valle e Silva Filho, 2002). O colesterol é responsável pela estabilidade da membrana espermática; assim, quanto maior a proporção de colesterol na membrana, menor será a temperatura na qual ocorrerá a fase de transição. A perda de colesterol tem efeito desestabilizador na membrana plasmática do espermatozoide *in vitro*, sendo que a alteração no conteúdo de esteróis tem sido associada ao processo de capacitação espermática em várias espécies (Parks e Ehrenwald, 1990).

Se as membranas celulares estiverem protegidas durante a refrigeração e as funções espermáticas forem preservadas até o momento da inseminação, espera-se que ocorra um aumento da longevidade dos espermatozoides por redução da utilização das reservas de ATP (Varner *et al.*, 1989). Assim, para que não ocorra queda da taxa de fertilidade, os espermatozoides deverão se apresentar íntegros do ponto de vista funcional e estrutural até o momento da fertilização (Padilla e Foote, 1991; Amann e Graham, 1993).

2.1.1.10. Curvas de resfriamento e de congelamento utilizadas para o sêmen de asininos

A velocidade de resfriamento do sêmen é um dos pontos críticos para o sucesso da técnica de congelamento, uma vez que o resfriamento realizado de maneira inadequada provocará danos irreversíveis aos espermatozoides. Tais danos são atribuídos, principalmente, à formação de cristais de gelo e à inadequada desidratação celular (Snoeck *et al.*, 2001).

O “choque pelo frio” não se restringe apenas às células espermáticas, ocorrendo na grande maioria das células quando da sua exposição à baixas temperaturas. As injúrias podem ser classificadas como diretas ou indiretas, sendo as lesões diretas dependentes da taxa de resfriamento. Neste caso, o resfriamento mais rápido responderá por maiores danos às células espermáticas em comparação ao mais lento. Além disso, as injúrias diretas são detectadas

logo após a redução da temperatura, sendo as indiretas evidenciadas após períodos mais prolongados de armazenamento (Silva Filho *et al.*, 1994).

Os danos sofridos pelos espermatozoides durante o congelamento e 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. Assim, 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 às altas concentrações de soluto intracelular presentes durante o processo. Por outro lado, o resfriamento rápido (60°C/min) pode provocar um reagrupamento dos cristais de gelo, após o descongelamento, causando danos físicos às células (Graham, 1996).

Alguns autores relataram a necessidade das células espermáticas passarem por um processo de resfriamento, antes de se proceder ao congelamento propriamente dito. Segundo Kayser *et al.* (1992), entre 37°C e 20°C o sêmen pode ser resfriado rapidamente, sem efeitos adversos à motilidade. Porém, na faixa de temperatura entre 20°C e 5°C, onde observa-se uma maior sensibilidade das células espermáticas equinas frente aos danos induzidos pelo resfriamento, este deve ocorrer a uma velocidade de 0,05°C a 0,1°C/min (Cochran *et al.*, 1984; Kayser *et al.*, 1992). De acordo com Moran *et al.* (1992), o espermatozoide equino é mais sensível ao “choque pelo frio” quando se encontra entre as temperaturas de 19 e 8°C. Desta forma, o sêmen diluído pode ser resfriado a uma taxa rápida (0,7°C/minuto) na faixa entre 37 e 19°C, utilizando-se posteriormente, uma taxa de resfriamento mais lenta, (0,05°C/minuto), durante a faixa de temperatura sensível ao “choque pelo frio” (19 a 8°C), prevenindo assim a ocorrência de danos às células espermáticas. O resfriamento mais acelerado pode ser retomado a partir da temperatura de 8°C. Entretanto, Lagares *et al.* (2001), compararam o método de congelamento rápido em equinos, com e sem resfriamento prévio, e concluíram não haver diferenças entre os dois protocolos.

Cochran *et al.* (1984) avaliaram duas curvas de resfriamento durante o congelamento do sêmen equino. Neste trabalho, o diluidor utilizado foi à

base de glicose-EDTA- gema de ovo, sendo o envase do sêmen realizado em palhetas de 0,55 mL. Em uma das curvas, realizada em congeladores programáveis, a taxa de resfriamento foi de 10°C/ min na faixa entre 20°C e -15°C e de 25°C/min na faixa de -15°C a -120°C, sendo o sêmen mergulhado no nitrogênio líquido após 10 min de ter atingido -120°C. A outra curva caracterizada como rápida, foi realizada dentro de uma caixa de isopor de 71 cm x 37 cm x 29 cm contendo nitrogênio líquido, quando as palhetas foram dispostas horizontalmente, em um suporte a quatro centímetros acima do nível do nitrogênio. Após 10 min, o sêmen foi, então, imerso no nitrogênio, conferindo a esta curva uma velocidade de -60°C/min. Concluiu-se não ter havido redução significativa da motilidade espermática pós-descongelamento para nenhuma das duas curvas de resfriamento utilizadas.

Para os asininos, Mann *et al.* (1963) utilizaram uma taxa de resfriamento de 0,5°C/minuto. Já Ferreira *et al.* (1991) optou pela taxa de 0,3°C/minuto, sendo que a taxa de 0,6°C/minuto também foi utilizada para esta espécie (Beker, 1997; Mello *et al.*, 2000; Cottorello *et al.*, 2002). Em um trabalho conduzido por Ferreira (1993) realizou-se um experimento *in vitro*, quando o sêmen de três jumentos, diluído para uma concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose ou lactose-gema de ovo, foi submetido a três taxas de resfriamento. Nesse trabalho, não foram observadas diferenças quanto à longevidade espermática, quando utilizou-se o diluidor à base de leite em pó a 0,2; 0,3 ou 0,6°C/minuto. No entanto, ao utilizar-se o diluidor à base de lactose-gema de ovo, a taxa de resfriamento de 0,6°C/minuto proporcionou uma maior longevidade espermática demonstrando-se assim, que o tempo de preservação *in vitro* do sêmen de jumentos depende do tipo de diluidor e da curva de resfriamento.

Ao trabalharem com o sêmen de três jumentos da raça Pêga e três mestiços (Pêga x Nordestino), diluído em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose (Kenney *et al.*, 1983), Santos (1994) utilizou uma concentração final de 25×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente, o sêmen foi submetido às taxas de resfriamento de

0,3, 0,6 ou 1,0°C/minuto. Foram observados neste experimento, resultados de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático superiores nos tratamentos em que utilizou-se taxas de resfriamento mais rápidas (0,6 ou 1,0°C/minuto), para a conservação do sêmen à 5°C, em relação a uma taxa mais lenta (0,3°C/minuto), sendo os métodos de resfriamento semelhantes. Além disso, observou-se que a morfologia espermática não sofreu influência do método nem das diferentes taxas de resfriamento.

A curva de congelamento mais utilizada para o sêmen equino é a rápida (60°C/min) (Martin *et al.*, 1979; Amann e Pickett, 1987; Jasko, 1994). Papa *et al.* (2003), analisaram a influência da altura entre o nível de nitrogênio líquido e a forma de envase do sêmen sobre os parâmetros espermáticos. Quatro diferentes alturas entre o nível de nitrogênio líquido e o suporte contendo as doses de sêmen, no processo de congelamento foram testadas: um, três, seis e nove centímetros. Não observou-se diferenças estatísticas, quanto aos parâmetros espermáticos pós-descongelamento, entre as diferentes alturas utilizadas para o congelamento das palhetas. Entretanto, as alturas de três e seis centímetros acima do nível de nitrogênio mostraram resultados com tendência à superioridade relativas às demais, na maior parte dos parâmetros avaliados. Segundo Jasko (1994), as palhetas devem ser colocadas em torno de três centímetros acima do vapor de nitrogênio, devendo assim permanecer, no mínimo, por dez minutos, quando utilizadas palhetas de 0,55 mL e, vinte minutos quando da utilização dos macrotubos de 5 mL.

A curva de congelamento é de extrema importância para a manutenção da integridade celular. Quando a taxa é adequada, a célula torna-se progressivamente desidratada e se mantém funcional após o descongelamento. Caso contrário, ocorre perda da viabilidade das células, possivelmente, em função da redução do conteúdo de água intracelular, ocasionando aumento das concentrações de solutos intracelulares e precipitação, com alteração do pH e da osmolaridade do meio (Watson e Morris, 1987).

2.1.1.11. Concentração espermática por mL de sêmen diluído pré-congelamento

Tem sido descrita a existência de uma relação direta entre a concentração espermática e a fertilidade. Tendo a dose inseminante um número adequado de células espermáticas, é possível alcançar-se taxas de gestação aceitáveis, utilizando-se a inseminação convencional (Pickett e Voss, 1975; Silva Filho, 1994).

A diluição pré-congelamento deve ser feita de modo que o volume total apresente a quantidade final de espermatozoides desejada, considerando-se a capacidade do sistema de envasamento a ser utilizado, bem como o volume da dose inseminante pretendida (Leipold *et al.*, 1998).

Segundo Arruda (2000) a taxa de diluição ideal do sêmen pré-congelamento é de 200 milhões de espermatozoides/mL. Esta alta concentração de células espermáticas se faz necessária neste momento, uma vez que parte dos espermatozoides sofrerá danos ao longo do processo de congelamento, tornando-se inviáveis. Desta forma, congela-se uma maior quantidade de células/mL a fim de se manter um número razoável de células viáveis pós-descongelamento, capaz de proporcionar taxas de gestação satisfatórias para aquela espécie.

Ao trabalhar com sêmen equino congelado, Cottorello (2002) optou por uma concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL de sêmen diluído pré-congelamento, sendo esta mesma concentração recomendada por Osorio (2006). Entretanto, nestes dois trabalhos não foram realizados testes de fertilidade *in vivo*, impedindo assim uma avaliação do efeito da concentração espermática pré-congelamento sobre a fertilidade.

Em um trabalho envolvendo o congelamento do sêmen de jumentos, Canisso (2008) utilizou uma concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL pré-congelamento, sendo o sêmen diluído em dois diluidores: diluidor de Martin *et al.* (1979) e o proposto por Nagase e Niwa (1964), modificado, com adição de 0,08 mL do surfactante orvus-es-paste (OEP) para cada 20 mL de gema de ovo. As taxas de gestação de éguas, aos 13 dias, foram de 50% (15/30) e 53,33% (16/30) para os diluidores citados acima, respectivamente.

2.1.1.12. Número de espermatozoides por dose inseminante

A partir do conhecimento do número total de espermatozoides presente em um ejaculado, da percentagem de células morfológicamente normais e móveis, bem como do número de espermatozoides necessário por dose inseminante, torna-se possível estimar o número de éguas que podem ser inseminadas utilizando-se um mesmo ejaculado (Xavier, 2006). Acompanhando a redução da concentração de cada dose inseminante, aumenta-se o número de éguas inseminadas por ejaculado, elevando-se consequentemente, o aproveitamento do sêmen em questão, sem ocorrer diminuição concomitante das taxas de gestação (Pickett *et al.*, 1987).

O número de espermatozoides padrão por dose inseminante não tem sido estabelecido, para o sêmen de asininos, embora os critérios mínimos requeridos para obter-se taxas de fertilidade satisfatórias, quando do uso do sêmen congelado de garanhões, é de 600 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva mínima de 30 a 35%, pós-descongelamento (Samper, 2000). Neste sentido, Papa *et al.*, (1989) obtiveram taxas de gestação superiores ao utilizarem concentrações de 200 e 400×10^6 de espermatozoides móveis por dose inseminante, em comparação ao que obteve-se com doses contendo 100×10^6 de espermatozoides móveis. Ao realizarem uma metanálise envolvendo 25 laboratórios do mundo, Samper e Morris (1998) observaram valores de concentração espermática, variando de 250 a 700×10^6 de células por dose inseminante. Além disso, Samper (1995), avaliando os fatores capazes de influenciar a fertilidade do sêmen equino congelado, concluiu que as doses inseminantes contendo menos que 150×10^6 e mais de 800×10^6 de espermatozoides, independentemente da motilidade pós-descongelamento, não resultaram em gestações. Dell'Aqua Júnior (2000), utilizando doses inseminantes de 50, 100, 300 e 800×10^6 de espermatozoides, não obtiveram diferenças significativas quanto às taxas de gestação em éguas.

Trimeche *et al.* (1998) utilizaram o sêmen congelado de jumentos apresentando 600×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva mínima de 35% pós-descongelamento por dose

inseminante, para inseminar jumentas da raça Poitou, quando obtiveram uma taxa de gestação de 38%. No mesmo contexto, Papa *et al.* (1999), trabalhando com sêmen de jumentos e uma dose inseminante de 800×10^6 de espermatozoides, obtiveram 66% de éguas gestantes. Ao trabalharem com sêmen congelado de asininos, Oliveira *et al.* (2006) utilizaram doses inseminantes contendo 800×10^6 de espermatozoides móveis e obtiveram uma taxa de gestação de 40% em éguas. Entretanto, não obteve-se nenhuma prenhez quando da inseminação de jumentas neste experimento.

Ao trabalharem com sêmen congelado de jumentos da raça Zamorano-Leonés para inseminação de jumentas da mesma raça, Castejón (2005), utilizou uma dose inseminante de 500×10^6 de espermatozoides móveis, quando obteve apenas uma gestação, dos 18 ciclos reprodutivos utilizados. Neste trabalho realizou-se apenas uma inseminação por ciclo, 24 horas após a indução da ovulação pela administração da hCG.

Jepsen *et al.* (2010), inseminaram 28 éguas com sêmen congelado de jumento durante cinco estações reprodutivas, utilizando uma dose inseminante de 300×10^6 de espermatozoides móveis e duas inseminações por ciclo, realizadas às seis horas pré e seis horas pós-ovulação. Neste trabalho, observou-se taxas de gestação de até 58,3%.

No Brasil, a portaria número 26, de 05 de setembro de 1996, do Ministério da Agricultura, estabelece que o sêmen congelado de equídeos, não pode conter uma quantidade de células espermáticas apresentando motilidade progressiva pós-descongelamento inferior à 200×10^6 por dose inseminante (Fonseca *et al.*, 1997).

A dose inseminante mínima capaz de assegurar índices de fertilidade satisfatórios com sêmen congelado de asininos permanece indefinida. Entretanto, tem sido descrito que doses contendo de 150 a 350 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva, utilizadas em inseminações realizadas próximas da ovulação, respondem por taxas de gestação aceitáveis (Vidament *et al.*, 1997; Leipold *et al.*, 1998).

2.1.1.13. Descongelamento do sêmen

O descongelamento é tão importante ou mais que o resfriamento em termos do impacto que exerce sobre a sobrevivência dos espermatozoides criopreservados. Células que sobreviveram ao resfriamento até -196°C precisam sofrer, ainda, o estresse do reaquecimento, durante o processo de descongelamento. Desta forma, passarão duas vezes pela zona de temperatura crítica. Assim, tanto as taxas de resfriamento quanto as de reaquecimento exercem efeito sobre a membrana plasmática e, portanto, sobre a sobrevivência dos espermatozoides (Mazur, 1984).

Segundo Amann e Pickett (1987), os principais fatores a serem considerados no momento do descongelamento dizem respeito ao tipo de envasamento utilizado, à uniformidade de descongelamento no que se refere à condutividade de calor, a espessura da parede das palhetas, bem como a temperatura da água do banho-maria. Pickett *et al.* (1987), trabalhando com sêmen congelado de garanhões, determinaram como aproveitáveis somente aqueles ejaculados que apresentaram 30 a 35% de motilidade espermática pós-descongelamento. De acordo com Müller (1987), um sêmen de boa qualidade deve apresentar uma motilidade espermática inicial superior a 60%, mais de 70% de células morfolologicamente normais e um valor mínimo de 30% de motilidade pós-descongelamento.

O descongelamento depende da taxa de congelamento do sêmen. Assim, quando o congelamento é realizado utilizando-se uma curva muito rápida, não há tempo suficiente para que ocorra uma desidratação adequada, resultando na formação de cristais de gelo no interior da célula. Neste caso, quando do descongelamento, deve-se utilizar uma velocidade de descongelamento também rápida, para que não ocorra o reagrupamento dos cristais de gelo, e consequentemente, lesão celular. Da mesma forma, o congelamento lento exige um descongelamento lento. Nesse caso, a desidratação celular é maior, necessitando-se de um maior tempo para que ocorra a rehidratação espermática, de modo que a célula não perca sua viabilidade morfofuncional (Mazur, 1985).

Para o descongelamento do sêmen de garanhões, envasado em palhetas de 0,55 mL, dois protocolos são usualmente propostos, sendo que o primeiro recomenda submeter o sêmen a uma temperatura de 37°C por 30 segundos, correspondendo a uma curva de aquecimento de 700°C/min (Amann e Pickett, 1987). O segundo procedimento foi proposto por Cristanelli *et al.* (1984), sendo o sêmen submetido a uma temperatura de 75°C por 7 segundos. Tal procedimento tem apresentado melhores resultados no que diz respeito à sobrevivência espermática pós-descongelamento.

Entretanto, Borg *et al.* (1997) não encontraram diferenças entre os dois métodos de descongelamento, sugerindo que o sêmen equino armazenado em palhetas de 0,55 mL deve ser descongelado a 37°C, por ser um método mais prático no campo.

Diferentemente, Barreto (2002) obteve melhor viabilidade espermática quando da utilização do descongelamento ultra-rápido (98±2°C por quatro segundos), possivelmente, pela rápida passagem das células espermáticas pela faixa de temperatura na qual ocorre a recristalização dos cristais de gelo, fenômeno reconhecidamente danoso para as estruturas celulares.

Na mesma direção, Holt (2000) sugeriu que para o descongelamento de amostras de sêmen seria recomendável utilizar temperaturas relativamente altas, entre 60°C e 70°C, durante sete segundos. Em estudos conduzidos para avaliar os diversos tipos de envasamentos e temperaturas de descongelamento, concluiu-se que a temperatura associada aos melhores parâmetros espermáticos pós-descongelamento, foi a de 65°C por 6 segundos, quando utilizou-se palhetas de 0,25 e 0,55 mL e macrotubos de 4 mL (Dell'Aqua Júnior e Papa, 2001).

Martin *et al.* (1979) descreveram que para o sêmen congelado em macrotubos, o melhor protocolo de descongelamento seria a temperatura de 50°C por 40 ou 45 segundos. Cochran *et al.*, (1984) compararam os resultados sobre as células espermáticas, do descongelamento à 37°C por 30 segundos com o realizado à 75°C por sete segundos, seguido da

imersão a 37°C por um tempo superior à cinco segundos. Em dois experimentos, o percentual de motilidade progressiva foi maior quando o sêmen foi descongelado à 75°C. Embora sete segundos seja um tempo apropriado para o descongelamento em palhetas de cloreto de polivinil (0,55 mL), um tempo de dez segundos foi necessário para as palhetas de polipropileno. Em ambos os casos, a temperatura deve ser controlada rigidamente, em virtude da pequena margem de erro permitida (um segundo), para que a temperatura exceda os 40°C, o que poderia ser deletério às taxas de gestação, devido às alterações ou até morte dos espermatozoides. O tipo de palheta utilizada é importante, pois a condução do calor nesses dois tipos é diferente. Esses autores sugerem que após o descongelamento à 75°C por sete ou dez segundos, a palheta deve ser imediatamente transferida para um banho-maria e permanecer nesse por um tempo superior a cinco segundos, com o objetivo de resfriar o interior da palheta e trazer a temperatura interna para 37°C.

O descongelamento do sêmen envasado em FlatPacks deve ser realizado a uma temperatura de 50°C durante 13 segundos, sendo os mesmos posteriormente transferidos para um banho-maria com água a 37°C, por no mínimo 20 segundos (Eriksson, 2000; Saravia, 2008). As dimensões dos FlatPacks permitem que o congelamento e o descongelamento sejam realizados de forma rápida e uniforme (Eriksson e Rodríguez-Martínez, 2000; Saravia *et al.*, 2005), permitindo a manutenção da qualidade seminal após o descongelamento.

Com exceção dos bovinos, o método de congelamento e descongelamento não é amplamente difundido para outras espécies, devido à falta de protocolos capazes de promover taxas de fertilidade satisfatórias, similares às obtidas com a monta natural ou quando da utilização da inseminação artificial com sêmen a fresco ou resfriado. A reduzida fertilidade associada ao uso do sêmen congelado tem sido atribuída à alteração drástica da estrutura e função da membrana plasmática durante o resfriamento, congelamento e descongelamento (Parks e Graham, 1992).

2.1.2. Fatores inerentes às fêmeas equinas

2.1.2.1. Efeito da idade

Grande parte dos animais destinados à reprodução, na espécie equina, é selecionada baseando-se na sua genética e no seu desempenho, seja qual for a sua modalidade de trabalho, e até mesmo, no desempenho dos seus pais. Desta forma, muitos animais iniciam a sua carreira reprodutiva em idade mais avançada e permanecem nesta atividade até atingir o seu limite fisiológico.

A influência do envelhecimento sobre a atividade reprodutiva de éguas pode ser caracterizada pela presença dos seguintes fatores: desequilíbrio endócrino (Carnevale *et al.*, 1993, 1994), alteração das estruturas do oócito (Hunter, 1990), alterações na tuba uterina (Brinsko *et al.*, 1994; Brinsko *et al.*, 1996), alterações no ambiente uterino (Carnevale e Ginther, 1992; LeBlanc, 2003) e alterações na conformação vulvar (Greenhoff e Kenney, 1975; Pascoe, 1979), tendo estes fatores uma relação diretamente proporcional à redução da eficiência reprodutiva.

O envelhecimento é responsável por promover alterações na atividade endócrina e ovariana de éguas durante o período reprodutivo (Carnevale *et al.*, 1993). Tem sido descrito que a atividade ovariana tende a decrescer a partir dos quinze anos de idade (Wesson e Ginther, 1981).

A emergência folicular de éguas mais velhas é caracterizada por um menor número de folículos por onda (Ginther *et al.*, 1993; Carnevale *et al.*, 1994). Em estudo realizado por Carnevale *et al.* (1993), avaliou-se a dinâmica folicular e a atividade endócrina de éguas pôneis, sendo estas agrupadas de acordo com a faixa etária: fêmeas jovens (5 a 7 anos), fêmeas em idade intermediária (15 a 19 anos) e fêmeas em idade avançada (acima de 20 anos). Desta forma, no grupo de éguas com faixa etária mais avançada observou-se uma menor onda, com um pico de LH reduzido, seguidas por fase folicular mais prolongada, associada a um maior intervalo entre ovulações, quando comparados aos grupos mais jovens. Entretanto, não foram observadas diferenças quanto às concentrações de progesterona (P4) entre os grupos.

As patologias uterinas não parecem ser a principal razão para a redução da fertilidade em éguas velhas, sendo os oócitos defeituosos os maiores responsáveis pelas perdas embrionárias nesta fase da vida (Carnevale e Ginther, 1995). Os oócitos apresentam a mesma idade da égua que os possui, sendo assim, em oócitos de éguas idosas observa-se a não disjunção dos cromossomos bivalentes e a separação prematura das cromátides irmãs, estando estas situações associadas à ocorrência de aneuploidia. Desta forma, apesar das mudanças degenerativas estarem comprovadamente associadas à idade avançada, a fertilidade está comprometida antes mesmo da presença do embrião no útero (Carnevale e Ginther, 1995).

Por outro lado, Ball *et al.* (1986) e Ginther (1992) descreveram que as taxas de fertilização não sofrem grande influência da idade, obtendo-se resultados de 91 a 96% em éguas jovens e de 81 a 92% em éguas de idade avançada. Diante disso, observou-se que a menor fertilidade apresentada pelas éguas mais velhas advinha dos maiores índices de perdas embrionárias, não estando relacionadas necessariamente às falhas na gestação. Segundo Ball (2000), éguas idosas apresentam uma maior ocorrência de perdas gestacionais quando comparadas às jovens, sendo a maior parte destas perdas observadas no início da gestação.

Éguas com idade avançada apresentam um atraso na maturação meiótica, contribuindo para o aumento das taxas de perdas embrionárias. Assim, Brinsko *et al.* (1995) descreveram que os oócitos de éguas com menos de 15 anos de idade apresentaram um desenvolvimento, até a fase de metáfase II, quatro vezes mais rápido que o observado em éguas mais velhas. Sendo assim, as menores taxas de fertilidade observadas em éguas idosas podem advir da fertilização de oócitos que passaram por uma maturação meiótica inadequada, bem como pela maior prevalência de anormalidades cromossômicas observadas nestes animais (Brinsko *et al.*, 1995).

Em um estudo realizado por Brinsko *et al.* (1994), observou-se que a idade da égua não teve influência sobre a habilidade do embrião em se desenvolver até o estágio de blastocisto. Entretanto, os blastocistos oriundos de oócitos de éguas mais velhas apresentaram uma pior qualidade quando comparados aos de éguas

jovens. A taxa de fertilização e o número de embriões/número de ovulações foram superiores ($p<0,01$) em éguas jovens, com idade entre dois e sete anos, em relação às de 17 a 24 anos. Estes resultados indicam que o índice de mortalidade embrionária mais elevado em éguas velhas parece estar relacionado às alterações no desenvolvimento embrionário (Brinsko *et al.*, 1994). Da mesma forma, Aguilar *et al.* (2002) relataram uma tendência de maior fragmentação das estruturas coletadas de éguas com idade superior a 15 anos (46,7%), em relação ao que observou-se em éguas mais jovens (19,0%). Isto sugere a ocorrência de maior número de ovulações com estruturas defeituosas em éguas de idade avançada.

Ao trabalharem com transferência de embriões em éguas da raça Mangalarga, Fleury *et al.* (1989) descreveram melhor atividade ovariana em éguas jovens. Neste trabalho, os pesquisadores realizaram inseminações artificiais contendo 500 milhões de espermatozoides móveis/dose e obtiveram maior taxa de recuperação embrionária no grupo de éguas com menos de três anos de idade (85%), seguido pelas éguas entre três e 18 anos (64,4%), que apresentaram-se superiores à obtida no grupo de éguas acima de 18 anos (24,1%).

Alterações no ambiente da tuba uterina também estão relacionadas ao envelhecimento, podendo influenciar negativamente a atividade reprodutiva de éguas. Assim, éguas com idade avançada podem apresentar acúmulo de debris intraluminais, promovendo um bloqueio da tuba uterina que refletirá em queda de fertilidade nestas fêmeas (Allen *et al.*, 2006). Outro fator relacionado à tuba uterina que reduz a fertilidade em éguas velhas é a salpingite. Fiala *et al.* (2006) detectaram uma alta concentração de células inflamatórias (59,4%) em tubas uterinas coletadas de éguas com idade média de 15 anos em matadouro.

A secreção da tuba uterina também sofre influência da idade da égua. Assim, Brinsko *et al.* (1996) descreveram que as secreções da tuba de éguas jovens e férteis (2 a 7 anos de idade) poderiam conter concentrações mais elevadas de fatores de crescimento favoráveis ao embrião, quando comparadas às de éguas mais velhas (17 a 24 anos de idade). Além disso, Brinsko *et al.* (1994) não observaram diferenças na qualidade

dos embriões, entre os grupos de éguas jovens e velhas. Entretanto, os embriões oriundos de éguas jovens, quando cultivados em meio contendo secreção da tuba uterina de éguas velhas subférteis, apresentaram qualidade inferior, em relação aqueles cultivados em meio contendo secreção da tuba de éguas jovens.

A eficiência reprodutiva de éguas também está relacionada à habilidade do útero em manter um ambiente propício ao desenvolvimento do embrião. Além do fator idade, as alterações endometriais decorrentes do envelhecimento exercem grande influência sobre a redução dos índices de fertilidade (Waelchli, 1990). Desta forma, em um trabalho conduzido por Brinsko *et al.* (1994) foram obtidos melhores resultados quanto à recuperação embrionária/ovulação em éguas jovens (02 a 07 anos), que apresentaram uma eficiência reprodutiva superior às éguas mais velhas (17 a 24 anos), sendo as últimas portadoras de alterações histológicas endometriais mais graves ($p<0,001$).

Em estudo conduzido por Carnevale e Ginther (1992), observou-se uma taxa de gestação inferior (32%), seguida por uma maior taxa de perda embrionária (62%) no grupo de éguas apresentando idade superior a 15 anos, em relação ao grupo formado por éguas com idade entre 05 e 07 anos, cuja taxa de gestação foi de 100% e a de perda embrionária de 11%. Tais resultados podem advir da menor contratilidade uterina apresentada pelo grupo de éguas mais velhas, da fixação tardia da vesícula embrionária, das alterações endometriais representadas por extensa infiltração de células inflamatórias, da fibrose uterina e da baixa proporção de glândulas endometriais em relação às éguas jovens. A presença de fluido intraluminal detectado utilizando exame ultrassonográfico também foi maior em éguas velhas.

A presença de cistos endometriais também influencia a qualidade do ambiente uterino. Eles são descritos como estruturas vesiculares repletas de fluido que podem ocorrer em qualquer local do endométrio sadio ou cronicamente inflamado, de forma única ou múltipla (Kenney e Ganjam, 1975; Silva, 1991; Stanton *et al.*, 2004) e, são classificados em dois tipos: glandular ou linfático (Stanton *et al.*, 2004).

Os cistos glandulares estão localizados na lâmina própria e são frequentemente causados pelo efeito de estrangulamento observado em casos de fibrose periglandular, levando a distensão das glândulas endometriais. Este tipo de fibrose compromete a função glandular, tendo como principal resultado a separação entre epitélio glandular e a rede normal de capilares adjacentes. A distensão cística das glândulas ocorre como resultado de uma menor secreção que ocorre por redução da saída do conteúdo, induzida pela redução do tônus miométrial. Essa alteração na contratilidade do miométrio é comumente encontrada em éguas pluríparas com idade avançada e também naquelas subférteis (Kenney e Ganjam, 1975; Stanton *et al.*, 2004).

Já os cistos endometriais linfáticos começam como pequenas estruturas microscópicas que aumentam de tamanho, podendo chegar a mais de 20 cm de diâmetro, tendo uma importância clínica muito significativa quando se projeta em direção ao lúmen uterino, onde são vistos como coleções de fluidos linfáticos no endométrio ou miométrio (Stanton *et al.*, 2004). Geralmente, são resultantes da obstrução de canais linfáticos ou da evolução de lacunas linfáticas e ocorrem, principalmente, em éguas pluríparas pelo efeito gravitacional atuando no útero e que aumenta durante a gestação ou no pós-parto (Silva, 1991; Stanton *et al.*, 2004). Éguas com drenagem linfática deficiente tendem a acumular conteúdo no útero (LeBlanc, 1997; Nogueira *et al.*, 2007), apresentar cistos linfáticos visíveis à ultrassonografia e são, frequentemente, inférteis (LeBlanc, 1997).

Segundo Silva (1991), a frequência dos cistos é significativamente maior naquelas éguas com idade avançada, o que demonstra a existência de associação entre a sua presença e a faixa etária dos animais. A maior parte das éguas afetadas tem idade superior a 10 anos, sendo a sua ocorrência esperada, em uma população que inclui éguas férteis e sub-férteis, de 13 a 22%. Em éguas com idade entre 07 e 14 anos a incidência dos cistos chega a 29,1%, enquanto naquelas com idade superior a 14 anos, o valor encontrado é bem mais significativo, correspondendo a 73,1% (Tannus e Thun, 1995).

Vários autores descreveram o efeito negativo dos cistos endometriais sobre a fertilidade, envolvendo a redução das taxas de gestação e

aumento das perdas embrionárias precoces. Entretanto, quando a idade das éguas foi considerada na análise dos dados, não houve relação significativa entre a presença dos cistos endometriais e o aumento de perdas embrionárias precoces, indicando que estas perdas podem ser decorrentes da idade avançada das éguas e não da presença dos cistos (Vanderwall, 2008).

Com o aumento da idade e do número de gestações, o útero passa a ocupar uma posição mais crânio-ventral no abdômen, devido ao estiramento do ligamento largo, culminando na perda do suporte estrutural caudal do aparelho genital (LeBlanc, 2003). Paralelamente a estas situações, observa-se a dilatação das glândulas endometriais e fibrose periglandular (Hurtgen, 2006). Assim, a limpeza uterina se torna deficiente, ocorrendo acúmulo de fluido intraluminal e inflamação, uma vez que a contratilidade do miométrio, a drenagem linfática e a vascularização uterina apresentam-se comprometidas em éguas com idade avançada, tornando-as mais susceptíveis à ocorrência de endometrites (LeBlanc, 2003).

A adequada anatomia da região perineal constitui uma importante barreira de proteção frente às infecções. A comissura dorsal da vulva não deve distar mais de 04 cm do assoalho pélvico, evitando-se que a vulva assuma uma posição mais horizontal, o que favoreceria a ocorrência de pneumovagina (Greenhoff e Kenney, 1975). Observou-se um aumento significativo da extensão da vulva que se projeta acima do assoalho pélvico à medida que as éguas envelheceram (Pascoe, 1979).

O aumento da idade está relacionado à queda nas taxas de gestação. Observa-se índices estáveis de fertilidade em éguas com idade entre 02 e 13 anos, decaindo a partir dos 14 anos. As taxas de gestação e de perdas gestacionais foram de 56% e 12% para as éguas de 02 a 05 anos; 55% e 14% para aquelas de 06 a 09 anos de idade; de 60% e 9% de 10 a 13 anos; de 51% e 14% dos 14 aos 17 anos de idade; de 45% e 24% de 18 aos 21 anos de idade e de 33% e 33% para aquelas éguas com idade superior a 21 anos (Woods *et al.*, 1987).

Ao trabalharem com éguas Puro Sangue Inglês, com idade variando entre um e 30 anos, durante duas estações de monta consecutivas, McDowell

et al. (1992), observaram uma relação direta entre a redução do número de potros nascidos e o aumento da idade das éguas ($p < 0,0001$). A percentagem de potros nascidos foi maior no grupo de éguas com idade entre três e 10 anos, havendo uma queda progressiva da eficiência reprodutiva a partir daí. Apenas uma égua das 32 que participaram do trabalho e que apresentavam 27 anos de idade, produziu um potro, enquanto nenhuma égua, das 28 com idade entre 28 e 30 anos, pariu durante o período experimental.

Valle *et al.* (1999) avaliando o efeito da idade sobre a fertilidade de éguas, observaram uma queda da fertilidade relacionada ao aumento da idade, representada pela redução da taxa de gestação/ciclo. Assim, ao avaliarem 147 ciclos estrais de 99 éguas, divididas em grupos de 03 a 06 anos; 07 a 10 anos; 11 a 14 anos e 15 a 19 anos, observaram percentuais de gestação/ciclo de 62,07%; 63,64%; 52,50% e 29,41%, respectivamente. Morris e Allen (2002) também observaram um maior nascimento de potros (86,6%), advindos de éguas entre 03 a 08 anos de idade, em relação às de 14 a 18 anos. Observou-se ainda que a taxa de perda gestacional apresentou-se maior no grupo de éguas mais velhas em relação às jovens. Em éguas utilizadas para a produção de muare, Jordão *et al.* (1954) observaram que as apresentando idades entre 9 e 11 anos responderam pelas maiores taxas de fertilidade, quando comparadas às com idade entre 21 e 23 anos. Já as fêmeas mais jovens (de 03 e 05 anos) apresentaram uma fertilidade superior à média geral.

2.1.2.2. Efeito da categoria reprodutiva

As fêmeas equinas podem ser classificadas em quatro categorias reprodutivas diferentes: potra, compreendendo aquelas fêmeas que nunca pariram; égua solteira, categoria composta pelas fêmeas que não emprenharam na estação de monta anterior; égua parida, representada pelas fêmeas com potro ao pé e, finalmente, as no “cio do potro”, correspondendo às que se encontram no primeiro ciclo reprodutivo após a parição. Tem sido descrito que as potras e as éguas paridas apresentaram maior potencial de fertilidade (70 a 100%) quando comparadas às éguas solteiras por uma estação de monta (50 a 70%), às éguas solteiras por mais de duas estações reprodutivas consecutivas (25 a 50%) e

também às éguas com idade avançada, susceptíveis às infecções ($< 25\%$) (Von Lepel, 1975). Desta forma, considera-se como categorias de alta fertilidade as potras e as éguas paridas, diferindo das éguas solteiras, as quais apresentaram fertilidade reduzida e que permaneceram vazias na estação reprodutiva anterior (Morris e Allen, 2002).

Em estudo realizado por Woods *et al.* (1987), a categoria reprodutiva não influenciou a taxa de perda gestacional, que apresentou um valor médio de 13%. Também neste trabalho observou-se maior taxa de gestação em potras (58%), em comparação à categoria de éguas solteiras (47%) e das éguas no pós-parto (56%). Já Chevalier-Clément (1989) observaram maior ocorrência de perdas gestacionais em éguas no “cio do potro” (11,1%; $p < 0,001$), em comparação às potras (4,9%), às éguas solteiras (5,4%) e às éguas paridas (7,6%), quando estudou-se a influência da categoria reprodutiva sobre as taxas de perdas gestacionais. Entretanto, tal influência não foi evidenciada sobre as taxas de reabsorção embrionária.

O desempenho reprodutivo de fêmeas jovens foi estudado por Nishikawa (1959). Neste estudo, recomendaram a utilização de fêmeas que já tivessem atingido a maturidade sexual, ou seja, somente as potras com idade superior a três anos deveriam ser incluídas no manejo reprodutivo. Entretanto, em programas reprodutivos em que fêmeas com dois anos de idade e desenvolvimento corporal adequado foram utilizadas, alcançou-se taxas de gestação de 79,2% e taxas de partos de 76,6%.

Em um trabalho realizado por Silva (1988), observou-se alta incidência de atresia folicular em potras (21,4%), sendo que nas demais éguas, este percentual foi de 3,5%. Resultados similares foram encontrados por Palhares (1989), quando a incidência de atresia folicular foi de 9,29% para potras e de apenas 2,22% para as éguas.

O desempenho reprodutivo de 137 potras com 12 a 14 meses de idade foi avaliado durante quatro estações de monta consecutivas. Destas 137 fêmeas, 95 (69,34%) conceberam, sendo que 44 (46,32%) delas sofreram aborto espontâneo. Foram realizados exames adicionais, não sendo detectada a presença de agentes infecciosos causadores de perdas gestacionais. Além disso,

as concentrações de gonadotrofina coriônica equina (eCG) apresentaram padrões similares entre as fêmeas que perderam e as que mantiveram as gestações. Desta forma, considerou-se como principal fator responsável pela alta incidência de perdas gestacionais, a imaturidade das fêmeas púberes utilizadas neste trabalho (Mitchell e Allen, 1975). Tais resultados evidenciam a necessidade de um período pós-adolescência para o completo desenvolvimento reprodutivo, pois observa-se um aumento considerável do tamanho dos órgãos genitais no decorrer da puberdade na espécie equina (Andrade, 1986).

Ainda enfocando o efeito da categoria reprodutiva sobre a fertilidade, Ferreira (1993) utilizou sêmen de jumento para a inseminação de éguas e obteve taxas de gestação de 81,8% para as potras, 93,7% para as éguas solteiras e de 81,8% para as éguas com potro ao pé. Segundo a autora, as taxas de gestação superiores obtidas pelas éguas solteiras, podem advir do fato de terem sido deixadas vazias, voluntariamente, na estação anterior, ou por algum problema reprodutivo transitório que não comprometeu a sua fertilidade, avaliada na estação de monta subsequente.

Em éguas, o retorno da atividade ovariana pós-parto é o mais rápido dentre as fêmeas domésticas de grande porte. O primeiro ciclo estral pós-parto é chamado de “cio do potro”, sendo a sua ocorrência observada de cinco a vinte dias após o parto (McKinnon e Voss, 1993; Godoi *et al.*, 2002). Este cio tem sido caracterizado por falhas de ovulação inferiores a 10% (Palhares, 1989; Heidler *et al.*, 2003). Diferentemente de outras espécies, a atividade ovariana em éguas não é bloqueada pelo estímulo da mamada e/ou pela presença do potro (Nagy *et al.*, 1998; Godoi *et al.*, 2002; Deichsel e Aurich, 2005). Desta forma, a ocorrência de anestro lactacional dificilmente acontece e, quando presente, está diretamente relacionado ao fotoperíodo, podendo ser observado naquelas fêmeas que pariram durante o período de transição, caracterizado por baixa luminosidade (Ginther *et al.*, 1994; LeBlanc, 2005).

Vários autores descrevem taxas de gestação reduzidas em éguas cobertas no “cio do potro” (Caslick, 1937; Ginther, 1979; Merkt e Gunzel, 1979). Entretanto, muitos fatores podem levar a

queda de fertilidade observada neste período, dentre eles, a presença de involução uterina incompleta (Saltiel *et al.*, 1987), bem como a ocorrência de processos inflamatórios do endométrio (Gigax *et al.*, 1979). A involução uterina pode ser relacionada ao intervalo entre o parto e a ovulação, uma vez que os mecanismos envolvidos no processo de involução, tais como a contração uterina, a eliminação de conteúdo uterino, o restabelecimento da superfície epitelial e a fagocitose bacteriana, são estimulados pelas concentrações de estrógenos circulantes (Evans *et al.*, 1986; Hayes e Ginther, 1986; Jones *et al.*, 1991). Tem sido estabelecido que para uma adequada reparação do endométrio uterino após o parto são necessários 14 dias (McKinnon e Voss, 1993; Volkmann, 2006). Desta forma, Loy (1980) e Bell e Bristol (1987) observaram uma taxa de gestação mais elevada naquelas éguas que ovularam após o 10º dia pós-parto. Resultados similares foram citados por McKinnon *et al.* (1988), quando a taxa de gestação foi superior naquelas éguas que ovularam 15 dias após o parto.

Em um trabalho envolvendo éguas da raça árabe, cobertas por monta natural, El-Wishy *et al.* (1990) obtiveram uma taxa de parto de 33% nas fêmeas cobertas nos primeiros oito dias pós-parto, 11% inferior ($p < 0,05$) ao das cobertas acima de nove dias após a sua ocorrência. Com relação à ocorrência de perdas gestacionais, estas foram observadas apenas nas éguas cobertas nos primeiros 10 dias pós-parto (4,3%). Resultados similares foram descritos por Mattos *et al.* (1991), quando observou-se taxas de gestação de 35% para éguas que ovularam até o 10º dia pós-parto, de 42% para as que ovularam entre o 11º e o 14º dia pós-parto e de 50% para as que ovularam após o 15º dia do pós-parto.

Tem sido observado um maior número de reabsorções embrionárias no “cio do potro” (17%) em comparação ao segundo cio pós-parto (11%), aos cios subsequentes (7%), e às éguas solteiras (2%), da última estação de monta. Estes resultados demonstram que a fertilidade pode estar reduzida em éguas durante o período de lactação (Merkt, 1967). Além disso, Merkt e Gunzel (1979) observaram maiores taxas de perdas embrionárias em éguas lactantes (9,41%), quando comparadas às de éguas solteiras (2,83%) e às potras (0,70%), sendo que das

fêmeas lactantes que reabsorveram, 38,6% haviam sido cobertas no “cio do potro”.

De acordo com Reiner *et al.* (1988), uma vez que o parto não tenha complicações e que a égua esteja sadia, a utilização do “cio do potro” para cobertura é válida, visto que se ganha tempo, além de se evitar que as fêmeas entrem em anestro. Segundo Almeida *et al.* (1995) não há diferenças entre a fertilidade no “cio do potro” e nos cios subsequentes, não tendo sido observadas diferenças estatísticas entre as taxas de gestação e de perda embrionária para éguas cobertas no “cio do potro” (até o 18º dia pós-parto) e éguas paridas.

No mesmo sentido, Fernandes *et al.* (1995) avaliaram a eficiência reprodutiva de 1255 éguas PSI durante cinco estações. As taxas de gestação e as de gestação/ciclo, respectivamente, não diferiram ($p>0,05$) entre as diferentes categorias: lactantes (80% e 52%), éguas solteiras (84% e 49%) e potras (85% e 49%). Entretanto, a taxa de reabsorção embrionária foi maior no “cio do potro” para a categoria de éguas lactantes (6,2%), em relação às demais (2,8% para éguas solteiras e 0% para as potras). Em cinco ciclos, observou-se uma redução da taxa de gestação ($p<0,01$) a partir do terceiro ciclo (50%; 43%; 28%; 16% e 1%), porém, sem que houvesse diferenças ($p>0,05$) entre as categorias.

Também Camillo *et al.* (1997) utilizaram o “cio do potro” para a inseminação de éguas com sêmen a fresco diluído em diluidor a base de leite desnatado. A taxa de gestação, ao primeiro ciclo, a taxa de gestação/ciclo e o número de ciclos/gestação obtidos foram de 71,9%, 69,3% e 1,4 respectivamente, sendo estes valores similares aos observados em éguas inseminadas pela primeira vez, no segundo cio pós-parto, de 84,6%, 76,5% e 1,3 e nas não lactantes, de 77,8%, 73,2% e 1,4.

Rossi (2008) avaliou a eficiência reprodutiva de 208 éguas inseminadas com sêmen asinino diluído em diluidores à base de leite em pó desnatado-glicose ou glicina-gema de ovo, à fresco ou resfriado, sendo os resultados de fertilidade similares ($p>0,05$) entre potras, éguas solteiras, éguas paridas e éguas no “cio do potro”.

2.1.2.3. Hormônios e protocolos utilizados para o controle do cio e da ovulação em éguas

A égua é classificada como poliestral sazonal por apresentar vários ciclos estrais durante determinada estação do ano (McKinnon e Voss, 1993; Blanchard *et al.*, 1998). Denomina-se como ciclo estral, o período compreendido entre uma ovulação e outra subsequente, no qual são observados sinais de estro e/ou concentração plasmática de progesterona inferior a 1ng/mL. O ciclo estral é composto por duas fases: folicular e lútea (McKinnon e Voss, 1993; Blanchard *et al.*, 1998).

A fase folicular (estro) é caracterizada por um período de receptividade sexual ao garanhão, bem como pela preparação do sistema genital da fêmea para receber e transportar os espermatozoides até a tuba uterina para a fertilização (Ginther, 1992). A fase folicular nas éguas caracteriza-se pela fase final de crescimento folicular culminando com a ovulação e produção de altas concentrações de estrógeno pelas células da granulosa. Já a fase lútea (diestro) representa o período em que a fêmea não aceita o macho, estando o sistema genital preparado para nutrir e receber o embrião (Blanchard *et al.*, 1998). No momento da ovulação, ocorre a ruptura do folículo com posterior desenvolvimento do corpo lúteo, estrutura responsável pela secreção de progesterona, fazendo com que a fêmea rejeite o garanhão. O fim desta fase é marcado pelo momento em que ocorre a lise desta estrutura, por volta do 14º a 15º dia pós-ovulação, dando início ao estro no primeiro ou segundo dia subsequente (McKinnon e Voss, 1993).

Durante a estação ovulatória (primavera e verão), o ciclo estral das éguas tem duração média de 21 dias, apresentando uma ou duas ondas de crescimento folicular (Ginther, 1992). Nas éguas observam-se dois tipos de ondas foliculares: ondas maiores ou ovulatórias, caracterizadas pela presença de folículos dominantes e subordinados, e ondas menores, quando não se observa dominância entre os folículos, que tendem a regridir. As ondas ovulatórias compreendem uma série de fenômenos denominados recrutamento, divergência ou seleção e dominância (Ginther, 2000).

A atividade ovariana, as alterações no sistema genital feminino e o comportamento sexual são controlados por interações entre os hormônios hipotalâmicos, hipofisários, ovarianos e uterinos. Os hormônios envolvidos neste controle são o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) produzido pelo hipotálamo; as gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), sintetizados pela adeno-hipófise; os esteroides (progesterona e estradiol); os hormônios peptídicos (inibina), sintetizados nos ovários, bem como a prostaglandina F2 α (PGF2 α), secretada pelo endométrio (McKinnon e Voss, 1993).

O GnRH é um decapeptídeo, sintetizado e armazenado em núcleos no hipotálamo, notadamente nas áreas pré-óptica e no hipotálamo ventro-medial. Ele é responsável pelo controle da liberação do FSH e do LH pela adeno-hipófise. A sua secreção pode ser controlada por hormônios esteroides (estradiol e progesterona) e peptídeos (inibina) do ovário. Entretanto, a sua liberação basal é determinada por impulsos neurais ou hipotalâmicos (Frandsen *et al.*, 2005). A frequência dos pulsos de GnRH é controlada pela liberação da melatonina. Uma baixa frequência ocorre durante o anestro, devido à alta concentração de melatonina encontrada em períodos de menor luminosidade, como observa-se no outono e no inverno. A frequência de liberação do GnRH também encontra-se reduzida durante o diestro, devido ao *feedback* negativo exercido pelas elevadas concentrações de progesterona. A liberação de gonadotrofinas pela hipófise anterior é mediada pela frequência de pulsos do GnRH (Knottenbelt *et al.*, 2003).

Os hormônios hipofisários gonadotróficos mais importantes são o FSH e o LH, que estimulam algumas das células ovarianas e testiculares. Estes hormônios são classificados como glicoproteicos, tendo o FSH a função principal de estimular o desenvolvimento e a maturação folicular, além da produção de estrógeno pelos ovários na presença do LH (Hafez e Hafez, 2004). Já o LH é responsável por induzir modificações estruturais no folículo, culminando na ruptura do mesmo, caracterizando a ovulação e também participa do processo de maturação oocitária. Além disso, o LH possui ação luteotrófica e estimula a formação do corpo lúteo, responsável pela síntese de progesterona (Reece, 1996). As concentrações plasmáticas de

LH são baixas nos dias 6 a 15 após a ovulação, devido ao *feedback* negativo da progesterona no hipotálamo, causando a supressão do GnRH, que resulta em uma menor secreção de LH pela hipófise. As concentrações de LH começam a aumentar próximo ao início do estro, quando já não existe efeito da progesterona, provavelmente, devido ao estímulo positivo do estrógeno, influenciando a frequência de pulsos do GnRH. O pico de LH ocorre dois dias após a ovulação e então declina lentamente. Devido à sua longa meia-vida, o LH atinge concentrações basais em torno de 05 a 06 dias pós-ovulação (Knottenbelt *et al.*, 2003).

O estrógeno é um hormônio esteroide, sintetizado pelos ovários, cuja concentração atinge o pico um a dois dias antes da ovulação, decrescendo até atingir concentrações basais, dois dias após a sua ocorrência. Na ausência de progesterona (concentrações <1ng/mL), o estrógeno secretado pelo folículo pré-ovulatório induz a receptividade sexual, associada ao relaxamento da cérvice e da vulva; estimula a produção de secreções do sistema genital, de forma a permitir a passagem e o transporte espermático; exerce influência na maturação folicular e ovulação. O estrógeno é responsável por induzir o aumento do número de receptores para LH nos ovários, aumentando assim a sensibilidade ovariana à ação do LH (McKinnon e Voss, 1993).

A inibina é um hormônio gonadal não esteroide, glicoproteico, hidrofílico, que regula a liberação de FSH pelo mecanismo *feedback* negativo sobre a hipófise (Squires e Seidel, 1995; Senger, 2003; Hafez e Hafez, 2004). Ela é produzida pelas células da granulosa dos ovários de mamíferos durante a fase folicular (Nambo *et al.*, 2002) e atua, na hipófise, como um sinalizador químico que inibe a liberação de FSH, sem alterar a concentração de LH, controlando assim o desenvolvimento folicular (Hafez e Hafez, 2004).

A progesterona, assim como o estrógeno, é um hormônio esteroide que exerce grande importância na regulação do sistema genital feminino. Ela é liberada principalmente pelo corpo lúteo, mas também pela placenta em determinado período da gestação. O LH é o principal estimulador da secreção ovariana de progesterona (Reece, 1996), uma vez que age

como indutor da ovulação e, consequentemente, sobre a formação do corpo lúteo, estrutura ovariana produtora de progesterona. Ela exerce função de preparar o endométrio para implantação e manutenção da gestação, aumentando a atividade secretora das glândulas endometriais e inibindo a motilidade do endométrio. Além disso, é capaz de inibir o estro e a liberação de LH em concentrações elevadas. Desta forma, a progesterona é um importante regulador do ciclo estral (Hafez e Hafez, 2004).

As prostaglandinas são ácidos graxos não-saturados, secretadas por vários tecidos do organismo, principalmente pelas células do endométrio. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a prostaglandina E_2 (PGE_2) são derivadas do ácido araquidônico e têm ação de curta duração. Elas são rapidamente metabolizadas e degradadas, apresentando, por isto, baixas concentrações circulantes (Reece, 1996). A $\text{PGF}_{2\alpha}$ atua como hormônio luteolítico, modulando a fase luteal e a duração do ciclo estral em éguas. A ocorrência da luteólise durante o ciclo estral está relacionada ao aumento da liberação uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Na égua, a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ocorre entre 14 e 17 dias pós-ovulação, sendo que o primeiro pulso de $\text{PGF}_{2\alpha}$ precede, em torno de três a quatro horas, o declínio mensurável de P_4 . A partir daí, as concentrações de P_4 decrescem para valores basais (i.e., $<1\text{ng/mL}$), dentro de 24 a 48 horas, embora a liberação pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se mantenha por um a dois dias após a completa luteólise (Allen e Cooper, 1993).

A PGE_2 exerce um importante papel no transporte de gametas e do embrião, por controlar a função da musculatura lisa da tuba uterina (Woods *et al.*, 2000). O embrião equino secreta uma quantidade significativa de PGE_2 , quando atinge o estágio de desenvolvimento de mórula compacta, no 5º dia após a ovulação. Esse hormônio age localmente, relaxando as fibras da musculatura circular lisa da parede da tuba, de forma a permitir a ocorrência de um movimento progressivo rápido, que resulta na entrada do embrião no útero 24 horas depois (Allen, 2001).

A fase de crescimento normal dos folículos tem duração média de seis dias nas éguas. Ela inicia-se com o aparecimento de uma onda folicular, estendendo-se até o início da fase de divergência. Cerca de sete a 11 folículos, com 6 mm de

diâmetro em média, são observados nesta fase (Squires *et al.*, 1986). A fase de divergência é caracterizada pelo crescimento contínuo do maior folículo da onda, que se torna dominante, acompanhada pela redução ou cessação do crescimento dos demais folículos, denominados subordinados. A diferença entre os diâmetros do futuro folículo dominante e dos subordinados ocorre de forma gradual desde o surgimento da onda, uma vez que o futuro folículo dominante surge, em média, no dia anterior aos demais. Os diâmetros médios dos dois folículos maiores atingem 22,5 mm e 19,0 mm no início da fase de divergência, correspondente a três dias após do pico de FSH. O folículo maior rapidamente bloqueia o crescimento do segundo folículo maior, impedindo que ele atinja diâmetro similar (Gastal *et al.*, 1997).

O aparecimento das ondas foliculares maiores e menores na égua está associado ao aumento da concentração de FSH, que atinge o seu pico quando o folículo maior alcança um diâmetro de 13 mm (Gastal *et al.*, 1997), diminuindo em seguida, de forma a dar início ao fenômeno de divergência folicular da onda ovulatória. A redução da concentração circulatória de FSH é necessária ao estabelecimento da divergência, uma vez que a administração exógena de FSH ou o seu aumento endógeno, proporcionado por vacinas contra a inibina, é capaz de atrasá-la ou até mesmo de impedir a sua ocorrência (Ginther, 2000).

Durante a fase de dominância folicular ocorre a maturação e o crescimento do folículo ovulatório, sendo que ele e os demais (subordinados) regridem totalmente ao sofrerem atresia. O futuro folículo dominante adquire a capacidade de reduzir as concentrações circulantes de FSH, abaixo daquelas necessárias ao crescimento dos demais folículos e de usar essas baixas concentrações de FSH para o seu próprio crescimento e maturação (Ginther, 2000). O LH também exerce importante papel no mecanismo da dominância, crescimento e maturação do folículo dominante (Gastal *et al.*, 2000).

Em éguas cíclicas normais, o estro pode ser induzido pela aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou de seus análogos, na presença de um corpo lúteo funcional, proporcionando o término da fase lútea. A melhor resposta à administração de

PGF2 α é observada entre os dias cinco e dez após a ovulação (Loy *et al.*, 1979).

O intervalo entre a aplicação da PGF2 α e a manifestação do estro é de aproximadamente três a quatro dias, com a ovulação ocorrendo dentro de nove a 10 dias (Squires *et al.*, 1985). No entanto, este intervalo depende do tamanho do maior folículo, em um dos ovários, no momento da sua administração (Loy *et al.*, 1979). As elevadas concentrações sanguíneas de progesterona, durante a fase lútea, não inibem a liberação de FSH, permitindo que o crescimento folicular continue durante o diestro. Desta forma, há folículos de vários tamanhos e em diferentes estádios de crescimento durante a fase lútea. Quando um grande folículo em crescimento está presente no momento do tratamento com PGF2 α , é possível que a ovulação ocorra em até 72 horas, sem manifestação de sinais externos de estro. Entretanto, no caso de um folículo atingir seu diâmetro máximo durante a fase de domínio da progesterona, este irá regredir, sendo um novo grupo de folículos recrutado, com consequente atraso da manifestação do estro e da ovulação (Samper *et al.*, 1993).

Desta forma, para sincronizar o estro em um grupo de éguas cíclicas, em diferentes estádios do ciclo estral, o regime de duas aplicações de PGF2 α , desenvolvido para bovinos foi adaptado. O intervalo entre as administrações de PGF2 α varia entre 14 e 15 dias em muitos estudos (Palmer, 1993). Com a utilização deste protocolo observou-se que 77,8 a 92,0% das éguas tratadas exibiram estro dentro de até seis dias após a segunda aplicação (Squires *et al.*, 1981).

A indução da ovulação em éguas cíclicas é realizada com o intuito de melhorar o manejo reprodutivo e sincronizar a ovulação o mais próximo possível da cobertura, ou da inseminação. Quando a monta natural ou o sêmen a fresco são utilizados, o intervalo entre a inseminação e a ovulação pode variar de 0 a 48 horas e até mesmo envolver um maior período, dependendo do garanhão. Entretanto, ao se utilizar o sêmen congelado, uma maior acurácia é necessária, devendo ser o período menor que 24 horas (Palmer, 1993).

O protocolo de indução da ovulação consiste na administração de agentes indutores, na presença de um folículo de 30 a 35 mm de diâmetro em

um dos ovários, quando o mesmo encontra-se totalmente responsivo ao LH (Palmer, 1993). Após a indução, a ovulação é observada dentro de uma amplitude de 36 à 48 horas, na maioria das éguas, o que demonstra uma variação individual acentuada, podendo estar relacionada ao diâmetro ovulatório de cada animal (Samper, 1997).

Os graus de edema endometrial refletem alterações nas concentrações circulantes de estrógeno e progesterona e no comportamento sexual (Hayes *et al.*, 1985), devendo também ser levado em consideração ao se determinar o momento adequado para a indução da ovulação. O exame ultrassonográfico é de fundamental importância, neste momento, pois permite a mensuração do diâmetro folicular de maneira precisa e a classificação do escore de edema endometrial (variando de 0 a 5, sendo 0 a ausência de edema e 5 o edema máximo). De acordo com Samper (1997), a indução da ovulação com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) quando o escore de edema encontra-se entre 4 e 5, associado a um folículo entre 35 a 40 mm de diâmetro, apresenta 95% de eficácia nos dois primeiros ciclos.

A hCG tem sido amplamente utilizada durante anos visando diminuir o período do estro e antecipar a ovulação, mostrando-se eficiente quando administrada na presença de um folículo com pelo menos 35 mm de diâmetro. Neste contexto, ela tem sido capaz de induzir a ovulação dentro de 48 horas, em 80% dos casos. No entanto, a distribuição das ovulações em éguas tratadas com hCG pode variar de zero a mais de 72 horas (Barbacini, *et al.* 2000). Uma única dose de hCG é utilizada para induzir a ovulação. Aparentemente não existe um padrão ou concentração preferencial por dose, que varia entre 1000 UI a 6000 UI ou mais, sendo que na maioria das vezes, utiliza-se doses entre 2000 a 3000 UI (Bergfelt, 2000). Em um trabalho realizado por Rozas (2005), observou-se que 64,70% das jumentas ovularam entre 36 e 48 horas após a administração de 5000UI de hCG por via endovenosa, sendo que 70,58% ovularam antes de 72 horas da administração da hCG. Já Castejón (2005), administrou 5000 UI de hCG, na presença de um folículo ovariano de 36 mm de diâmetro, em 18 ciclos reprodutivos de seis jumentas, observando que todas as ovulações

ocorreram dentro do intervalo de 36 a 48 horas após a indução.

Apesar de muito utilizada como agente indutor da ovulação, a hCG induz a formação de anticorpos após aplicações sucessivas (Duchamp *et al.*, 1987). Neste sentido, Roser *et al.* (1979) demonstraram que a formação de anticorpos inicia-se após duas a cinco injeções de hCG, embora não tenham observado ocorrência de refratariedade devido às altas taxas de anticorpos, discordando dos resultados de Sullivan *et al.* (1973), os quais observaram uma refratariedade após a terceira administração da hCG. Entretanto, Barbacini *et al.* (2000) não observaram redução na resposta ovulatória, após repetidas aplicações de hCG. Já McCue *et al.* (2004) também descreveram que repetidas doses de hCG, durante a estação de monta, foram acompanhadas por uma menor eficácia na indução da ovulação, o que os levaram a sugerir a utilização deste agente no máximo duas vezes por estação.

Outra desvantagem do uso da hCG seria a insensibilidade dos ovários de éguas mais velhas à sua administração. Barbacini *et al.* (2000) observaram que a percentagem de éguas que ovularam, dentro de 48 horas após a administração da hCG, foi inferior nas éguas com idade superior a 16 anos. McCue *et al.* (2004) também observaram uma redução no percentual de ovulações entre 24 e 48 horas após a indução, nas éguas com idade avançada (acima de 15 anos).

De acordo com Duchamp *et al.* (1987), a utilização de uma dose de dexametasona (20mg de fosfato de sódio de dexametasona + 40mg fenilpropionato de dexametasona) simultaneamente ao hCG, no intuito de inibir a formação de anticorpos, não foi eficiente. Entretanto, os mesmos autores relataram a possibilidade de uma única dose não ser eficaz, a ponto de inibir o sistema imunológico.

A administração do GnRH e seus análogos também pode ser utilizada para o controle do ciclo estral em éguas. O uso do GnRH sintético durante o estro estimula a liberação de LH e reduz a duração deste período. O desenvolvimento de agonistas e análogos de GnRH aumentou a meia vida deste hormônio, acompanhando as modificações estruturais no

GnRH natural, que resultaram no aumento das concentrações de LH por 12 a 24 horas após a administração dos mesmos (Bergfelt, 2000).

A buserelina é um dos agonistas do GnRH mais utilizado na espécie equina, demonstrando bons resultados quando administrada duas vezes ao dia, na presença de um folículo de 35 mm (Squires *et al.*, 1981).

O acetato de deslorelina é um análogo do GnRH que foi primeiramente disponibilizado na forma de implantes subcutâneos (Ovuplant®). Tem sido observado que quando aplicado via intramuscular em éguas exibindo sinais de estro, na presença de um folículo de no mínimo 30 mm de diâmetro, induz a ovulação entre 36 e 48 horas após a inserção do implante (Jochle e Trigg, 1994).

Ao utilizarem este implante (Ovuplant®), Samper *et al.* (2002) observaram que 100% das éguas ovularam dentro de 42 horas após a sua inserção. Neste mesmo estudo, observou-se que as ovulações foram distribuídas dentro de um menor período nas éguas tratadas com Ovuplant® (entre 36 e 42 horas), quando comparadas às tratadas com 2500 UI de hCG (entre 28 e 96 horas). Entretanto, o implante de deslorelina não está mais disponível comercialmente, devido a relatos de inibição da hipófise e longos intervalos interovulatórios, em uma percentagem das éguas que não se tornaram gestantes, após a sua inserção. Aparentemente, o implante permanece liberando o análogo GnRH alguns dias após a ovulação, o que resulta na dessensibilização da hipófise e redução da liberação de FSH, acompanhada por um crescimento folicular reduzido (Squires, 2008).

Em fêmeas bovinas, o implante de 700µg de deslorelina induziu a ovulação quando utilizado em protocolos Ovsynch ou no quinto dia do ciclo estral (Ambrose *et al.*, 1998; Rajamahendran *et al.*, 1998). Além disso, o implante induziu uma maior secreção de LH quando comparado à buserelina (Rajamahendran *et al.*, 1998), o que melhorou a diferenciação do corpo lúteo, resultando em maiores concentrações de progesterona (Ambrose *et al.*, 1998).

Ao utilizarem implantes contendo 450 ou 750 µg de deslorelina, em protocolos de inseminação em tempo fixo em vacas, Santos *et al.* (2004)

observaram que os animais tratados com deslorelina apresentaram corpo lúteo com produção de progesterona em concentrações normais. Entretanto, observaram um retorno retardado ao estro nas fêmeas que não se tornaram gestantes, com redução da população folicular no dia 27 após o tratamento e supressão da resposta ao GnRH, durante uma nova sincronização. Além disso, as perdas gestacionais entre os dias 27 e 41 de gestação, tenderam a ser menores no grupo tratado com 450 µg de GnRH, em relação às observadas no grupo controle, cujas fêmeas receberam apenas 100 µg de GnRH.

Em virtude dos efeitos negativos associados ao longo período de liberação da deslorelina, quando utilizou-se os implantes subcutâneos, a forma injetável foi desenvolvida. Neste sentido, McCue *et al.* (2007) compararam a eficiência da hCG e da deslorelina injetável, contendo 1,5 mg de deslorelina por mL, como agentes indutores da ovulação. A percentagem de éguas ovulando dentro de 48 horas após o tratamento não diferiu entre os grupos. Também não foram observadas diferenças quanto ao intervalo de tempo do tratamento à ovulação, bem como na percentagem de éguas ovulando até 48 horas após o tratamento, nas fêmeas equinas que receberam deslorelina por mais de um ciclo estral. Além disso, nenhuma evidência de retorno retardado ao estro foi observada nos animais tratados com a deslorelina injetável.

Três estudos compararam o Ovuplant com a hCG e observaram intervalos do tratamento à ovulação, respectivamente, de 47,52 e 45,12 horas (McKinnon *et al.*, 1993), 46,9 e 43,0 horas (Meinert *et al.*, 1993) e 52,8 e 52,8 horas (Vanderwall *et al.*, 2001). Melo *et al.* (2005) compararam o uso da deslorelina (1 mg/IM) com o extrato de pituitária equina (EPE) (10 mg/IV), concluindo que ambos os agentes foram eficientes para a indução da ovulação, sendo os intervalos da administração da deslorelina e do EPE à ovulação, respectivamente, de 38,9 e 34,7 horas.

Samper *et al.* (2002) compararam o uso da hCG (Chorulon®, Intervet) com a deslorelina (Ovuplant® – Pharmacia e UpJohn Co), nas doses de 2.500 UI e 2,2 mg, respectivamente. As éguas foram distribuídas aleatoriamente nos dois grupos, sendo a ovulação induzida na presença

de edema uterino com escore variando de 2 a 4. O intervalo da indução à ovulação foi maior para as éguas que receberam hCG (28 a 96 horas), em relação às que receberam deslorelina (36 a 42 horas).

Dentre as vantagens da hCG cita-se o baixo custo de administração e a sua maior eficácia, quando aplicada no início da estação reprodutiva, em comparação à deslorelina. A razão para isto é que a hCG atua diretamente no ovário, enquanto a deslorelina estimula a liberação de LH pela adeno-hipófise (Squires, 2008). Estudos demonstraram que o conteúdo hipofisário de LH é limitado no início da estação reprodutiva (Hart *et al.*, 1984), de forma que as éguas não respondem à deslorelina da mesma maneira que à hCG (Squires, 2008).

Os receptores de GnRH, quando estimulados continuamente, bem como uma eventual redução do seu número, são fatores que levam à uma refratariedade deste hormônio, acarretando supressão das gonadotrofinas endógenas. A falta de gonadotrofinas inibe a função reprodutiva, incluindo o desenvolvimento folicular, a ovulação e a fase lútea (Fraser, 1981). A redução do número de receptores aptos nos gonadotrofos tem sido denominada de “down regulation”, e tem sido um eficiente método contraceptivo (Irvine, 1983). Dentre as possíveis causas para a redução nas concentrações de LH e FSH, encontra-se a redução da secreção endógena de GnRH pelo hipotálamo (Crowder *et al.*, 1986), a dessensibilização da hipófise ao estímulo do GnRH e/ou a redução da secreção de LH e FSH pela hipófise. A prolongada supressão das gonadotrofinas pela “down regulation”, seguida do estímulo elevado e constante pelo GnRH é ocasionado, geralmente, pela redução da sensibilidade dos gonadotrófos (Heber e Swerdloff, 1981), mais que pela estimulação do GnRH (Zilberstein *et al.*, 1983).

De um modo geral, acredita-se que as éguas sejam relativamente refratárias à “down regulation” ocasionada pelos análogos do GnRH (Irvine e Alexander, 1993). Em equinos, o tratamento com análogos de GnRH por período prolongado (28 dias), bem como a utilização de altas doses (1,3mg/kg/dia) foi responsável pela redução da concentração de LH, similarmente ao que observou-se em outras espécies (Fitzgerald *et al.*, 1990).

O EPE tem sido usado em diversos protocolos de superovulação em éguas (Douglas *et al.*, 1974; Woods e Ginther, 1983; Alvarenga *et al.*, 1999). Dentro deste contexto, Duchamp *et al.* (1987) demonstraram que uma única administração de 25 mg de EPE, quando da presença de um folículo de 35 mm de diâmetro, foi capaz de induzir a ovulação em 75% das éguas no período entre 24 e 48 horas. No mesmo sentido, Medeiros *et al.* (2005) compararam o uso do EPE, nas concentrações de 10 e 5 mg, por via intravenosa e observaram que ambas as doses foram eficientes para induzir a ovulação dentro de um período de 48 horas. Os intervalos da aplicação das doses de 10 e 5 mg à ovulação foram de $34,40 \pm 6,72$ e $37,54 \pm 3,05$ horas, respectivamente.

Ao contrário da hCG, o EPE não induz a formação de anticorpos, entretanto, deve-se levar em consideração a heterogeneidade das amostras de EPE (Palmer, 1993). Além da eficiência do EPE na indução da ovulação em éguas, outra vantagem é o pequeno intervalo da aplicação à ocorrência da ovulação, o que favorece o uso do sêmen congelado nesta espécie, por reduzir o número de inseminações sem o comprometimento da fertilidade (Melo *et al.*, 2005).

A indução da ovulação é uma importante ferramenta nos protocolos de inseminação com sêmen congelado, uma vez que propicia a realização da inseminação bem próxima da ovulação, refletindo na obtenção de melhores índices de fertilidade. Entretanto, para que possa ser eficiente, a utilização das drogas indutoras de ovulação deve ser realizada com o acompanhamento diário do estro, utilizando-se da palpação transretal e/ou da ultrassonografia, monitorando o crescimento folicular e o edema uterino, para que a administração seja realizada no momento adequado, evitando-se a ocorrência de falhas na ovulação (Melo *et al.*, 2005).

2.1.2.4. Efeito do momento de deposição do sêmen em relação à ovulação

A célula espermática apresenta uma redução da viabilidade e capacidade fecundante após o processo de congelamento e descongelamento, sendo estes capazes de promoverem alterações na membrana plasmática do espermatozoide ou

até mesmo na estrutura do seu DNA (Samper *et al.*, 1991; Brinsko e Varner, 1993; Graham, 1996).

O intervalo entre a inseminação e a ovulação é um fator determinante da fertilidade em éguas (Silva Filho *et al.*, 1998). Uma vez que a inseminação seja realizada pré-ovulação, a fertilização dependerá da viabilidade espermática no sistema genital da égua. Entretanto, se a inseminação for realizada pós-ovulação, a viabilidade do oócito será o fator de maior influência sobre a ocorrência ou não da fertilização (Woods *et al.*, 1990). Além destes, outro fator que deve ser considerado neste momento é o tempo necessário para a ocorrência da capacitação espermática (Silva Filho *et al.*, 1998).

Desta forma, para evitar-se redução nas taxas de gestação, a inseminação artificial com sêmen congelado equino deve ser realizada logo após o seu descongelamento, o mais próximo do momento da ovulação quanto possível. Para isso, um controle folicular usando palpação transretal e/ou acompanhamento ultra-sonográfico se faz necessário, a fim de determinar o momento da ovulação e proceder à inseminação (Brinsko e Varner, 1993).

Em um ejaculado, o macho libera bilhões de espermatozoides que encontram-se em diferentes estádios de maturação. Por outro lado, a fêmea é capaz de liberar apenas um oócito por ovulação. Na espécie equina, o oócito apresenta-se como uma esfera de 120µm de diâmetro, composta por várias organelas citoplasmáticas instáveis (Hunter, 1990). Ele pode ser liberado ainda imaturo, como oócito primário, secundário ou em uma fase intermediária entre os estádios I e II da meiose. Esta variação pode ser observada entre os indivíduos e entre diferentes ciclos de um mesmo indivíduo (Woods *et al.*, 1990), podendo estar relacionada à ausência do pico pré-ovulatório de LH, observada na espécie equina (Hunter, 1990).

Na espécie equina, a viabilidade do oócito é de até 24 a 30 horas, podendo esta longevidade ser devida ao estágio de maturação em que o gameta se encontra quando é liberado (Woods *et al.*, 1990). Entretanto, vale salientar que a partir de 12 horas da liberação do oócito ocorrem mudanças significativas no gameta feminino

que culminam na sua degeneração. O seu envelhecimento é caracterizado pela perda da estabilidade das organelas citoplasmáticas e nucleares, ocorrendo quando este se encontra na tuba uterina, após a ovulação (Hunter, 1990).

O envelhecimento pode ser caracterizado pela perda dos cromossomos da placa metafisária, devido à desorganização dos microtúbulos e/ou pela falha na liberação do conteúdo dos grânulos corticais no espaço perivitelínico, sendo este processo responsável pelo bloqueio da polispermia. Na primeira situação, poderia haver uma maior incidência de morte embrionária precoce, uma vez que o oócito continuaria a sua divisão meiótica, podendo formar um zigoto com alteração cromossômica, caso a fecundação ocorresse. Já na segunda situação, não observa-se a formação de um embrião normal, pois o oócito estaria exposto à ocorrência de múltiplas fertilizações (Hunter, 1990).

Também trabalhando com sêmen congelado de garanhões, Pace e Sullivan (1975) obtiveram uma taxa de parição de 30% para as éguas inseminadas 12 horas pré-ovulação e de 45% para aquelas inseminadas 12 horas pós-ovulação. Além disso, uma queda do percentual de nascimentos foi evidenciada à medida que aumentou-se o intervalo entre a realização da inseminação e a ovulação, sendo de 15% para o intervalo de 12 a 24 horas pré-ovulação e de 10%, para este mesmo intervalo, pós-ovulação. Assim, observou-se um maior número de gestações resultantes de inseminações realizadas 12 horas pós-ovulação, em comparação àquelas realizadas 12 horas pré-ovulação.

Ao realizar inseminações envolvendo o sêmen congelado, Aliev (1980) utilizou os intervalos de 2 a 12; 13 a 24; 25 a 36; 37 a 48 horas pré-ovulação, quando obteve taxas de gestação de 63,4%; 76,0%; 34,1% e 20%, respectivamente. A partir destes resultados, concluiu ser o intervalo de até 24 horas pré-ovulação, o mais adequado para as inseminações com o sêmen congelado. Da mesma forma, Palmer (1984) também obteve melhores resultados quando as inseminações pré-ovulação foram realizadas no intervalo de 0 a 24 horas (38% /ciclo), em relação ao intervalo de 24 a 48 horas (19% /ciclo).

Kloppe *et al.* (1988) obtiveram taxas de gestação satisfatórias para as inseminações realizadas

dentro de até seis horas após a ovulação, ao trabalharem com sêmen congelado. No mesmo sentido, Squires *et al.* (1999) enfatizaram que a inseminação deveria ser realizada dentro de um período de 0 a 24 horas antes da ovulação ou até seis horas após a sua ocorrência, uma vez que o sêmen congelado equino apresenta uma menor habilidade para interagir com as células da tuba uterina da fêmea, mantendo-se viável por menos tempo. Já Barbacini (2009), recomendou um intervalo de 12 horas pré até seis horas após a ovulação, uma vez que as éguas inseminadas com sêmen congelado, realizadas em um período superior à seis horas após a ovulação, apresentaram taxas de gestação reduzidas.

Sieme *et al.* (2003) realizaram uma única inseminação com sêmen congelado, no intervalo entre 12 e 24 horas pré-ovulação, utilizando 800×10^6 espermatozoides/dose, obtendo uma baixa taxa de gestação, de 30,80%. Entretanto, observaram uma elevação significativa da fertilidade quando associaram a esta, outra inseminação dentro de até 12 horas após a ovulação, obtendo uma taxa de gestação de 61,90%. Observou-se um incremento dos resultados de fertilidade à medida que aproximou-se a inseminação do momento da ovulação. Estes autores descreveram ainda, que a viabilidade do sêmen no sistema genital da fêmea depende do processamento a que as células foram submetidas, de forma que para o sêmen congelado, esta viabilidade é, em média, de 12 horas.

Uma única inseminação, realizada após a ovulação, com um total de três a quatro palpções por dia, visando-se detectar o momento da ovulação, foi capaz de gerar bons resultados de fertilidade (Moreira, 2010). Barbacini *et al.* (1999) analisaram dados de 559 éguas inseminadas com sêmen congelado, dentro de um período entre seis horas antes e seis horas após a ovulação, relatando uma taxa de gestação total de 77% e uma taxa de gestação por ciclo de 43%.

Poucos autores avaliaram a influência do intervalo entre a inseminação e a ovulação sobre a fertilidade de jumentas ou éguas inseminadas com sêmen de asininos (Rossi, 2008). Neste sentido, Ferreira (1993), trabalhou com o sêmen resfriado de asinino e observou que as taxas de gestação foram influenciadas ($p < 0,05$) pelo

intervalo entre a inseminação e a ovulação. Assim, inseminações realizadas de 24 a 48 horas pré-ovulação, resultaram em uma taxa de gestação de 61,8%, enquanto aquelas realizadas dentro de 24 horas da ovulação resultaram em uma taxa de gestação de 88,9%. Quando as inseminações foram realizadas dentro de um período máximo de 12 horas pós-ovulação, obteve-se uma taxa de gestação de 85,7%, que não diferiu ($p>0,05$) da obtida nas éguas inseminadas dentro de até 24 horas antes da ovulação.

Entretanto, Leite (1994) observou que o momento e a frequência de inseminações não influenciaram as taxas de gestação, obtendo resultados similares para os intervalos, da inseminação à ovulação, de 24 e 48 horas pré-ovulação. Entretanto, neste trabalho utilizou-se sêmen asinino a fresco diluído, dentro de no máximo 45 minutos após a coleta. Sendo assim, baseando-se nos resultados diferentes, obtidos por Ferreira (1993) e Leite (1994), quando utilizaram o sêmen resfriado e o a fresco diluído, respectivamente, observou-se que o resfriamento por 24 ou 48 horas reduziu a viabilidade espermática do sêmen de asininos no sistema genital de éguas.

Rossi (2008) trabalhando com sêmen asinino diluído e resfriado, obteve taxas de gestação ao primeiro ciclo, de 50,00% e de 48,28%, para os intervalos de 24 e 48 horas pré-ovulação, respectivamente. As taxas de gestação/ciclo nestes períodos foram de 46,55% e 45,45%, respectivamente, e não diferiram ($p>0,05$) entre si. Além disso, a associação de inseminações pré e pós-ovulação não pareceram necessárias, naquele estudo, visto que as taxas de gestação/ciclo não diferiram ($p>0,05$) entre as diferentes frequências de inseminação. Apesar da autora não ter avaliado intervalos entre a inseminação e a ovulação superiores a 72 horas, obteve-se uma boa viabilidade espermática do sêmen em questão por até 72 horas no sistema genital das éguas.

Desta forma, sugere-se que o intervalo entre a inseminação e a ovulação seja o menor possível, principalmente ao utilizar-se sêmen equídeo congelado, uma vez que este processamento é capaz de diminuir significativamente a longevidade das células espermáticas no sistema

genital de éguas, evitando-se assim uma redução nos índices de fertilidade.

2.1.2.5. Efeito do local de deposição do sêmen

O transporte dos espermatozoides, desde o local da sua deposição no sistema genital da fêmea até o local da fertilização, é fundamental durante o processo reprodutivo, sendo que falhas na fertilização podem ser observadas caso esta fase sofra alguma alteração (Hawk, 1983).

No caso dos equídeos, em que a ejaculação é intra-uterina, o sêmen difunde-se rapidamente ao longo do corpo e dos cornos uterinos após a monta natural ou inseminação artificial, devido às contrações miométriais e à motilidade dos espermatozoides (Boyle *et al.*, 1987). Entretanto, após oito a vinte minutos de contrações, a maior parte do ejaculado é eliminada do útero (Katila *et al.*, 2000), sendo que os espermatozoides remanescentes são encontrados na junção úterotubárica, associados às células epiteliais da tuba uterina (Morris e Allen, 2002). A junção uterotubárica exerce a função de reservatório espermático, permitindo a passagem dos espermatozoides de forma lenta para o local onde ocorrerá a fertilização (Boyle *et al.*, 1987).

Usualmente, utiliza-se uma dose inseminante de 300 a 500 milhões de espermatozoides móveis/égua, sendo que ao utilizar-se o sêmen congelado, ou resfriado, o número total de células aproxima-se de um bilhão (Squires *et al.*, 1999). Uma vez o sêmen depositado no corpo do útero, os espermatozoides atingem rapidamente a junção uterotubárica (Rigby *et al.*, 2000). Dos milhões de espermatozoides depositados no útero, apenas alguns milhares chegarão à tuba uterina, em virtude da seleção espermática durante o transporte uterino (Parker *et al.*, 1975) e, também, pela junção úterotubárica (Vazquez *et al.*, 1998).

O local de deposição do sêmen, no momento da inseminação, é um fator extremamente importante para a obtenção de bons resultados de fertilidade. Tanto na monta natural como na inseminação artificial convencional o sêmen é depositado no corpo do útero das éguas. Este local de deposição é bastante eficiente ao utilizar-se um elevado número de espermatozoides por dose inseminante (Ginther,

1992). Entretanto, sendo este número limitado, indica-se a deposição dos gametas o mais próximo do local de fertilização (Fleury e Cassoli, 1999).

A inseminação artificial convencional em éguas é feita por via vaginal, na qual a mão enluvada do inseminador guia uma pipeta até a passagem pelo cérvix, sendo o sêmen depositado no corpo do útero (Mies Filho, 1987). Para obter-se melhores resultados com a utilização do sêmen congelado, utilizam-se técnicas como a inseminação no ápice do corno uterino, havendo a possibilidade de inseminação histeroscópica, na qual a deposição do sêmen é realizada na junção úterotubária, com o auxílio de um endoscópio (Leão, 2002).

O transporte espermático e a sobrevivência dos espermatozoides no sistema genital da égua diferem quando da utilização do sêmen a fresco ou congelado. Assim, tem sido sugerido que o sêmen congelado apresenta menor viabilidade, quando comparado ao sêmen fresco (Troedsson *et al.*, 1998).

O grande número de espermatozoides necessários à realização da inseminação artificial convencional limita a utilização do sêmen congelado em equinos (Buchanan *et al.*, 2000). Além disso, as taxas de gestação por ciclo, obtidas com a utilização de sêmen congelado, são invariavelmente menores que as obtidas quando da utilização do sêmen a fresco ou resfriado dos mesmos garanhões (Vanderwall, 1997). Segundo Martin *et al.* (1979), são necessários em torno de 500×10^6 de espermatozoides com movimento progressivo por dose inseminante, uma vez que 30 a 50% dos espermatozoides se tornam inviáveis durante o processo de congelamento e descongelamento.

Em trabalho conduzido por Papa (1987), utilizou-se o sêmen de garanhões, congelado em macrotubos, com doses inseminantes de 400×10^6 espermatozoides, sendo estes depositados no corpo do útero, quando obteve-se uma taxa de gestação de 52%. Neves Neto (1998) utilizou uma dose inseminante de 800×10^6 espermatozoides, congelados em palhetas de 0,55 mL, e obteve uma taxa de gestação de até 53,3%.

Vários estudos demonstraram a possibilidade de obter-se taxas de gestação satisfatórias com um número reduzido de espermatozoides, depositados na junção uterotubária (Lindsey *et al.*, 2002). Acredita-se que a mudança do local de deposição do sêmen possa melhorar a eficiência do sêmen congelado ou sexado de certos garanhões (Buchanan *et al.*, 2000; Lindsey *et al.*, 2002; Lyle e Ferrer, 2005).

A redução da dose inseminante, associada à deposição do sêmen no ápice do corno uterino, pode permitir a diminuição do número de espermatozoides utilizados nas inseminações envolvendo o sêmen congelado (Squires *et al.*, 2003). Este tipo de inseminação é um procedimento bastante rápido e prático, podendo ser considerado como uma alternativa à inseminação histeroscópica (Aurich, 2006).

Em um estudo conduzido por Dell'Aqua Júnior (2000), comparou-se o efeito do local de deposição do sêmen, da concentração espermática por dose inseminante e do momento da inseminação, em relação à ovulação, sobre as taxas de gestação envolvendo o sêmen congelado equino. Neste estudo, obteve-se taxas de gestação de 20% para as éguas inseminadas no corpo do útero, com 800×10^6 espermatozoides por dose, após a ovulação. Já para as éguas inseminadas pré e pós-ovulação, com doses inseminantes de 400×10^6 espermatozoides, que também foram depositados no corpo do útero, observou-se uma taxa de gestação de 30%. Ao realizar-se inseminações com sêmen congelado pré e pós-ovulação, a uma concentração de 150×10^6 espermatozoides por dose inseminante, obteve-se taxas de gestação de 40 e 50%, para as inseminações realizadas no corpo do útero ou no ápice do corno uterino, respectivamente.

Em vários experimentos inseminaram-se éguas profundamente, tanto no corno uterino como na papila tubária (Lindsey *et al.*, 2002). Na primeira técnica utilizou-se pipetas flexíveis, introduzidas sob controle retal manual ou ultrassonográfico, até o ápice do corno uterino. Entretanto, quando da inseminação na papila tubária, necessita-se de um controle visual, através de um endoscópio flexível (inseminação histeroscópica). Em diferentes trabalhos, obtiveram-se taxas de gestação de 50% ou mais altas com doses inseminantes de 1 - 5×10^6 espermatozoides, quando da inseminação

histeroscópica. Entretanto, quando o sêmen foi depositado no ápice do corno uterino, utilizando-se uma pipeta flexível, foram necessários de $5 - 10 \times 10^6$ espermatozoides (Lindsey *et al.*, 2002; Brinsko *et al.*, 2003).

Tem sido descrito que ao depositar-se uma dose inseminante no ápice do corno uterino, ipsilateral ao ovário em que ocorreu a ovulação, 80% dos espermatozoides permanece nesta tuba. Apenas 50% das células espermáticas são aí encontradas, quando o sêmen é depositado no corpo do útero (Rigby *et al.*, 2000). Quando se deposita o sêmen na papila da tuba uterina, com o auxílio de um vídeoendoscópio, foi possível obter-se gestações com doses inseminantes muito baixas, em torno de 1×10^6 de espermatozoides/dose (Morris *et al.*, 2003).

Ao trabalharem com sêmen equino congelado, Lindsey *et al.* (2002) realizaram inseminações artificiais utilizando uma dose inseminante de 5×10^6 espermatozoides. Neste estudo, obteve-se maiores taxas de gestação no grupo de éguas submetidas à inseminações histeroscópicas, em comparação ao grupo envolvendo inseminações no ápice do corno uterino.

Por outro lado, Squires *et al.* (2003) observou menor taxa de gestação, em éguas problema, inseminadas na junção uterotubárica em relação àquelas inseminadas no corpo do útero. Neste estudo, para a inseminação no ápice do corno uterino, utilizou-se uma dose inseminante de 200×10^6 espermatozoides, que não promoveu um aumento nas taxas de gestação, quando comparada à inseminação no corpo uterino, com o mesmo número de espermatozoides. A taxa de recuperação de embriões foi menor para as éguas inseminadas no corno uterino, ipsilateral à ovulação (20% - 4/20), em relação às inseminadas no corpo do útero, que foi de 50% (10/20).

Ao trabalharem com inseminações artificiais envolvendo o sêmen congelado de jumento, Jepsen *et al.* (2010), utilizaram duas inseminações por ciclo, sendo o sêmen depositado no corpo do útero de éguas. As doses inseminantes continham 300×10^6 espermatozoides móveis e foram depositadas, no sistema genital, no intervalo de seis horas antes e seis horas após a ovulação, obtendo-se taxas de

gestação de até 58,3%, ao longo de cinco estações reprodutivas.

2.1.2.6. Efeito do número de inseminações por ciclo

A frequência de inseminações por ciclo estral é considerada como um dos fatores mais importantes do manejo reprodutivo de equinos, e depende da individualidade do garanhão e do tipo de sêmen utilizado (Silva Filho *et al.*, 1998). Esta frequência está relacionada, ainda, ao intervalo de tempo da realização da inseminação à ovulação (Woods *et al.*, 1990) e também à concentração da dose inseminante, de forma que uma maior frequência de inseminações permite a utilização de um menor número de espermatozoides por dose inseminante. Por outro lado, o tipo de processamento ao qual o sêmen foi submetido, pode interferir negativamente na sua viabilidade, no sistema genital da fêmea, tornando necessário o aumento da frequência de inseminações e até mesmo da concentração da dose inseminante, uma vez que a fertilidade pré-ovulação depende da manutenção da viabilidade dos espermatozoides no sistema genital da fêmea (Pickett *et al.*, 1987). É possível tornar um programa reprodutivo mais eficiente a partir de um maior controle das éguas, realizando-se palpações transretais e/ou exames ultrassonográficos para detectar o momento exato da ovulação. Desta forma, pode-se reduzir o número de inseminações por ciclo, assim como os riscos de contaminação iatrogênica do sistema reprodutivo, principalmente em éguas susceptíveis à endometrite (Brinsko e Varner, 1993).

Aumentando-se o número de inseminações por ciclo pode-se elevar as taxas de gestação (Voss *et al.*, 1982; Pickett *et al.*, 1987; Ferreira, 1993), uma vez que aumentando-se a frequência de inseminações, o número de espermatozoides presentes no reservatório espermático, até o momento da ovulação, pode também se elevar (Ginther, 1992). Em um estudo envolvendo 20 éguas sincronizadas, cobertas em monta natural, por um garanhão de seis anos de idade, obteve-se taxa de gestação de 85% (17/20), embora as fêmeas tenham sido submetidas, em média, à 4,6 cobrições durante o primeiro ciclo (Bristol, 1982). Entretanto, tem sido descrito que a fertilidade das éguas pode ser comprometida pela

utilização de um maior número de inseminações, devido ao aumento da manipulação do sistema genital, predispondo-as à ocorrência de contaminação bacteriana (Pickett *et al.*, 1987; Silva Filho *et al.*, 1991; Silva Filho, 1994; Palhares, 1997; Valle, 1997).

Diante disto, Pace e Sullivan (1975) observaram que, embora as taxas de gestação tenham sido relativamente baixas quando do uso do sêmen congelado, não sofreram influência do aumento do número de inseminações diárias de uma para duas vezes. Entretanto, observou-se melhores índices de fertilidade nas éguas inseminadas dentro de 12 horas da ovulação.

Diferentemente dos resultados de Pace e Sullivan (1975), Vidament *et al.* (1997) obtiveram taxas de gestação mais elevadas em éguas inseminadas duas ou mais vezes por ciclo, em comparação aquelas inseminadas apenas uma vez, que foram de 34% (n=1.576) e 26% (n=626), respectivamente. Resultados similares foram descritos por Samper (2001), em um estudo envolvendo também o sêmen congelado, quando observou-se taxas de gestação mais elevadas para as éguas inseminadas por mais de uma vez por ciclo. Por outro lado, Loomis e Squires (2005) avaliaram os dados de duas estações de monta consecutivas e observaram taxas de gestação similares para éguas inseminadas uma ou várias vezes por ciclo, com valores de 51,5 e 51,7%, na primeira estação, e de 47,1 e 46,1% na segunda estação, respectivamente. As éguas inseminadas duas vezes por ciclo, antes e depois da ovulação, apresentaram taxas de gestação similares àquelas inseminadas uma vez, até seis horas após a sua ocorrência, sendo os valores de 48,1% e 47,3%, respectivamente.

Em estudo realizado na Itália, Reger *et al.* (2003), trabalharam com sêmen congelado de garanhões e obtiveram taxa de gestação de 76% (26/34) ao utilizarem duas inseminações em tempo fixo. Além disso, ao utilizarem uma única inseminação, dentro de até seis horas após a ovulação, obtiveram uma taxa de gestação de 71% (15/21). Barbacini *et al.* (2005) utilizaram 193 ciclos reprodutivos de éguas altamente selecionadas pelo seu potencial reprodutivo, quando obtiveram taxa de gestação por ciclo similar ao utilizar diferentes doses inseminantes, de 400×10^6 (61%) ou 800×10^6 (69%) espermatozoides totais, sendo as inseminações

realizadas às 24 e 40 horas após a indução da ovulação pela administração da hCG. Tais resultados demonstram que ao realizar-se duas inseminações em tempo fixo, antes e após a ovulação, obtêm-se taxas de gestação similares às alcançadas quando da utilização de uma inseminação única, realizada após a ovulação. Sieme *et al.* (2003) observaram que éguas inseminadas duas vezes por ciclo, a um intervalo de 24 horas, responderam por uma taxa de gestação por ciclo de 50%, enquanto naquelas inseminadas uma única vez, obteve-se uma taxa de gestação por ciclo de 42%. As taxas de gestação em éguas inseminadas apenas uma vez, 12 horas pré-ovulação ou dentro de 12 horas pós-ovulação foram de 41 e 50%, respectivamente. Segundo os mesmos autores, as inseminações com sêmen congelado deveriam ser realizadas dentro de no máximo 12 horas pré e após a ovulação.

As inseminações com sêmen congelado de equídeos podem ser ampliadas a partir do estabelecimento de protocolos que simplifiquem a sua utilização prática. Neste sentido, Squires *et al.* (2003) e Barbacini *et al.* (2005) recomendaram o uso de um protocolo de inseminação em tempo fixo, visando diminuir os custos e simplificar o manejo reprodutivo das éguas inseminadas com sêmen congelado. Tal protocolo envolve palpções transretais, seguidas de exame ultrassonográfico diário durante o período do estro, acompanhadas pela indução da ovulação utilizando a hCG ou a deslorelina após a detecção de um folículo com diâmetro superior a 35 mm, sendo as inseminações realizadas às 24 e às 40 horas após a administração do agente indutor da ovulação. Desta maneira, as éguas que ovularem entre 18 e 52 horas após a administração da hCG ou deslorelina terão sempre espermatozoides em seu sistema genital dentro de 12 horas pré ou seis horas após a ovulação.

Baseando-se em dados publicados envolvendo a utilização de inseminações múltiplas, quando da inseminação com sêmen congelado, tem sido descrito que um protocolo de inseminação dupla em tempo fixo permite ao médico veterinário examinar a égua uma vez por dia, durante as horas de trabalho normal, sem comprometer a fertilidade, aumentando assim a praticidade do manejo reprodutivo (Barbacini, 2009).

Entretanto o uso de várias inseminações por ciclo não é indicado para todas as éguas, por exemplo, aquelas susceptíveis à endometrite pós-inseminação, como é o caso das éguas velhas ou solteiras (Barbacini, 2009). Estas fêmeas podem necessitar de um manejo mais intensivo de modo a minimizar a contaminação do útero susceptível (Moreira, 2010). Sieme *et al.* (2003) descreveram que a fertilidade do sêmen congelado de garanhões melhorava quando as éguas eram inseminadas mais de uma vez por ciclo. Já Metcalf (2000) observou que a inseminação de éguas com sêmen congelado equino, duas vezes por ciclo, não influenciou a fertilidade, assim como não aumentou a incidência de endometrite pós-inseminação.

Ao avaliar a fertilidade do sêmen congelado de jumento Zamorano-Leonés, utilizado para inseminação de jumentas da mesma raça, Castejón (2005) realizou uma única inseminação, 24 horas após a indução da ovulação pela administração da hCG, e obteve apenas uma gestação em 18 ciclos reprodutivos de seis jumentas. No mesmo sentido, Rozas (2005) obteve apenas uma gestação em 24 ciclos reprodutivos de 10 jumentas, ao realizar inseminações artificiais com sêmen congelado de asinino, 24 horas após a indução da ovulação com hCG, sendo estas repetidas a cada 12 horas, até a ocorrência da ovulação.

Ao realizarem inseminações artificiais em 28 éguas, com sêmen congelado de jumento, Jepsen *et al.* (2010), utilizaram duas inseminações por ciclo, sendo o sêmen depositado no corpo do

útero. Neste estudo, utilizou-se uma dose inseminante de 300×10^6 espermatozoides móveis, dentro de um intervalo de seis horas pré e pós-ovulação, obtendo-se taxas de gestação de até 58,3%, ao longo de cinco estações reprodutivas.

Diante destas informações, é possível afirmar que o intervalo entre a inseminação e a ovulação exerce mais influência sobre a fertilidade das éguas que o número de inseminações realizadas, desde que se respeite a concentração espermática adequada para cada tipo de sêmen utilizado, seja ele congelado ou não (Palhares, 1997).

2.2. Fertilidade do sêmen asinino

A produção de asininos e muares é uma crescente no cenário nacional e mundial. Do ponto de vista reprodutivo, dentre outros, são observadas particularidades importantes inerentes a cada espécie. Sendo assim, se faz necessária a realização de pesquisas específicas sobre cada uma delas, não bastando apenas se basear em trabalhos envolvendo equinos, mais comumente encontrados na literatura, e extrapolar estes conhecimentos para os asininos e muares.

Na tabela 2.1 estão descritos os resultados dos trabalhos, realizados no Brasil e no mundo, referentes à fertilidade de éguas e/ou jumentas, utilizando-se o sêmen asinino, sendo este congelado, resfriado ou a fresco.

Tabela 2.1. Fertilidade de éguas e/ou jumentas cobertas ou inseminadas com sêmen asinino a fresco, diluído, resfriado ou congelado.

Autores	Tipo de Coleta	Tipo de sêmen	Diluidor	Forma de envase	Local de deposição	Dose inseminante	Momento da IA	Nº de IAs	Fertilidade (Total)
Jordão <i>et al.</i> (1954)	Monta Natural	Fresco	-	-	-	-	-	-	35,9% (93/259)
Krause e Grove (1967)	Total Centrifugado	Congelado	Glicose-gema-glicerol, lactose-gema-glicerol e rafinose-gema-glicerol	Pellets	-	100 pellets	Pré	1 a 4	50% (1/2)
Vieira <i>et al.</i> (1985)	Total Centrifugado	Congelado	Lactose – Gema – EDTA (Martim <i>et al.</i> , 1979)	Palheta 0,5	Intracornual profunda	300 – 400 x 10 ⁶	Pós	1	66,7% (6/9)
Arruda <i>et al.</i> (1986)	Total Centrifugado	Congelado	Lactose – Gema – EDTA (Martim <i>et al.</i> , 1979)	Palheta 0,5	-	-	-	-	44% (7/16)
Palhares <i>et al.</i> (1986)	Total	Fresco diluído	Lactose – Gema de ovo	-	Corpo do útero	2152,52x 10 ⁶ *	Até 24h pré	2,1*	57,0% - ao primeiro ciclo (8/14 jumentas)
Silva (1988)	Total	Fresco diluído	Lactose – Gema de ovo	-	Corpo do útero	200 x 10 ⁶	Pré	-	68,3 a 92,1% (214 éguas em 3 estações de monta consecutivas)
Ferreira (1993)	Total	Fresco diluído	Lactose – Gema de ovo	-	Corpo do útero	250 x 10 ⁶	Pré	1,48*	82,70% (23/29)
		Resfriado (5°C/ até 24h)						1,27*	80% (24/30)
		Resfriado (5°C/ entre 24 – 48h)						1,38*	75,9% (22/29)
Leite (1994)	Total	Fresco diluído	Leite em Pó Desnatado – Glicose	-	Corpo útero	50 x 10 ⁶	Pré	-	3,44% (1/29)
						100 x 10 ⁶			20,68% (6/29)
						200 x 10 ⁶			53,12% (17/32)
						400 x 10 ⁶			70% (21/30)
						600 x 10 ⁶			67,64% (23/34)
Trimeche <i>et al.</i> (1998)	Total/ Centrifugado	Congelado	T2 - 94 (sem desglicerolização) T2 – 94 (com desglicerolização)	Palheta 0,5	-	600 x 10 ⁶	Pré	-	0% (0/17 - jumentas) 62% (8/13 - Jumentas)
Papa <i>et al.</i> (1999)	Total/ Centrifugado	Congelado	M9H	Palheta 0,5	-	800 x 10 ⁶	36 e 48h após hCG	2	66% (2/3)
Boeta e Quintero (2000)	Total	Resfriado (4°C/ até 48h)	Leite UHT	-	Corpo útero	400 x 10 ⁶	Pré	-	76,5% (ao primeiro ciclo – 13/17)
			Leite em pó Desnatado – Glicose						54,5% (ao primeiro ciclo – 6/11)
Rozas (2005)	Total	Resfriado (15°C)	Leite Desnatado	-		1000 x 10 ⁶	Até 48h pré	-	27% por ciclo (23/85-jumentas)
			INRA96						47,36% por ciclo (18/38 – jumentas)
	Total Centrifugado	Congelado	Leite Desnatado	-	Corpo útero	500 x 10 ⁶	Até 12h pré	-	21% por ciclo (6/28 - jumentas)
	Glicose – EDTA + 2,5% DMF		0% (0/8 – jumentas)						
	Total/ Centrifugado		Glicose – EDTA + 2,5% Glicerol + CLC						Palhetas 0,5
			Glicose – EDTA + 2,5% DMF + CLC						11% (1/9 - jumentas)

continuação....

Oliveira (2005)	Total/ Centri- fugado	Congelado	MP 50 + 2%DMSO + 2% DMF	Palheta 0,5	Corpo do útero	800 x 10 ⁶	Pré e Pós	-	0% (0/8 – jumentas)				
			MP 50 + 3% DMF						0 % (0/9 – jumentas)				
			MP 50 + 2% DA + 2% Glicerol						0% (0/8 – jumentas)				
			MP 50 + 3% DA						0% (0/10 – jumentas)				
			MP 50 + 3% Glicerol + 2% DMF						0% (0/9 – jumentas)				
			MP 50 + 3%DMSO + 2% Glicerol						0% (0/9 – jumentas)				
			MP 50 + 3% Glicerol + 2% DMF						0% (0/10 – jumentas)				
			MP 50 + 3% Glicerol + 2% DMF						0% (0/10 – jumentas)				
			MP 50 + 3% Glicerol (Desglicerolização)						0% (0/10 – jumentas)				
			MP 50 + 3% Glicerol + 2% DMF						Palheta 0,5	Intracornual profunda	1600 x 10 ⁶	Pós	1
Castejón (2005)	Total/ Centri- fugado	Congelado	Lactose-Gema- EDTA (Martim <i>et al.</i> , 1979)+ 2,5% Glicerol – Rediluição	Palheta 0,5	Corpo do útero	500 x 10 ⁶	Pré	1	0% (0/9 – jumentas)				
			Lactose-Gema- EDTA (Martim <i>et al.</i> , 1979)+2,5% Glicerol – Eliminação do glicerol						11,11% (1/9 – jumentas)				
Rossi (2008)	Total	Fresco diluído	Leite em Pó Desnatado – Glicose	-	Corpo do Útero	400 x 10 ⁶	Pré/ Pré e pós	2,09 *	63,64% (21/33)				
			Glicina – Gema de Ovo					2,39 *	54,55% (24/44)				
		Resfriado (5°C/ até 12h)	Leite em Pó Desnatado – Glicose					2,01 *	52,69% (49/93)				
			Glicina – Gema de Ovo					1,97*	47,06% (48/102)				
Canisso (2008)	Total/ Centri- fugado	Congelado	Lactose- Gema de Ovo Glicerol (Nagase e Niwa, 1964)	Palheta 0,5	Intracornual profunda	300 x 10 ⁶ (motilidade progressiva)	Pós	1	50,00% (aos 13 dias) e 10% (aos 35 dias)				
			Lactose – Gema - EDTA(Martim <i>et al.</i> , 1979)						53,33% (aos 13 dias) e 16,6% (aos 35 dias)				
Vidament <i>et al.</i> (2005, 2009)	Total	Resfriado (4°C/ até 8 horas)	Leite UHT	-	Corpo do útero	200 x 10 ⁶	Até 24h pré	-	45% (9/20 - jumentas) 45% (33/73– éguas)				
			Total/ Centri- fugado						INRA 82 + 2% Gema + 2,2% Glicerol	11% (4/38 - jumentas) 36% (18/50 - éguas)			
	Total	Fresco diluído	Leite UHT	-	Corpo do útero	400 x 10 ⁶	Até 24h pré	-	86% (6/7 – jumentas)				
			Resfriado (4°C/ uso imediato)						Leite UHT	78% (7/9 - jumentas)			
	Total/ Centri- fugado	Resfriado (4°C/ uso imediato)	INRA 82 + 2% Gema de Ovo	-	Corpo do útero	400 x 10 ⁶	Até 24h pré	-	63% (5/8 – jumentas)				
			INRA 82 + 2% Gema + 2,2% Glicerol						0% (0/8 – jumentas)				
			INRA 82 + 2% Gema						64% (7/11 – jumentas)				
			INRA 82 + 2% Gema + 1,9% Glicerol						8% (1/12 – jumentas)				
		Resfriado (4°C/ 1h)	INRA 82 + 2% Gema + 2,0% DMF	-	Corpo do útero	400 x 10 ⁶	Até 24h pré	-	67% (8/12 – jumentas)				
			INRA 82 + 2% Gema + 1,3% Etilenoglicol						45% (5/11 – jumentas)				

continuação....

		Congelado	INRA 82 + 2% Gema + 2,2% Glicerol (+ Diluição pós- descongelamento)	Palheta 0,5	Corpo do útero	400 x 10 ⁶	Até 24 h pré	-	0% (0/15 – jumentas)
			INRA 82 + 2% Gema + 2,2% Glicerol (controle)						0% (0/8 – jumentas)
			INRA 82 + 2% Gema + 2,2% Glicerol (centrifugação + ressuspensão após descongelamento)						13% (1/8 – jumentas)
			INRA 82 + 2% Gema + 2,1% Glicerol						0% (0/6 – jumentas)
			INRA 82 + 2% Gema + 2,2% DMF						11% (3/28 – jumentas)
Díaz <i>et al.</i> (2009)	Total	Monta Natural	-	-	-	-	-	-	32,08% (43/134)
		Fresco Diluído	ODT 3-4-2 (Glicose, Lactose, Leite desnatado, citrato de sódio)	-	Corpo do útero	250 x 10 ⁶	-	-	53,80% (14/26)
Jepsen <i>et al.</i> (2010)	Total/ Centri- fugado	Congelado	EZ Mixin +20% Gema de Ovo + 4% Glicerol	Palhetas 0,5	Corpo do útero	300 x 10 ⁶	Pré e Pós	2	0% (número de éguas não informado)
			EZ Mixin+20% Gema de ovo+2% Etilenoglicol						6,3% (1/15)
			EZ Mixin+5% Gema de ovo+2% Etilenoglicol						46,5% (20/43)
			EZ Mixin+20% Gema de ovo+2% Etilenoglicol + 60mM β- ciclodextrina						58,3 (14/24)

* Valores médios

DMF – Dimetilformamida

CLC – complexo colesterol - ciclodextrina

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização, condições climáticas e período experimental

Os experimentos foram realizados na Fazenda Santa Edwiges, localizada no município de Lagoa Dourada, Estado de Minas Gerais, Brasil, distando 150 km de Belo Horizonte. O município

localiza-se a uma altitude média de 1124 metros, situando-se a 20° 54' 50" de latitude S e 44° 4' 40" de longitude W Gr. Apresenta clima do tipo Cwa, com inverno seco e verão chuvoso, de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger. Os dados acima, assim como os descritos na tabela 3.1, foram obtidos no 5° Distrito de Meteorologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Tabela 3.1. Dados meteorológicos médios do período experimental

<i>Período (mês/ano)</i>	<i>Temperatura máxima (°C)</i>	<i>Temperatura Mínima (°C)</i>	<i>Precipitação (mm/mês)</i>
Set/10	27,1	12,8	59,8
Out/10	26,9	15,5	207,8
Nov/10	26,5	16,9	213
Dez/10	29,2	18,4	420,4
Jan/11	28,3	18,1	284,2
Fev/11	28,4	17,6	86,1

Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET)

O período experimental compreendeu o intervalo entre os meses de setembro de 2010 à fevereiro de 2011, representando a estação fisiológica de reprodução dos equídeos nesta região (Rossi, 2008).

3.2 Delineamento experimental e animais utilizados

3.2.1 Experimento I: Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento rápida.

Foram utilizados cinco jumentos da raça Pêga (*Equus asinus*), com idade entre 05 e 17 anos, com qualidade seminal comprovada após avaliação do desempenho reprodutivo, baseando-se nos dados de fertilidade do rebanho e exame andrológico.

Adotou-se um modelo experimental composto por 05 reprodutores, 02 tratamentos (métodos de envase) e 03 ejaculados por reprodutor, totalizando 15 ejaculados. Cada ejaculado foi submetido a dois tratamentos:

Tratamento 1 (E1T1) – Ejaculados coletados de forma fracionada, diluídos em diluidor à base de lactose-gema de ovo (Nagase e Niwa, 1964) modificado e submetidos a curva de resfriamento rápida pré-congelamento, sendo a seguir envasados em FlatPacks¹ para o congelamento (n=15);

Tratamento 2 (E1T2) – Ejaculados coletados de forma fracionada, diluídos em diluidor à base de lactose-gema de ovo (Nagase e Niwa, 1964) modificado e submetidos a curva de resfriamento rápida pré-congelamento, sendo a seguir envasados em palhetas² de 0,55 mL para o congelamento (n=15).

As modificações introduzidas no diluidor Nagase e Niwa (1964), como podem ser observadas na tabela 3.2, caracterizaram-se pelas concentrações de glicerol (3,5%) e a introdução do surfactante orvus-es-paste, em uma relação de 0,08 mL para cada 20 mL de gema de ovo.

¹ Medical and Device Packaging AB®

² IMV®

Neste experimento, utilizou-se uma curva de resfriamento rápida, de modo que uma mamadeira plástica contendo o sêmen pré-diluído (sêmen:diluidor – 1:1) era colocada em um béquer com 250 mL de água a 37°C, que era então levado ao balcão refrigerador à 5°C, até que a água do béquer atingisse a temperatura de 5-6°C, quando então realizava-se a sua diluição final, pré-congelamento. Após o envasamento do sêmen em FlatPacks ou palhetas procedia-se ao congelamento como descrito no item 3.2.6.

3.2.2 Experimento II: Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento lenta.

Neste experimento, foram utilizados os mesmos cinco jumentos da raça Pêga (*Equus asinus*) utilizados no Experimento I.

Da mesma forma como citado no Experimento I, adotou-se um modelo experimental composto por 05 reprodutores, 02 tratamentos (métodos de envase) e 03 ejaculados por reprodutor, totalizando 15 ejaculados. Cada ejaculado foi submetido a dois tratamentos:

Tratamento 1 (E2T1) – Ejaculados coletados de forma fracionada, diluídos em diluidor à base de lactose-gema de ovo (Nagase e Niwa, 1964) modificado e submetidos a curva de resfriamento lenta pré-congelamento, sendo a seguir envasados em FlatPacks para o congelamento (n=15);

Tratamento 2 (E2T2) – Ejaculados coletados de forma fracionada, diluídos em diluidor à base de lactose-gema de ovo (Nagase e Niwa, 1964) modificado e submetidos a curva de resfriamento lenta pré-congelamento, sendo a seguir envasados em palhetas de 0,55 mL para o congelamento (n=15).

No presente experimento, utilizou-se uma curva de resfriamento lenta, colocando-se o recipiente com o sêmen pré-diluído em um béquer contendo 500 mL de água a 37°C, de forma a proporcionar uma queda mais lenta da temperatura, quando colocado em um balcão refrigerador regulado à 5°C, até que a água do

béquer atingisse a temperatura de 5-6°C, quando era então submetido à diluição final, envasado em FlatPacks ou palhetas e a seguir congelado, seguindo a metodologia descrita no item 3.2.6.

3.2.3 Experimento III: Sincronização, indução da ovulação, local de deposição do sêmen no sistema genital e taxa de gestação de fêmeas equinas inseminadas com sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks e congelado.

No presente experimento foram utilizadas 16 éguas mestiças, com idade variando entre 07 e 18 anos, uniformemente agrupadas por faixa etária e categoria reprodutiva (égua solteira, parida ou no “cio do potro”), e distribuídas de forma inteiramente casualizada em dois tratamentos:

Tratamento 1 (E3T1) - Éguas inseminadas às 30 e 42 horas após a indução da ovulação com o uso de hCG¹⁷, na presença de um folículo com 3,76±0,21 cm de diâmetro em um dos ovários e edema uterino ≥ 2 (1 – 3), sendo o sêmen depositado no corpo do útero (número de ciclos=7);

Tratamento 2 (E3T2) – Éguas inseminadas às 30 e 42 horas após a indução da ovulação com hCG¹⁷, na presença de um folículo 3,61±0,05 cm de diâmetro em um dos ovários e edema uterino ≥ 2 (escala 1 – 3), sendo o sêmen depositado no ápice do corno uterino, ipsilateral ao ovário que continha o folículo dominante (número de ciclos=11).

A dose inseminante utilizada no tratamento 1 (E3T1), correspondeu ao volume de dois FlatPacks, ou seja, 10 mL de sêmen, envolvendo uma dose de 2×10^9 espermatozoides móveis, pré-congelamento, com no mínimo 600×10^6 espermatozoides móveis pós-descongelamento, uma vez terem sido utilizadas apenas doses inseminantes com valores iguais ou superiores a 30% (0 – 100%) de motilidade espermática e vigor 3 (0 - 5);

No tratamento 2 (E3T2), utilizou-se apenas um FlatPack por inseminação, correspondendo a uma dose inseminante de 5 mL, contendo 1×10^9 espermatozoides móveis pré-congelamento, com no mínimo 300×10^6 espermatozoides móveis pós-descongelamento, em virtude de terem sido

utilizadas apenas doses inseminantes com motilidade e vigor espermáticos superiores a 30% e 3, respectivamente.

3.2.4 Manejo reprodutivo e nutricional dos reprodutores

Durante os três experimentos descritos neste trabalho foram utilizados cinco jumentos da raça Pêga (*Equus asinus*), identificados como J1, J2, J3, J4 e J5, tendo 06, 07, 05, 17 e 06 anos de idade, respectivamente.

Anteriormente ao início da estação de monta, foram realizados exames andrológicos destes reprodutores considerando-se as seguintes características do sêmen: cor, aspecto, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática.

Os dados de todas as coletas realizadas durante os Experimentos I e II foram registrados em fichas individuais (Anexo 8.1), contendo os parâmetros físicos avaliados, os cálculos de concentração e volumes de sêmen e diluidores utilizados, o número de doses produzidas por ejaculado, bem como os tempos entre a coleta e a pré-diluição, coleta e início do resfriamento, duração da curva de resfriamento, horário da diluição final e do congelamento.

Os jumentos eram alojados em piquetes individuais, com pastagem de tifton (*Cynodon sp*), recebiam 1kg de suplemento mineral proteinado³ por dia e água disponível para o consumo *ad libitum*.

3.2.5. Manejo reprodutivo e nutricional das éguas

Para o Experimento III foram utilizadas 16 éguas mestiças com idade entre 07 e 18 anos, agrupadas em três categorias reprodutivas: éguas solteiras, paridas ou no “cio do potro”. Estas fêmeas foram submetidas a um exame ginecológico no início da estação de monta, quando avaliou-se a conformação da genitália externa bem como a condição uterina e ovariana

³ Expander Minerais® - Itambé

por meio de palpação transretal seguida de ultrassonografia⁴.

Nas éguas em que detectou-se acúmulo de líquido intra-uterino utilizou-se aplicações de ocitocina⁵ intramuscular (1 mL – 10 UI) por três dias, associada a 15 mL (3.000.000 UI) de penicilina⁶ intramuscular, durante cinco dias. Já aquelas éguas com histórico reprodutivo de no mínimo três tentativas de prenhez mal sucedidas nos ciclos anteriores recebiam, além do tratamento descrito anteriormente, 10 mL de flunixin meglumina⁷ endovenoso, uma vez ao dia, em um total de cinco aplicações, iniciando-se no dia da primeira inseminação artificial (Koblischke *et al.*, 2008). No presente experimento, três éguas foram tratadas utilizando-se a associação de ocitocina, penicilina e flunixin meglumina⁷ da maneira descrita acima, sendo que uma delas recebeu este tratamento durante dois ciclos reprodutivos sequenciais.

Todos os dados, incluindo o histórico reprodutivo de cada égua, controle do crescimento folicular e condição uterina, foram anotados em fichas individuais (Anexo 8.2), facilitando a identificação e o controle de cada reprodutriz.

3.2.6. Coleta, pré-diluição, resfriamento, diluição final, envasamento, congelamento, descongelamento e avaliação do sêmen pós-descongelamento

3.2.6.1. Coleta fracionada do sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas utilizando-se uma jumenta no cio, imobilizada em tronco de contenção, localizado em um curral coberto por telha de cerâmica, protegido da chuva e do sol (Figuras 3.1a e 3.1b). As coletas ocorreram às segundas e quintas-feiras, no período da manhã (a partir das 08 horas), seguindo as recomendações da literatura (Pickett e Amann, 1993).

Para a coleta fracionada do sêmen utilizou-se uma vagina artificial modelo aberta (Tischner *et al.*, 1974), constituída de um tubo de borracha rígido, com 28 cm de comprimento e 14 cm de diâmetro, possuindo uma válvula metálica com tampa no centro, que permitia o seu preenchimento e posterior retirada da água aquecida. Em seu interior, a vagina artificial foi revestida por uma mucosa de látex flexível⁸, com 77 cm de comprimento e 17 cm de largura. Esta mucosa foi recoberta por um saco plástico descartável⁹, com medidas de 30x50x0,005 cm (largura x comprimento x espessura - Figura 3.2a). Antes da coleta, a vagina era preenchida com água à 50°C, sendo esta colocada com auxílio de funil, devidamente acoplado à válvula metálica, ficando a água armazenada entre o tubo rígido de borracha e a mucosa de látex, de forma a manter a temperatura em torno de 42 - 45°C no interior da vagina artificial, utilizando-se para esta aferição um termômetro graduado até 100°C. A quantidade de água colocada era a necessária para preencher toda a capacidade da vagina artificial, sendo o enchimento interrompido apenas quando ocorria o transbordamento de água, visando-se obter uma pressão adequada no pênis do jumento no momento da coleta do sêmen. A seguir, lubrificava-se o interior da vagina artificial (saco plástico descartável) com vaselina sólida¹⁰ (Figura 3.2b).

O sêmen era recepcionado em um copo coletor plástico com alça¹¹, com 14 cm de diâmetro, capacidade para dois litros e de boca larga, de forma a permitir a coleta dos três primeiros jatos do ejaculado (Fração Rica), evitando-se assim, possíveis perdas desta fração. Este copo era envolvido externamente por um papel pardo, impedindo a exposição do sêmen à luz solar. No interior desse recipiente era colocado um saco plástico descartável, com medidas de 25x35x0,005 cm. A boca do copo coletor era coberta por papel toalha até o momento da coleta, para evitar a sua contaminação (Figura 3.3).

Para a coleta fracionada do sêmen eram necessárias duas pessoas envolvidas no

⁴ Ultrasson Mindray DP 3300 – Probe linear 7,5MHz ®

⁵ Placentex® - Agener União

⁶ Pronto Pen® - Vallée

⁷ Flunixinina Injetável® - U.C.B.

⁸ Icelvet®

⁹ Martplas®

¹⁰ Sanobiol®

¹¹ Plasútil ®

procedimento. Assim que o jumento montava na fêmea, uma das pessoas aproximava-se e desviava o pênis para a lateral direita da fêmea, introduzindo-o na vagina artificial, ficando a glândula do pênis exposta na extremidade distal da vagina. Neste momento, a outra pessoa envolvida na coleta aproximava-se e direcionava a glândula para o copo coletor que estava em sua mão. O início das pulsações na base do pênis indicava o começo da ejaculação, quando então eram coletados os três primeiros jatos (Fração Rica), devidamente protegidos no copo coletor, sendo o restante do ejaculado descartado (Figuras 3.4a e 3.4b). Ao final da ejaculação, abria-se a tampa da válvula metálica presente na vagina artificial, a fim de esvaziá-la e permitir a saída do pênis.

3.2.6.2. Avaliação física, pré-diluição, resfriamento e diluição final do sêmen

Após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto a sua cor e aspecto. Para tal, o saco plástico era retirado do copo coletor e imediatamente colocado em banho-maria, a 37°C, para evitar o choque térmico. Amostras para concentração e morfologia espermáticas eram coletadas. Para o cálculo da concentração espermática da fração rica, um volume de 20 µl de sêmen era retirado com auxílio de um pipetador automático graduado para tal, com ponteira descartável e, diluído em 8 mL de solução formol salina tamponada (1:400). Após homogeneização da solução, a câmara de Neubauer era preenchida com o uso de um tubo capilar, permanecendo em repouso no microscópio por cinco minutos antes da contagem dos espermatozoides. Já as amostras para morfologia eram coletadas e armazenadas em tubos ependorff contendo 1 mL de solução formol salina.

Para avaliação da motilidade e vigor, colocava-se uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas em mesa aquecedora a 37°C, sendo a amostra submetida imediatamente à avaliação microscópica de campo claro, com aumento de 100X e 400X. A motilidade era expressa em percentual de células móveis/campo (0 – 100%). Para avaliação do vigor espermático utilizava-se uma escala subjetiva de 0 a 5, baseando-se na velocidade de deslocamento das células espermáticas nos campos avaliados, recebendo 0 as células imóveis e cinco as com máxima velocidade de movimentação.

A diluição do sêmen foi então realizada utilizando-se o diluidor à base de lactose e gema de ovo (Nagase e Niwa, 1964), sem glicerol (Tabela 3.2), na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor). O recipiente com o sêmen diluído foi colocado em béquer de vidro contendo 250 mL ou 500 mL de água a 37°C, sendo então levado para um balcão refrigerador horizontal¹² regulado para uma temperatura de 5°C. Este balcão possui 1,5 m de comprimento, 70 cm de largura e 75 cm de altura, sendo completamente fechado nas laterais e na parte posterior (Figura 3.5a e 3.5b). Na parte frontal, era fechado por duas portas de vidro que se movimentam lateralmente, cada uma das quais possuindo duas aberturas circulares com tampa, com 14 cm de diâmetro, o que permitia a manipulação dos materiais em seu interior sem a abertura das portas, evitando-se assim uma elevação indesejável da temperatura em seu interior. O recipiente contendo o sêmen permaneceu dentro do balcão refrigerador em média por 03:44 horas (Experimento I) ou por 04:56 horas (Experimento II), tempo necessário para que a água do béquer atingisse uma temperatura de 5-6°C. Esta temperatura era monitorada com o auxílio de um termômetro graduado para 100°C, utilizado exclusivamente para o controle das amostras de sêmen, sendo sempre após o uso devidamente higienizado e abrigado em local limpo.

Paralelamente, realizava-se o cálculo da concentração espermática por meio da contagem celular em câmara de Neubauer. Terminada a contagem, realizava-se a correção para a diluição pretendida, ou seja, para uma concentração de 200×10^6 espermatozoides móveis/mL de sêmen diluído, sendo que, a metade do diluidor a ser adicionado era representada pelo D1, e a outra metade pelo D2, obedecendo-se sempre uma relação D1:D2 (1:1 - Tabela 3.2). Assim, adicionava-se a quantidade restante de D1 necessária, sendo o D2 adicionado apenas quando o sêmen alcançava, no interior do balcão, uma temperatura de 5-6°C. Esta adição era realizada de maneira extremamente lenta, com o uso de pipeta de vidro graduada de 10 mL, sendo que as gotas deste diluidor entravam em contato, primeiramente, com a parede do recipiente de vidro, escorrendo por esta até alcançar o sêmen. Após a diluição final e homogeneização,

¹² Maquinox®

procedia-se uma nova avaliação física do sêmen, como descrito anteriormente.

Terminada a diluição e avaliação do sêmen, procedia-se o seu envasamento como descrito a seguir. No Experimento I, metade do ejaculado era envasada em FlatPacks, sendo a outra envasada em palhetas de 0,55 mL (controle). Já no Experimento II, apenas um pequeno volume necessário para o preenchimento de 10 palhetas era assim processado, sendo o restante envasado em FlatPacks. Cada FlatPack continha 5 mL de sêmen diluído, correspondente a uma dose final de 1×10^9 espermatozoides móveis, enquanto que em cada palheta de 0,55 mL colocava-se uma concentração de 100×10^6 espermatozoides móveis, pré-congelamento.

3.2.6.3. Envasamento do sêmen em FlatPacks

O FlatPack é uma embalagem plástica achatada (Eriksson e Rodriguez-Martinez, 2000), feita de polietileno, com espessura de 0,2 mm, 30 cm de comprimento e 22 mm de largura. A sua capacidade é de 5 mL (Figura 3.6). Para o envasamento do sêmen neste sistema, utilizou-se uma sonda metálica fina com 32 cm de comprimento e aproximadamente 01 mm de diâmetro, acoplada a uma seringa plástica com capacidade de 5 mL. A sonda foi introduzida pela abertura existente em uma das extremidades do FlatPack, sendo conduzida até a outra extremidade, devidamente lacrada. A partir daí, iniciava-se o preenchimento de forma que à medida que o FlatPack era preenchido, a sonda metálica era retirada lentamente (Figura 3.7). Após o envasamento do sêmen, lacrava-se o FlatPack utilizando-se uma seladora elétrica¹³ (Figuras 3.8), colocada dentro do balcão refrigerador de forma a manter a temperatura do sêmen a 5-6°C. A seguir, os FlatPacks eram colocados entre duas bandejas com tela metálica, visando-se a manutenção da sua forma achatada. Estas bandejas possuíam 35 cm de comprimento e 25,5 cm de largura, sendo o centro constituído por tela metálica. A bandeja inferior possuía duas alças nas laterais que permitiam o seu encaixe em uma armação metálica presente na caixa de congelamento. Por outro lado, a bandeja superior encaixava-se na inferior, possuindo duas alças nas extremidades, para facilitar a sua manipulação (Figura 3.9).

¹³ Barbi® Maxi 20

3.2.6.4. Envasamento do sêmen em palhetas

O restante do sêmen era acondicionado em recipiente de vidro esterilizado e destinado ao envase em palhetas de 0,55 mL. Tal procedimento foi realizado utilizando-se uma bomba de vácuo¹⁴ apropriada, possuindo uma mangueira plástica longa, adaptada a um sistema de envasamento com capacidade para quinze palhetas por vez. Assim, a bomba era ativada quando as extremidades livres das palhetas eram colocadas em contato com o sêmen, de forma a preenchê-las até alcançar o lacre presente nas extremidades opostas (Figura 3.10). As palhetas eram lacradas com álcool polivinílico armazenado em uma placa de petri (Figura 3.11), sendo o seu excesso retirado com o uso de papel toalha. A seguir, as palhetas eram colocadas em bandejas com tela metálica, descritas anteriormente para o sistema FlatPack. Todo o procedimento de envase foi realizado dentro do balcão refrigerador, procurando-se manter a temperatura entre 5- 6°C.

3.2.6.5. Congelamento do sêmen

Para o pré-congelamento utilizou-se uma caixa de isopor com as seguintes medidas: 30,5 cm de largura, 39,5 cm de comprimento e 34 cm de altura (Figura 3.12). Essa caixa possui estruturas metálicas na sua face superior interna em dois dos seus lados, similares a sete pequenos degraus, com 1 cm de distância entre eles, de forma a permitir o encaixe das bandejas que abrigavam os FlatPacks e as palhetas. Tal sistema permite a manutenção das doses a diferentes distâncias do nitrogênio líquido e assim a utilização de diferentes curvas de congelamento. Para o congelamento, colocava-se uma lâmina de quatro centímetros de altura de nitrogênio líquido, sendo as bandejas posicionadas a uma altura de três centímetros do nitrogênio (Figura 3.13), por um período de 15 minutos para a realização do pré-congelamento, sendo a seguir, mergulhadas diretamente nele (Figura 3.14). A partir daí, os FlatPacks e as palhetas foram transferidos com o auxílio de uma pinça metálica para um botijão contendo nitrogênio líquido (Figura 3.15a e 3.15b), onde ficaram armazenados por no mínimo 60 dias, antes do descongelamento, avaliação física e inseminação artificial (Figura 3.16).

¹⁴ Dia-Pump® Compressor Modelo C – FANEM LTDA®

3.2.6.6. Avaliação do sêmen após o descongelamento

As avaliações do sêmen pós-descongelamento foram realizadas, considerando-se os parâmetros de motilidade, vigor, resistência ao teste de termo-resistência (TTR) e morfologia espermática. Estas avaliações, com exceção das morfologias espermáticas, foram realizadas na Central de Inseminação Artificial de Bovinos (ABS Pecplan), pelo responsável por todas as avaliações do sêmen congelado dos touros da Central, com formação superior (Avaliador 1) e por três médicas veterinárias envolvidas no experimento (Avaliador 2).

Para o descongelamento, os FlatPacks foram colocados em uma proveta com capacidade para 250 mL, contendo água à temperatura de 50°C por 13 segundos, sendo posteriormente mantidos em banho-maria à 37°C por no mínimo 20 segundos. Para a abertura dos FlatPacks localizava-se a sua extremidade, selada pela seladora elétrica, cortando-a com uma tesoura, sendo o sêmen transferido para um tubo de vidro estéril. Por outro lado, as palhetas eram descongeladas diretamente no banho-maria a uma temperatura de 37°C por 30 segundos. As extremidades das mesmas eram cortadas com tesoura, sendo o sêmen também transferido para um tubo de vidro estéril.

Realizou-se o descongelamento sequencial dos 6 ejaculados de cada jumento, compreendendo os 3 ejaculados do EI e os 3 do EII. Primeiramente foram avaliadas as amostras envasadas em palhetas e posteriormente os FlatPacks. Na sequência, realizou-se o TTR das palhetas e FlatPacks que obtiveram resultados satisfatórios nas avaliações físicas realizadas inicialmente. Considerou-se como resultados satisfatórios as amostras avaliadas com motilidade espermática $\geq 30\%$ e vigor ≥ 3 .

Para melhor visualização das células, dificultada na presença de diluidores à base de gema de ovo, optou-se pela utilização da solução Hanks' Balanced Salt Solution®¹⁵, na quantidade de 500 microlitros para as amostras envasadas em palhetas e 2,5 mL para as amostras envolvendo FlatPacks, a uma taxa de diluição de 1:1 (volume de sêmen:volume da solução Hanks'), uma vez

que em todas as avaliações envolvendo FlatPacks, foram utilizados apenas 2,5 mL de sêmen, correspondente a 50% da capacidade dos mesmos.

3.2.6.6.1. Teste de termo resistência (TTR) dos ejaculados

Para realização dos testes de termo resistência (TTR), as palhetas foram colocadas lacradas em banho-maria, a uma temperatura de 37°C, e avaliadas após uma e duas horas pós-descongelamento. Havia duas palhetas de cada ejaculado, sendo cada uma aberta apenas no momento da sua avaliação (uma ou duas horas pós-descongelamento). Já os FlatPacks, eram descongelados da maneira descrita anteriormente, e então colocados em banho-maria a 37°C. Entretanto, devido à limitação quanto ao número de doses/ejaculado, as amostras envolvendo FlatPacks eram abertas no momento da primeira avaliação (uma hora após o descongelamento), divididas em duas partes iguais, sendo a metade destinada à avaliação após uma hora do descongelamento e a outra, duas horas após a sua ocorrência.

À medida que as amostras eram descongeladas, diluía-se o sêmen na solução de Hanks' e colocava-se uma gota entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas em mesa aquecedora a 37°C, após o que eram imediatamente submetidas à avaliação microscópica de campo claro, com aumento de 100X e 400X, visando-se avaliar a motilidade e vigor espermáticos, sendo a motilidade expressa em percentual de células móveis/campo (0 – 100%) e o vigor espermático classificado de 0 a 5, baseando-se na velocidade de deslocamento das células espermáticas nos campos avaliados. Todas as amostras passaram por avaliações do médico veterinário responsável da central (Avaliador 1) e por três médicas veterinárias envolvidas no experimento (Avaliador 2). Cada avaliador anotava o seu resultado separadamente, em um sistema duplo-cego. Este procedimento foi adotado para todas as avaliações, incluindo as das amostras submetidas ao TTR.

3.2.7 Diluidores utilizados

Na tabela 3.2 estão apresentados os diluidores utilizados para o congelamento do sêmen nos experimentos I, II e III.

¹⁵ Sigma - Aldrich

Tabela 3.2. Composição dos diluidores utilizados nos experimentos I, II e III.

<i>Ingredientes</i>	<i>D1*</i>	<i>D2</i>	<i>Total</i>
Solução de Lactose a 11% (mL)	80,00	74,27	77,14
Gema de ovo (mL)	20,00	18,57	19,28
Penicilina G. Potássica cristalina (UI)	100.000	100.000	100.000
Estreptomicina (g)	0,10	0,10	0,10
Orvus es paste (mL)	-----	0,16	0,08
Glicerol (mL)	-----	7,00	3,50
Água (q.s.p, mL)**	100,00	100,00	100,00

* Nagase e Niwa (1964) modificado.

** Água destilada, deionizada e autoclavada.

3.2.8 Sincronização, indução e controle da ovulação, inseminação artificial e controle da gestação

3.2.8.1. Controle reprodutivo das éguas

Para o controle reprodutivo das éguas durante a estação de monta foram realizadas palpações transretais, acompanhadas por ultrassonografia a cada três dias, até o aparecimento de um folículo de 20 mm de diâmetro em um dos ovários. A partir daí, as palpações passaram a ser diárias, sempre pela manhã. No caso da detecção de corpo lúteo em um dos ovários e ausência de edema uterino intramural, administrava-se 1 mL (5 mg) de PGF2 α ¹⁶ intramuscular. Sendo assim, a realização das palpações transretais era retomada após três dias desta aplicação.

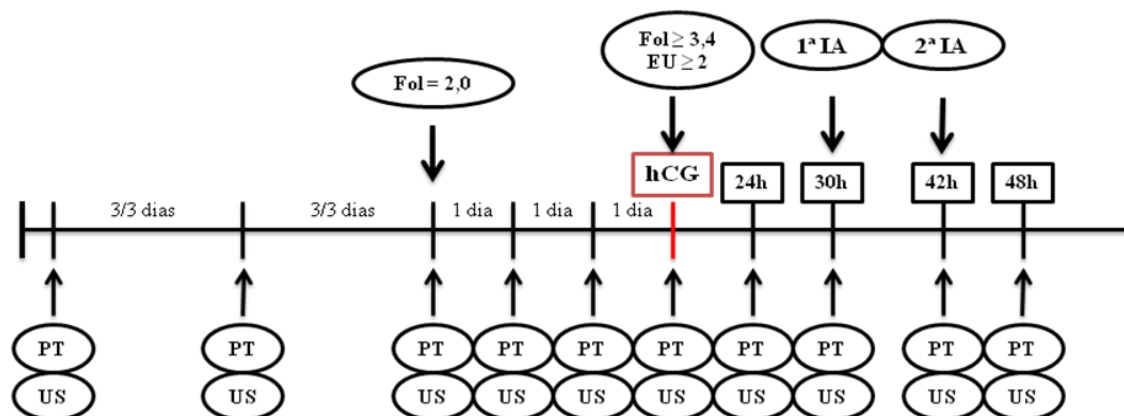
As éguas no “cio do potro” foram submetidas ao mesmo protocolo de controle folicular descrito acima, porém as palpações iniciavam-se no sexto dia pós-parto.

3.2.8.2. Controle da ovulação

Ao ser detectado um folículo dominante com no mínimo 34 mm de diâmetro e presença de edema uterino intramural, a égua em questão recebia em torno de 1.666 UI de hCG¹⁷ endovenosa às 13:00 horas do mesmo dia, a fim de induzir a ovulação. Foi estabelecida uma classificação subjetiva (1-3) para o edema uterino das éguas utilizadas neste experimento (Figuras 3.17a, 3.17b, 3.17c, 3.17d), onde o grau 1 correspondeu à presença de discreto edema uterino intramural e o grau 3 ao edema máximo.

Às 13:00 horas do dia seguinte a égua era submetida a nova palpação transretal (intervalo de 24 horas) seguida de exame ultrassonográfico. No caso da ovulação ser detectada neste momento, submetia-se a égua a uma inseminação, de acordo com o tratamento a qual pertencia. Desta forma, ela recebia, neste caso, apenas uma inseminação pós-ovulação. Não ocorrendo ovulação, outra palpação transretal e ultrassonografia eram realizadas às 19:00 horas deste segundo dia, pós-aplicação de hCG, seguida da primeira inseminação artificial, pré-programada, de acordo com o tratamento ao qual pertencia. Se a ovulação fosse detectada neste momento, a égua em questão receberia apenas esta inseminação pós-ovulação, às 30 horas pós-indução. No caso da ovulação não ter ocorrido até este momento, esta mesma reprodutriz voltaria a ser palpada às 07:00 horas da manhã do dia seguinte, ou seja, do terceiro dia após a aplicação de hCG e inseminada pela segunda vez, às 42 horas após indução com hCG. Se a ovulação fosse então detectada, o protocolo de inseminações se encerrava aí, tendo a reprodutriz recebido uma inseminação pré e outra pós-ovulação. Entretanto, no caso da ovulação ainda não ter ocorrido, esta fêmea seria palpada novamente, a cada seis horas até a constatação da ovulação (Figura 3.18).

¹⁶ Lutalyse® - Pfizer¹⁷ Vetecor® - Hertape Calier



Legenda:

PT – Palpação transretal

US – Ultrassonografia

EU – Edema uterino

hCG – Aplicação de aproximadamente 1666 UI de hCG

1ª IA – Primeira inseminação artificial

2ª IA – Segunda inseminação artificial

Figura 3.18. Controle da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo, em éguas submetidas à aplicação da hCG, quando de um folículo $\geq 3,4$ cm em um dos ovários.

3.2.8.3. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) das éguas do experimento III

Antes da inseminação, a vulva das éguas era higienizada com sabão neutro e água, sendo seca com papel toalha. Após o descongelamento e avaliação física das doses inseminantes, estas eram acondicionadas em tubo de vidro estéril, com capacidade para 22 mL. Este tubo era colocado em recipiente térmico com 12,5 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro, com água a 37°C em seu interior e imediatamente levado para o local onde seria realizada a inseminação. A responsável pela inseminação já se encontrava devidamente preparada, estando o braço protegido por luva¹⁸ descartável e com a pipeta apropriada (flexível ou rígida) em mãos, dependendo do tipo de inseminação a ser realizada. Uma seringa plástica estéril com capacidade para 20 mL foi acoplada à pipeta, sendo o sêmen aspirado do frasco em que estava armazenado.

Nas éguas do E3T1, a pipeta era introduzida pela vulva, passando-se pela cérvix, sendo o sêmen depositado no corpo do útero, utilizando-se uma

pipeta de inseminação rígida¹⁹. Nas éguas do E3T2, depositava-se o sêmen no ápice do corno uterino ipsilateral ao ovário que continha o folículo dominante, utilizando-se uma pipeta flexível²⁰. Para a inseminação no ápice do corno, após a passagem da pipeta flexível pelo cérvix, a responsável pela inseminação retirava a mão do interior da vagina da reprodutriz e a introduzia no reto da mesma, de forma a encaminhar a pipeta até o local adequado, próximo da papila, para a deposição do sêmen, sendo a pipeta retirada imediatamente após o procedimento.

Para o controle de gestação, palpações e rufiações de retorno foram realizadas a partir do 14º dia pós-ovulação, sendo complementadas pelo uso da ultrassonografia.

3.2.9. Análises Estatísticas

O modelo experimental utilizado nos experimentos I e II envolveu os efeitos do reprodutor (n=5) e do método de envase do sêmen (n=2), bem como a interação entre o

¹⁸ Wal Mur®

¹⁹ Provar®

²⁰ Minitub®

reprodutor e o tratamento (método de envase), em três repetições (três ejaculados por reprodutor), sendo avaliadas as características físicas do sêmen (motilidade e vigor). Já o delineamento do experimento III foi o inteiramente ao acaso, sendo a idade e a categoria reprodutiva os critérios utilizados para a formação dos grupos, antes do sorteio das éguas entre os tratamentos (T1 – 7 ciclos reprodutivos) e (T2 – 11 ciclos reprodutivos), envolvendo o local de deposição do sêmen, no corpo do útero ou no ápice do corno uterino (n=2), sendo avaliadas a distribuição das ovulações e a fertilidade das fêmeas equinas inseminadas.

Os resultados dos experimentos I, II e III foram apresentados considerando-se os parâmetros de controle e os parâmetros de resultados, de acordo com Valle (1997). Denomina-se parâmetros de controle, as variáveis que expressam informações apenas sobre a homogeneidade dos tratamentos, não constituindo em si resultados dos experimentos. Por outro lado, os parâmetros de resultados são aqueles que correspondem verdadeiramente aos resultados obtidos nos trabalhos. Nos experimentos I e II da presente dissertação, os parâmetros de controle foram constituídos pelas seguintes variáveis: número de reprodutores, número de ejaculados utilizados/reprodutor, número de montas/ejaculado, volume de sêmen (mL), número total de espermatozoides/mL ($\times 10^6$), número total de móveis/mL ($\times 10^6$), número total de espermatozoides/ejaculado ($\times 10^6$), número total de móveis/ejaculado ($\times 10^6$), volume do diluidor I (D1), volume do diluidor II (D2), taxa de diluição (sêmen:diluidor), concentração espermática/dose inseminante ($\times 10^6$), número potencial de doses produzidas/ejaculado, número real de doses produzidas/ejaculado, intervalo de tempo da coleta à pré-diluição (min), intervalo de tempo da coleta ao resfriamento (min), intervalo de tempo da coleta à diluição final (min) e intervalo de tempo da coleta ao congelamento (min). Considerou-se como parâmetros de resultados, a motilidade e o vigor espermáticos, no transcorrer do processo de congelamento e após o descongelamento do sêmen.

Já no experimento III, os parâmetros de controle considerados foram: o número de ciclos, idade da égua (anos), tamanho do folículo (cm) quando da aplicação da hCG, intervalo de tempo da aplicação da hCG à 1ª inseminação (horas), número de espermatozoides/dose inseminante na 1ª inseminação ($\times 10^6$), intervalo de tempo da aplicação da hCG à 2ª inseminação (horas), número de espermatozoides/dose inseminante na 2ª inseminação ($\times 10^6$), intervalo de tempo da aplicação da hCG à ovulação (horas) e o intervalo de tempo entre as duas últimas palpações (horas). Neste experimento, considerou-se como parâmetro de resultado, a taxa de gestação (%), após a inseminação das éguas.

O vigor espermático avaliado ao longo do processo de congelamento e descongelamento do sêmen, bem como o grau de edema uterino no momento da aplicação da hCG, foram analisadas pela abordagem não-paramétrica, aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis, quando da comparação de mais de duas médias e o teste de Wilcoxon quando da comparação de duas médias. Os valores percentuais de motilidade espermática foram convertidos em arco seno $\sqrt{x}$, antes da realização das análises estatísticas.

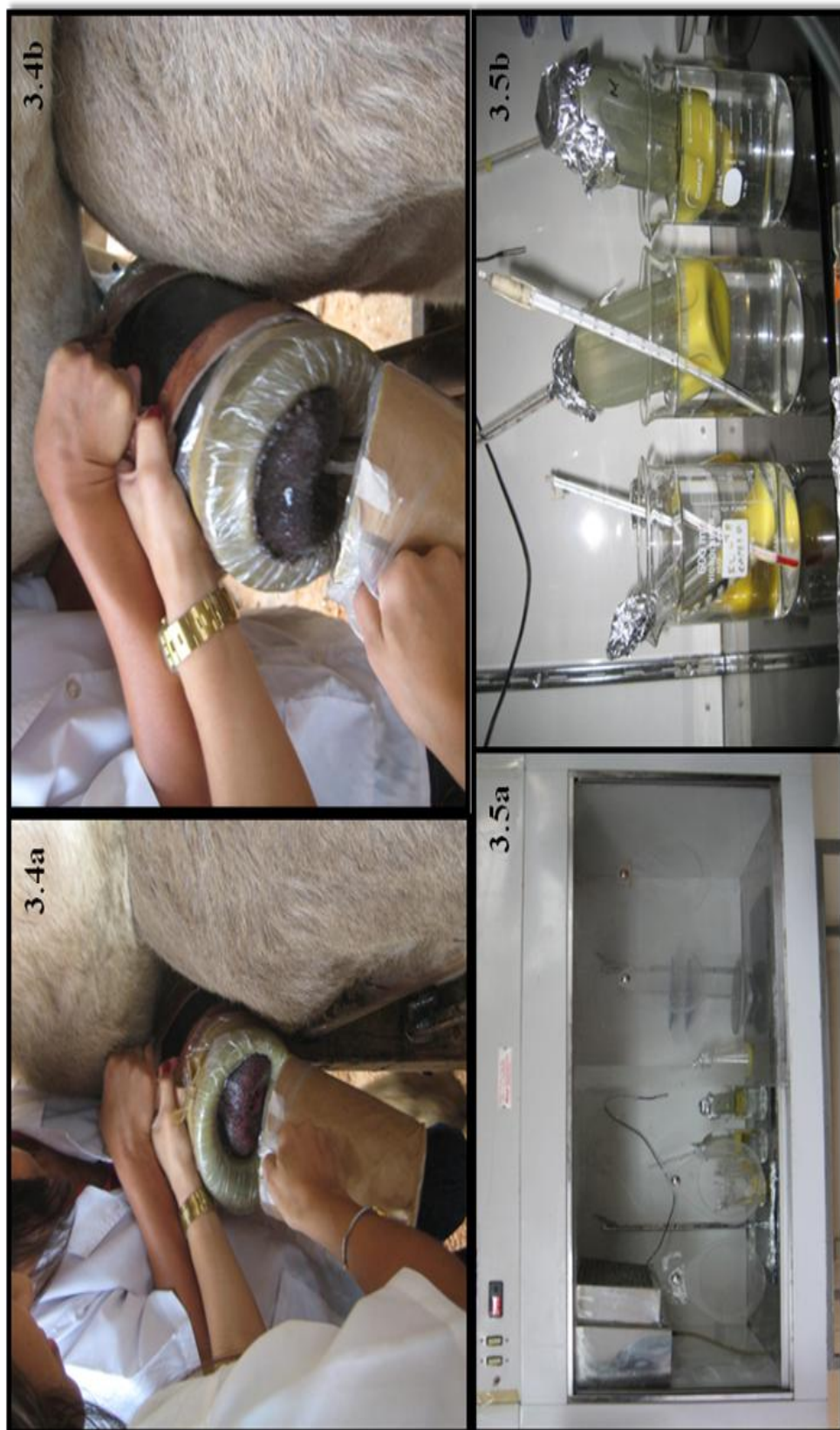
Os dados proporcionais (taxa de gestação) foram avaliados por distribuição de frequência, sendo o teste de Qui-Quadrado (X^2) aplicado para a comparação das médias. Os dados quantitativos foram submetidos ao procedimento GLM (General Linear Models), sendo as médias comparadas pelo teste SNK (Student Newman Keuls), quando da comparação de três ou mais médias, ou pelo teste t de Student, para a comparação de duas médias. Para os experimentos I, II e III os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

Todas as análises foram processadas pelo programa estatístico Statistical Analysis System, versão 5 - Microsoft® (SAS, 1999), sendo o nível de significância adotado de 95% ($p < 0,05$).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 3.1a e 3.1b. Tronco de contenção, coberto, utilizado para realização das coletas de sêmen e inseminações artificiais.
 Figura 3.2a. Vagina artificial modelo aberta.
 Figura 3.2b. Lubrificação do interior da vagina artificial com vaselina sólida.
 Figura 3.3. Copo coletor de sêmen.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 3.4a e 3.4b. Coleta fracionada, necessária a sincronia de dois técnicos à sua realização

Figura 3.5a. Balcão refrigerador horizontal

Figura 3.5b. Recipientes com amostras de sêmen pré-diluídas, colocados em béquers de vidro, contendo 500 mL de água à 37°C, no momento em que procedeu-se ao resfriamento, dentro do balcão refrigerador.



Figura 3.6. FlatPacks.

Figura 3.7. Envase do sêmen em FlatPack, utilizando-se uma sonda metálica.

Figura 3.8. Fechamento do FlatPack, utilizando-se uma seladora elétrica.

Figura 3.9. Bandejas utilizadas para o congelamento do sêmen.

Figura 3.10. Envase do sêmen em palhetas de 0,55 mL, utilizando-se uma bomba de vácuo.

Figura 3.11. Vedação das palhetas com álcool polivinílico.

Fonte: Arquivo pessoal



Fonte: Arquivo pessoal

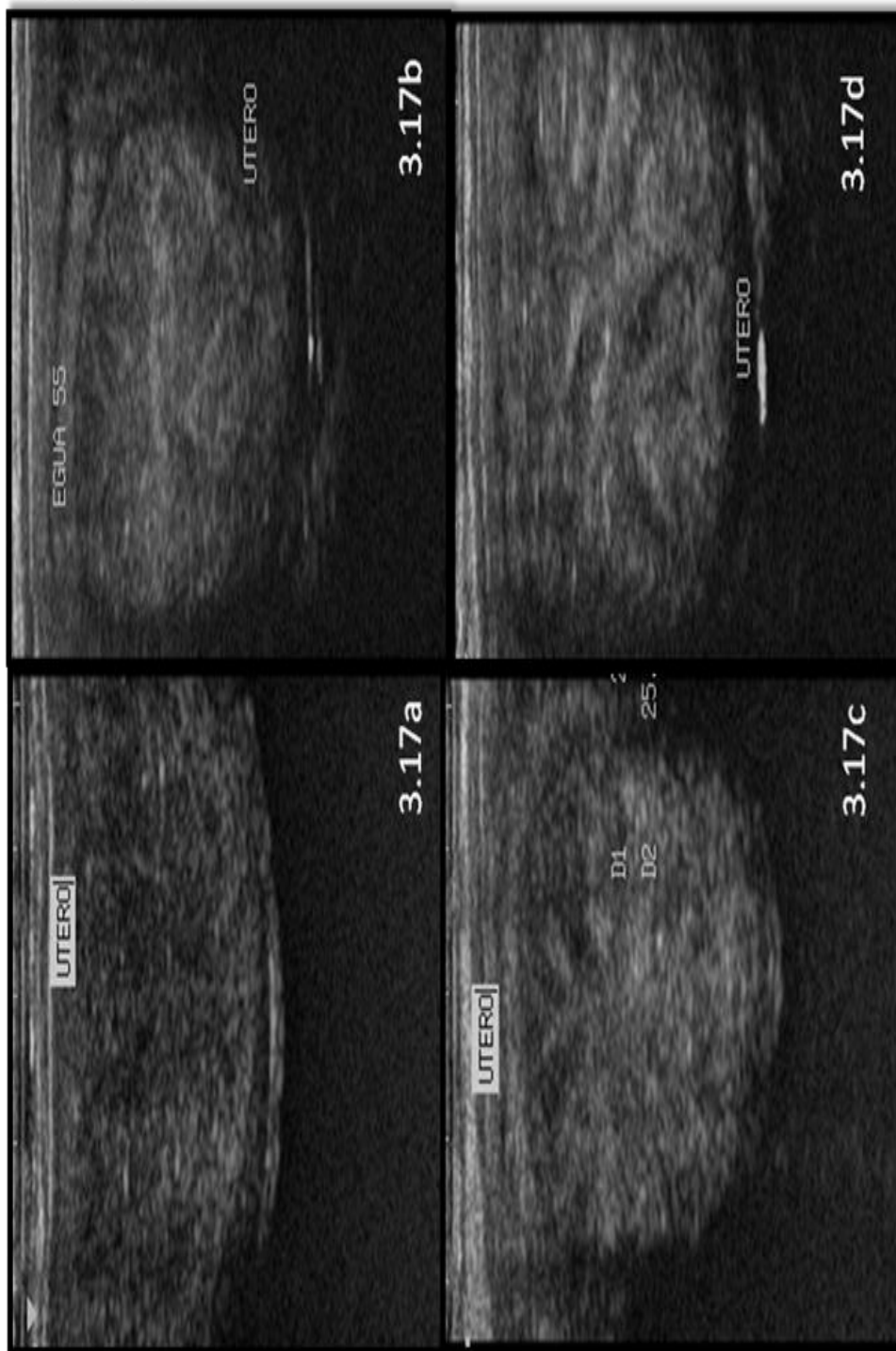
Figura 3.12. Caixa de congelamento

Figura 3.13. Pré-congelamento do sêmen. FlatPacks colocados em bandejas metálicas, mantidos à 3 cm de altura da lâmina de nitrogênio líquido

Figura 3.14. Congelamento do sêmen. FlatPacks colocados em bandejas metálicas, sendo imersos no nitrogênio líquido.

Figura 3.15 a) Retirada dos FlatPacks da caixa de congelamento, com o auxílio de pinça metálica. b) Armazenamento dos FlatPacks em botijão contendo nitrogênio líquido.

Figura 3.16. Inseminação artificial de égua, com sêmen asinino descongelado, utilizando-se pipeta rígida para deposição do sêmen no corpo do útero.



Fonte: Arquivo pessoal

3.17. a) Imagem ultrassonográfica do útero com ausência de edema uterino intramural. b) Imagem ultrassonográfica do útero com edema uterino intramural grau 1. c) Imagem ultrassonográfica do útero com edema uterino intramural grau 2. d) Imagem ultrassonográfica do útero com edema uterino intramural grau 3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento I - Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído e envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento rápida

4.1.1. Comportamento sexual, características físicas do sêmen e protocolo utilizado para o congelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga

Utilizaram-se neste experimento 15 ejaculados oriundos de cinco jumentos da raça Pêga, sendo três ejaculados/jumento, coletados durante o mês de Setembro de 2010. Os dados referentes ao comportamento sexual, às características físicas do sêmen e ao protocolo utilizado para o congelamento do sêmen dos jumentos, estão apresentados na tabela 4.1.

Observa-se, na tabela 4.1, que o número de montas/ejaculado não diferiu ($p>0,05$) entre os jumentos, observando-se uma média de $1,07\pm0,07$ montas/ejaculado. Segundo Henry *et al.* (2009) o comportamento de monta sem ereção é frequentemente realizado pelos equídeos durante o cortejo sexual. Entretanto, esta afirmativa diverge dos resultados obtidos no presente experimento, onde não observou-se uma alta frequência deste comportamento entre os reprodutores. Canisso (2008) observou que os animais jovens apresentaram um maior número de montas/ejaculado, em comparação aos adultos. Assim, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os observados por Canisso (2008), uma vez que, mesmo não havendo diferenças ($p>0,05$) entre os reprodutores, o mais jovem (J3) apresentou maior número de montas/ejaculado em relação aos demais.

Quanto às características seminais, observou-se variações entre os jumentos, embora todas tenham se apresentado dentro dos padrões estabelecidos para a espécie, de acordo com vários autores (Ferreira, 1993; Leite, 1994; Castejón, 2005; Rozas, 2005; Canisso, 2008). No que se refere ao volume da fração rica do sêmen, bem como ao número de espermatozoides totais por ejaculado (Tabela 4.1), os jumentos 2 e 5 apresentaram resultados superiores ($p<0,05$) aos do jumento 4, embora não tenham diferido ($p>0,05$) dos outros dois jumentos (1 e 3), que

também não diferiram entre si ($p>0,05$). Em relação ao número de espermatozoides móveis por ejaculado, os jumentos 2 e 5 apresentaram resultados superiores ($p<0,05$) aos observados para os jumentos 1 e 4, que não diferiram ($p>0,05$) entre si, nem dos observados para os ejaculados do jumento 3. Quanto aos demais parâmetros avaliados (Tabela 4.1), observou-se diferenças ($p<0,05$) entre os jumentos apenas no que se refere ao número de doses produzidas por ejaculado.

O volume médio da fração rica do sêmen nos ejaculados obtidos neste experimento variou de $6,83\pm2,85$ à $21,33\pm2,85$ mL, confirmando a existência de grande variação individual, entre os reprodutores, quanto à este parâmetro, de acordo com trabalhos realizados por diversos autores (Berliner *et al.*, 1938; Lambert e Mckenzie, 1940; Nishikawa, 1959; Mann *et al.*, 1963; Henry *et al.*, 1987; Ferreira, 1993; Mello *et al.*, 2000; Canisso, 2008; Rossi, 2008).

Os valores para o volume total do ejaculado de jumentos, sem a fração gelatinosa, tem variado de 10 a 180 mL, observando-se uma maior frequência em torno de 40 a 100 mL (Nishikawa, 1959; Kenney *et al.*, 1983; Kreuchauf, 1984; Henry *et al.*, 1987; Santos, 1994; Dalmau, 2003). O volume de sêmen oriundo da coleta fracionada foi menor que o oriundo da coleta total do ejaculado em garanhões, sendo que a fração espermática rica representou 45,3% do volume do ejaculado total (Sieme *et al.*, 2004). Tal afirmação justifica o menor volume de sêmen observado no presente estudo, em comparação ao volume dos ejaculados totais de jumentos, descritos na literatura, uma vez que aqui foram realizadas coletas fracionadas, sendo os volumes apresentados, referentes à fração espermática rica dos ejaculados. Apesar de o volume seminal ser uma característica muito variável entre os indivíduos e mesmo entre os ejaculados de um mesmo indivíduo, tem sido descrito na literatura que alguns reprodutores tendem a apresentar sempre um maior volume de sêmen por ejaculado (Kenney *et al.*, 1983; Canisso, 2008). Uma situação similar foi evidenciada no presente experimento, quando o reprodutor 5 apresentou os maiores volumes de sêmen, em comparação aos demais, na maioria dos ejaculados coletados, embora os valores tenham sido diferentes ($p<0,05$) apenas dos apresentados pelo jumento 4.

Tabela 4.1. Comportamento sexual, características físicas do sêmen e protocolo utilizado para o congelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga

Parâmetros avaliados	Jumentos					Total
	1	2	3	4	5	
Nº montas/ejaculado	1,00± 0,15	1,00± 0,15	1,33± 0,15	1,00± 0,15	1,00± 0,15	1,07± 0,07
Volume de sêmen (mL)	11,50± 2,85ab	20,57± 2,85a	12,90± 2,85ab	6,83± 2,85b	21,33± 2,85a	14,63± 1,83
Motilidade (%)	88,33± 1,83	91,67± 1,83	90,00± 1,83	90,00± 1,83	93,33± 1,83	90,67± 0,83
Vigor (0-5)	4,17± 0,15	4,33± 0,15	3,67± 0,15	4,17± 0,15	5,00± 0,15	4,27± 0,13
Nº espermatozoides/mL ($\times 10^6$)	993,33± 233,78	1003,33± 233,78	846,67± 233,78	1230,00± 233,78	930,00± 233,78	1000,67± 94,71
Nº espermatozoides móveis/mL ($\times 10^6$)	878,17± 224,51	922,83± 224,51	762,00± 224,51	1139,00± 224,51	872,67± 224,51	914,93± 91,09
Nº espermatozoides totais/ejaculado ($\times 10^6$)	10636,67± 2613,03ab	19304,33± 2613,03a	11656,00± 2613,03ab	8156,67± 2613,03b	18988,33± 2613,03a	13748,40± 1567,22
Nº espermatozoides móveis/ejaculado ($\times 10^6$)	9383,00± 2359,87b	17615,87± 2359,87a	10490,40± 2359,87ab	7393,00± 2359,87b	17751,83± 2359,87a	12526,82± 1460,31
Volume do diluidor 1 (mL)	16,75± 4,77	32,22± 4,77	22,13± 4,77	15,08± 4,77	33,42± 4,77	23,92± 2,72
Volume do diluidor 2 (mL)	16,75± 4,77	32,22± 4,77	22,13± 4,77	15,08± 4,77	33,42± 4,77	23,92± 2,72
Taxa de diluição (sêmen:diluidor)	1:3,19± 1,00	1:3,33± 1,00	1:3,33± 1,00	1:4,56± 1,00	1:3,33± 1,00	1:3,55± 0,40
Concentração da dose inseminante ($\times 10^6$)	1045,89± 71,77	1039,68± 71,77	849,25± 71,77	996,63± 71,77	1005,56± 71,77	987,40± 33,20
Tempo da coleta à pré-diluição (min.)	3,67± 0,70	3,33± 0,70	3,67± 0,70	2,33± 0,70	3,00± 0,70	3,20± 0,30
Tempo da coleta ao resfriamento (min.)	6,33± 1,15	5,33± 1,15	7,00± 1,15	5,00± 1,15	6,00± 1,15	5,93± 0,47
Tempo da coleta à diluição final (min.)	205,00± 34,12	232,33± 34,12	266,67± 34,12	194,33± 34,12	223,00± 34,12	224,27± 14,53
Tempo da coleta ao congelamento (min.)	260,67± 37,44	272,33± 37,44	308,33± 37,44	235,00± 37,44	282,00± 37,44	271,67± 15,55
Nº de doses produzidas/ejaculado	9,00± 2,39b	17,00± 2,39a	10,33± 2,39ab	7,33± 2,39b	17,33± 2,39a	12,20± 1,43
Nº real de doses produzidas/ejaculado	9,00± 2,11ab	17,00± 2,11a	11,33± 2,11ab	7,33± 2,11b	17,33± 2,11a	12,40± 1,36

^{a,b,c} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ($p < 0,05$).

O ejaculado total de jumentos contém, em média, 20 a 30 bilhões de espermatozoides (Kreuchauf, 1984). Segundo Tischner *et al.* (1974), 80% dos espermatozoides de um ejaculado estão presentes nos três primeiros jatos. Já Kosiniak (1975), observou que os três primeiros jatos responderam por aproximadamente 70% dos espermatozoides presentes no ejaculado total. Ainda, de acordo com Sieme *et al.* (2004), a fração rica correspondeu à 73,2% da concentração espermática do ejaculado total. Sendo assim, o menor número total de espermatozoides observado neste trabalho (Tabela 4.1), quando comparado aos descritos pelos estudos envolvendo coletas totais, justifica-se totalmente, por ter sido aqui coletada apenas a fração rica do sêmen.

De acordo com Kreuchauf (1984), a concentração espermática média por mL de sêmen varia de 100 a 800×10^6 de espermatozoides/mL, sendo que os jumentos apresentam, frequentemente, maiores valores quando comparados aos obtidos em garanhões. Já Dalmau (2003), trabalhando com sêmen asinino, observou concentrações espermáticas variando entre 140 a 545×10^6 espermatozoides/mL. No presente estudo, a concentração espermática média ($\times 10^6$)/mL variou de $846,67 \pm 233,78$ a $1230,00 \pm 233,78$. No entanto, Canisso (2008) observou uma concentração de $254,64 \pm 91,25 \times 10^6$ espermatozoides/mL no ejaculado total de jumentos. Valores similares foram observados, ainda, por Henry *et al.* (1987), Arruda *et al.* (1989) e Rossi (2008). Desta forma, os valores obtidos no presente experimento estão de acordo com o que tem sido descrito na literatura, no que se refere às coletas fracionadas de garanhões, quando a concentração espermática por mL tem sido sempre superior à obtida do ejaculado total (Sieme *et al.*, 2004), uma vez que grande parte do plasma seminal não está presente na fração rica do sêmen.

A motilidade (escala de 0 a 100%) e o vigor (escala de 0 a 5) não diferiram ($p > 0,05$) entre os jumentos. Entretanto, os valores de motilidade observados neste experimento, estão dentro do padrão de normalidade de 70 a 100%, para a espécie, apresentado por diferentes trabalhos na literatura consultada (Nishikawa, 1959; Kreuchauf, 1984; Henry *et al.*, 1987; Santos, 1994). Por outro lado, foram superiores aos observados por Canisso (2008) e Rossi (2008).

Os valores inerentes ao vigor espermático encontram-se também dentro dos padrões descritos como normais para jumentos (Henry *et al.*, 1987, Arruda *et al.*, 1989; Canisso, 2008), sendo porém inferiores aos observados por Rossi (2008).

O volume dos diluidores 1 (D1) e 2 (D2), assim como a taxa de diluição utilizada (sêmen:diluidor), também não diferiram ($p > 0,05$) entre os ejaculados dos cinco reprodutores (Tabela 4.1). Neste experimento utilizou-se uma concentração final fixa de 200×10^6 espermatozoides/mL de sêmen diluído. Assim, a metade do diluidor a ser adicionado era representada pelo D1, sendo a outra metade pelo D2. Desta forma, para cada ejaculado, adicionou-se sempre as mesmas quantidades de D1 e D2, sendo estas determinadas pela concentração espermática do ejaculado, onde quanto maior a concentração do sêmen a fresco, maiores quantidades de D1 e D2 foram adicionadas, resultando, consequentemente, em uma maior taxa de diluição (sêmen:diluidor). Observa-se, neste sentido, que a maior taxa de diluição média utilizada neste experimento foi de $1:4,56 \pm 1,0$ para o jumento 4, exatamente o reprodutor apresentando a maior concentração espermática média por mL, no sêmen *in natura*, coletado fracionado ($1230,00 \pm 233,78$).

A concentração fixa de 200×10^6 espermatozoides/mL no sêmen diluído, pré-congelamento, foi utilizada de acordo com a recomendação descrita na literatura (Arruda, 2000; Canisso, 2008), ou seja, naqueles trabalhos envolvendo a avaliação da fertilidade *in vivo*. Segundo Varner *et al.* (1987), uma redução da viabilidade do sêmen equino somente foi observada quando a concentração foi reduzida para valores abaixo de 20×10^6 espermatozoides/mL, sendo que concentrações de 30 a 50×10^6 espermatozoides/mL resultaram em melhor preservação do sêmen. Ainda, de acordo com estes autores, a presença de substâncias no diluidor, tais como o leite, gema de ovo e proteínas séricas, podem aumentar, de maneira considerável, a resistência espermática diante dos efeitos deletérios de uma alta taxa de diluição.

A concentração espermática por dose inseminante também não apresentou diferenças ($p > 0,05$) entre os reprodutores, no presente

experimento. Observa-se na tabela 4.1 que os valores médios para esta característica variaram de $849,25 \pm 71,77$ a $1045,89 \pm 71,77$ ($\times 10^6$) espermatozoides, para os FlatPacks, apresentando um volume de 5 mL. Para as palhetas, variaram de 84,9 a $104,5 \times 10^6$ de espermatozoides por dose, em virtude das mesmas armazenarem 1/10 do volume dos FlatPacks, ou seja, 0,55 mL/palheta. O número de espermatozoides padrão por dose inseminante não está estabelecido para o sêmen congelado de asininos, embora os critérios mínimos requeridos para obter-se taxas de fertilidade satisfatórias, quando do uso do sêmen congelado de garanhões, envolve uma concentração de 600 milhões de espermatozoides, com motilidade progressiva mínima de 30 a 35%, após o descongelamento (Samper, 2000).

Poucos trabalhos têm sido descritos na literatura, envolvendo a fertilidade de jumentas ou éguas inseminadas com o sêmen congelado de asininos. Neste sentido, Trimeche *et al.* (1998) utilizaram o sêmen congelado de jumentos apresentando 600×10^6 espermatozoides por dose inseminante, com motilidade progressiva mínima de 35% após o descongelamento, para inseminar jumentas da raça Poitou, obtendo uma taxa de gestação de 38%. Papa *et al.* (1999) trabalharam com o sêmen congelado de jumentos e doses inseminantes de 800×10^6 espermatozoides, quando obtiveram uma taxa de gestação de 66% em éguas. Já Oliveira *et al.* (2006), trabalhando com sêmen asinino congelado, utilizaram doses inseminantes contendo 800×10^6 espermatozoides móveis e obtiveram uma taxa de gestação de 40% em éguas. Della'Aqua Júnior (2000), utilizaram doses inseminantes de 50, 100, 300 ou 800×10^6 , não observando diferenças significativas quanto às taxas de gestação obtidas em éguas. Por outro lado, ao trabalhar com sêmen congelado de garanhões, Samper (1995) concluiu que as doses inseminantes contendo menos que 150×10^6 e mais que 800×10^6 de espermatozoides, independentemente da motilidade pós-descongelamento, não resultaram em gestação.

Como observado na tabela 4.1, os períodos da coleta do sêmen à pré-diluição, ao resfriamento, à diluição final e ao congelamento também não diferiram ($p > 0,05$) entre os jumentos, no presente experimento, notando-se uma uniformidade quando do processamento do sêmen durante todo

o estudo. Os intervalos de tempo da coleta do sêmen à pré-diluição, bem como da coleta ao resfriamento, foram os menores possíveis, dentro do protocolo estabelecido para o processamento do sêmen. Assim, logo após a coleta realizou-se uma diluição imediata do sêmen na proporção de 1:1 (volume de sêmen:volume de D1), seguida rapidamente pelo resfriamento, quando colocava-se a amostra dentro do balcão refrigerador, à uma temperatura de 5°C, devidamente protegida por 250 mL de água à 37°C, visando estabelecer uma curva de resfriamento uniforme para todos os ejaculados. Entretanto, o intervalo da coleta do sêmen à diluição final, dependeu da curva de resfriamento utilizada, uma vez que a diluição final, representada pela adição de D2, somente foi realizada quando a amostra de sêmen diluído (D1), atingiu a temperatura de 5-6°C. Já o intervalo de tempo da coleta do sêmen ao congelamento, dependeu, além da curva de resfriamento, da quantidade de D2 a ser adicionada e, conseqüentemente, da concentração espermática/mL. A adição de D2 foi realizada de maneira extremamente lenta, diante da presença de glicerol em sua formulação. Assim, maiores volumes de D2 a serem adicionados resultaram em maior tempo gasto para este procedimento, aumentando assim o intervalo de tempo da coleta ao congelamento, em virtude de ser o mesmo realizado somente quando do término da diluição final.

O número potencial médio de doses inseminantes produzidas/ejaculado foi superior ($p < 0,05$) para os jumentos 2 e 5, em comparação aos jumentos 1 e 4, que além de não diferirem entre si ($p > 0,05$), foram similares ($p > 0,05$) ao rendimento apresentado pelo jumento 3. Já o número real médio de doses inseminantes produzidas/ejaculado foi superior ($p < 0,05$) para os jumentos 2 e 5, em comparação ao jumento 4. Os jumentos 1 e 3 apresentaram valores intermediários, que não diferiram ($p > 0,05$) dos demais (2, 4 e 5), nem entre si ($p > 0,05$). A partir do conhecimento do número total de espermatozoides presentes em um ejaculado, da percentagem de células móveis, bem como do número de espermatozoides necessários por dose inseminante, torna-se possível a determinação do número de éguas a serem inseminadas, utilizando-se um único ejaculado (Xavier, 2006). Sendo assim, como no presente experimento a concentração por dose inseminante utilizada foi pré-estabelecida, o número de doses/ejaculado

variou entre os reprodutores, proporcionalmente às concentrações espermáticas totais e de móveis, apresentadas por cada um dos jumentos utilizados neste estudo.

4.1.2. Efeito do jumento sobre a motilidade e o vigor espermáticos no transcorrer do processo de congelamento e descongelamento do sêmen

Como pode ser observado na Tabela 4.2, a motilidade espermática foi influenciada ($p < 0,05$) pelo jumento e pelo tempo de armazenamento do sêmen, verificando-se ainda uma interação entre jumento e tempo de armazenamento.

Os dados referentes à motilidade espermática de cada reprodutor, nos diferentes momentos do

processo de congelamento e descongelamento, que compreenderam as avaliações realizadas logo após a coleta (sêmen a fresco), após a pré-diluição (pré-diluído), após a diluição final (pós-diluído) e após o descongelamento (pós-descongelado), estão apresentados na tabela 4.3.

Tabela 4.2. Análise dos fatores que influenciaram a motilidade espermática do sêmen de cinco jumentos no transcorrer do processo de congelamento e após o descongelamento

<i>Fatores que influenciaram a motilidade</i>	<i>Valor de p*</i>
Jumento	0,0126
Momento de avaliação	0,0001
Interação Jumento X tempo de armazenamento	0,0001

* $p < 0,05$

Tabela 4.3. Efeito do jumento sobre a motilidade espermática no transcorrer do processo de congelamento e após o descongelamento do sêmen

Jumento	Motilidade espermática no transcorrer do processo de congelamento/descongelamento			
	Sêmen Fresco	Pré-Diluído	Pós-Diluído	Pós-Descongelado
1	88,33±4,13 ^a	88,33±4,13 ^a	86,67±4,13 ^a	4,58±2,07 ^c
2	91,67±4,13 ^a	91,67±4,13 ^a	90,00±4,13 ^a	5,00±2,26 ^c
3	90,00±4,13 ^a	90,00±4,13 ^a	86,67±4,13 ^a	10,50±2,26 ^c
4	90,00±4,13 ^a	90,00±4,13 ^a	85,00±4,13 ^a	42,50±2,07 ^b
5	93,33±4,13 ^a	93,33±4,13 ^a	88,33±4,13 ^a	14,29±2,70 ^c
TOTAL	90,67±2,98	90,67±2,98	87,33±2,98	16,08±1,62

^{a,b,c} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ($p < 0,05$).

Observou-se que os valores de motilidade espermática não diferiram ($p > 0,05$), entre os cinco jumentos, para nenhum dos períodos avaliados, durante todo o processo de congelamento do sêmen, (sêmen a fresco, pré-diluído e pós-diluído). Entretanto, após o descongelamento, os valores diferiram ($p < 0,05$) entre os jumentos, havendo uma superioridade ($p < 0,05$) do jumento 4, em relação aos demais que, entretanto, não diferiram ($p > 0,05$) entre si.

Os valores de vigor espermático inerentes a cada reprodutor, nos diferentes momentos do processo de congelamento e descongelamento, compreendendo as avaliações realizadas logo após a coleta (sêmen a fresco), após a pré-diluição (pré-diluído), após a diluição final (pós-diluído) e após o descongelamento (pós-descongelado), encontram-se na tabela 4.4.

Tabela 4.4. Efeito do jumento sobre o vigor espermático no transcorrer do processo de congelamento e após o descongelamento do sêmen

Jumento	Vigor espermático no transcorrer do processo de congelamento/descongelamento			
	Sêmen Fresco	Pré-Diluído	Pós-Diluído	Pós-Descongelado
1	4,17±0,43 ^{aA}	4,67±0,43 ^{aA}	4,50±0,43 ^{aA}	0,92±0,21 ^{bC}
2	4,33±0,43 ^{aA}	4,50±0,43 ^{aA}	4,17±0,43 ^{aA}	1,50±0,23 ^{bBC}
3	3,67±0,43 ^{aA}	4,67±0,43 ^{aA}	4,00±0,43 ^{aA}	2,25±0,23 ^{bB}
4	4,17±0,43 ^{abA}	4,83±0,43 ^{aA}	4,00±0,43 ^{abA}	3,58±0,21 ^{bA}
5	5,00±0,43 ^{aA}	4,83±0,43 ^{aA}	4,67±0,43 ^{aA}	2,29±0,28 ^{bB}
TOTAL	4,27±0,25	4,70±0,25	4,27±0,25	2,11±0,14

^{a, b, c} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si (p < 0,05).

^{A, B, C} Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si (p < 0,05).

Observou-se que os valores de vigor espermático não diferiram (p>0,05) entre os cinco jumentos, não observando-se também, efeito do momento de avaliação (p>0,05), durante todo o processo de congelamento do sêmen, (sêmen a fresco, pré-diluído e pós-diluído) sobre esta variável. No que diz respeito ao sêmen pós-descongelamento, observou-se uma redução (p<0,05) dos valores de vigor espermático, para todos os reprodutores, quando comparados aos observados durante o processo de congelamento (Tabela 4.4). Além disso, quando da avaliação do sêmen após o descongelamento, observou-se efeito do jumento (p<0,05) sobre o vigor espermático. Similarmente ao que ocorreu, quando da avaliação da motilidade espermática após o descongelamento (Tabela 4.3), o reprodutor 4 apresentou valores de vigor superiores (p<0,05) aos demais (J1, J2, J3 e J5), que também diferiram (p<0,05) entre si (Tabela 4.4).

Assim, os valores inerentes ao vigor espermático foram similares (p>0,05) para os jumentos 2, 3 e 5, sendo que os dos jumentos 3 e 5 diferiram (p<0,05) dos valores de vigor apresentados pelo jumento 1. Finalmente, observou-se que os resultados dos jumentos 1 e 2 se equivaleram (Tabela 4.4 - p>0,05).

Os principais danos sofridos pelas células espermáticas, no transcorrer do processo de criopreservação, acontecem durante o resfriamento e o descongelamento (Furst, 2006). Sendo assim, para a obtenção de resultados satisfatórios pós-descongelamento, torna-se necessário uma perfeita interação entre diluidor, crioprotetor, curva de resfriamento e de aquecimento, de forma a minimizar a formação de cristais de gelo, a desidratação celular e as

lesões causadas pelo choque térmico (Jasko, 1994; Cottorello, 2002). Observa-se na tabela 4.1 que os mesmos procedimentos foram adotados para todos os reprodutores, no presente experimento. Entretanto, apenas um deles (J4), apresentou resultados de motilidade e de vigor espermáticos satisfatórios após o descongelamento (Tabelas 4.3 e 4.4). Assim, pode ser que neste reprodutor, as interações mencionadas anteriormente podem ter ocorrido de maneira adequada, de forma que os procedimentos utilizados foram capazes de oferecer proteção às células espermáticas, frente ao choque térmico, como preconizado por Kayser *et al.* (1992).

No presente estudo, não foi realizado qualquer tipo de seleção dos reprodutores e/ou dos ejaculados quanto ao seu desempenho durante o processo de congelamento/descongelamento. Possivelmente, isto possa ter contribuído para os baixos valores de motilidade e de vigor espermáticos, observados após o descongelamento (Canisso, 2008). Segundo Tischner (1979) parece haver uma congelabilidade específica para cada indivíduo. Tal afirmação explica o fato de um reprodutor (J4) apresentar uma qualidade seminal pós-descongelamento bem superior aos demais, como observado neste trabalho. Tal individualidade vem sendo constantemente relatada na literatura, não só quanto à sensibilidade das células espermáticas ao congelamento, mas até mesmo à procedimentos menos agressivos, como por exemplo o resfriamento do sêmen diluído, por diferentes períodos.

Além disso, parece que os valores de motilidade e de vigor espermáticos pós-descongelamento

não dependem dos valores encontrados antes do processo de congelamento (Tischner, 1979). Concordando com esta afirmação, observou-se que o jumento 4 deste experimento, não apresentou valores de motilidade e de vigor superiores aos demais no sêmen a fresco (Tabelas 4.3 e 4.4).

Em estudo conduzido por Kreuchauf (1984), o percentual médio de motilidade espermática do sêmen asinino, observado após descongelamento, utilizando-se o diluidor preconizado por Nagase e Graham (1964) foi de 50%, superior à maior média observada no presente estudo, de 42,50% para o jumento 4 (Tabela 4.3). Por outro lado, Canisso (2008) observou uma motilidade total média, pós-descongelamento, de $37,32 \pm 5,91\%$ para o sêmen de asininos, diluído no diluidor Nagase e Niwa (1964) modificado, sendo os valores observados por ele superiores aos de todos os jumentos utilizados neste experimento, com exceção do reprodutor 4, que apresentou uma motilidade total média de $42,50 \pm 2,07\%$.

De acordo com Papa (1987), o vigor espermático é um parâmetro de fundamental importância, quando da avaliação do sêmen congelado de garanhões. Canisso (2008) obteve um valor de $3,32 \pm 0,28$ ($p > 0,05$) para o vigor espermático médio do sêmen descongelado, similarmente ao que encontrou-se na literatura consultada, citados por Martin *et al.* (1979) e Papa (1987), ao trabalharem com sêmen congelado/descongelado de garanhões. O mesmo pode ser dito dos resultados apresentados por Silva *et al.* (1997), ao trabalharem com sêmen congelado/descongelado de jumentos. Tais valores são superiores aos apresentados pelos jumentos do presente experimento, excetuando-se os do jumento 4, que apresentou um vigor espermático médio de $3,58 \pm 0,21$.

Miró *et al.* (2003) descreveram que a viabilidade espermática do sêmen de asininos, após o processo de congelamento e descongelamento, variou de 23% a 60%, sendo notável a grande variação individual. No presente trabalho, apenas o jumento 4 colocou-se dentro do intervalo observado pelos autores.

4.1.3. Efeito do jumento e do tipo de envasamento sobre a motilidade e o vigor espermáticos, observados após o descongelamento do sêmen

Verifica-se no item 3.2.6.6 do Material e Métodos (Avaliação do sêmen após o descongelamento) que o sêmen de todos os reprodutores foi avaliado, após o descongelamento, por dois avaliadores, em um sistema duplo cego. Entretanto, não observou-se diferenças ($p > 0,05$) entre os avaliadores para nenhuma das características espermáticas avaliadas (motilidade ou vigor).

Como pode ser observado na tabela 4.5, apenas a variável jumento influenciou ($p < 0,05$) a motilidade espermática avaliada após o descongelamento, não havendo efeito ($p > 0,05$) do tipo de envasamento, nem interação entre jumento e tipo de envasamento ($p > 0,05$).

Tabela 4.5. Análise dos fatores que influenciaram a motilidade espermática do sêmen após o descongelamento

Fatores de variação	Valor de p*
Jumento	0,0001
Tipo de envasamento	0,6831
Interação Jumento X tipo de envasamento	0,2293

* $p < 0,05$

Os dados referentes à motilidade espermática após descongelamento do sêmen de cada reprodutor, nos diferentes tipos de envase do sêmen, estão descritos na tabela 4.6. Não havendo influência ($p > 0,05$) dos avaliadores sobre a motilidade, os dados inerentes aos mesmos não foram incluídos da tabela 4.6.

Observou-se que os valores de motilidade espermática, após o descongelamento, mostram superioridade ($p < 0,05$) do jumento 4 em relação aos demais, independentemente do tipo de envasamento ao qual o sêmen foi submetido. Os jumentos 3 e 5 apresentaram resultados intermediários e similares ($p > 0,05$) entre si, embora superiores ($p < 0,05$) aos observados para os jumentos 1 e 2, que embora ruins, também não diferiram ($p > 0,05$) entre si.

Tabela 4.6. Efeito do jumento e do tipo de envasamento do sêmen sobre a motilidade espermática avaliada após o descongelamento do sêmen

Jumento	Tipo de Envasamento		
	FlatPack	Palheta	FlatPack + Palheta
1	7,50±3,44	1,67±3,44	4,58±2,43 ^C
2	5,00±3,44	5,00±4,21	5,00±2,72 ^C
3	9,17±3,44	12,50±4,21	10,83±2,72 ^B
4	36,67±3,44	48,33±3,44	42,50±2,43 ^A
5	17,50±4,21	10,00±4,86	13,75±3,22 ^B
TOTAL	15,17±1,61	15,50±1,82	16,08±2,43

^{A, B, C} Médias seguidas por letras diferentes na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

Os dados referentes ao vigor espermático pós-descongelamento, para cada reprodutor, nos diferentes tipos de envase do sêmen, estão apresentados na tabela 4.7. Também no que se refere ao vigor espermático, não observou-se

influência ($p > 0,05$) do tipo de envasamento, nem interação Jumento x Tipo de envasamento ($p > 0,05$). Para esta característica, observou-se efeito ($p < 0,05$) apenas dos reprodutores.

Tabela 4.7. Efeito do jumento e do tipo de envasamento do sêmen sobre o vigor espermático, avaliado após o descongelamento do sêmen

Jumento	Tipo de Envasamento		
	FlatPack	Palheta	FlatPack + Palheta
1	1,33±0,37	0,50±0,37	0,92±0,26 ^C
2	1,50±0,37	1,50±0,45	1,50±0,29 ^{BC}
3	2,17±0,37	2,38±0,45	2,27±0,29 ^B
4	3,17±0,37	4,00±0,37	3,58±0,26 ^A
5	2,50±0,45	2,00±0,52	2,25±0,34 ^B
TOTAL	2,13±0,17	2,08±0,19	2,11±0,18

^{A, B, C} Médias seguidas por letras diferentes na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

Assim, observou-se que os valores de vigor espermático pós descongelamento apresentados pelo reprodutor 4 diferiram ($p < 0,05$) dos demais reprodutores. Os reprodutores 2, 3 e 5 não diferiram ($p > 0,05$) entre si, sendo que o reprodutor 2 apresentou resultado similar ($p > 0,05$) ao do reprodutor 1, que no entanto diferiu ($p < 0,05$) dos reprodutores 3, 4 e 5.

As comparações realizadas entre os dois tipos de envase, FlatPack e palheta de 0,55 mL, mostraram resultados similares quanto aos parâmetros de motilidade e vigor espermáticos avaliados, após descongelamento. No mesmo sentido, Silva *et al.* (1997) observaram que os valores de motilidade e vigor espermáticos, avaliados após a realização do teste de termo-resistência (TTR), não diferiram ($p > 0,05$) entre os diferentes sistemas de envasamento utilizados (macrotubo - 4 mL ou tubo de alumínio - 10

mL). Oliveira (2005) comparou dois tipos de envase para o congelamento do sêmen asinino (macrotubo de 2,5 mL e palhetas de 0,55 mL), e também não observou diferenças estatísticas entre eles. Ao trabalharem com sêmen congelado de garanhões, Samper *et al.* (1994) observaram valores de fertilidade similares ao utilizarem palhetas (64,3%) ou macrotubos (59,8%). Por outro lado, Saravia (2008), trabalhando com sêmen congelado de suínos, observou que a motilidade não diferiu entre os diferentes sistemas de envasamento utilizados. Entretanto, a integridade da membrana plasmática foi superior no sêmen envasado em FlatPack de 5mL (54%) e de 0,7 mL (49%), quando comparada à observada nas palhetas de 0,55 mL (38%).

Ainda, no presente momento, não está determinado o método de envase ideal para o sêmen congelado de jumentos, capaz

de proporcionar os melhores resultados de motilidade e vigor espermáticos pós-descongelamento. Entretanto, tem sido observado que a palheta de 0,55 mL oferece maior praticidade quando do armazenamento e do descongelamento do sêmen (Oliveira, 2005), sendo então o método mais empregado para o congelamento de sêmen nesta espécie (Vieira *et al.*, 1985; Arruda *et al.*, 1986; Trimeche *et al.*, 1996; Trimeche *et al.*, 1997; Papa *et al.*, 1999).

Deve-se salientar, neste momento, que vários autores envolvidos com o sêmen congelado de equinos observaram diferenças estatísticas entre alguns tipos de envase. Assim, Papa *et al.* (1991) descreveram que a motilidade espermática das amostras de sêmen envasadas em palhetas foi superior às acondicionadas em macrotubos, quando apresentaram valores de 36% e 26%, respectivamente, após a realização do TTR. No mesmo sentido, Heitland *et al.* (1996) também observaram melhores resultados pós-descongelamento para o sêmen envasado em palhetas (menores volumes), em comparação aos macrotubos (maiores volumes). Ainda, Dell'Aqua Júnior (2000) observou melhores resultados de motilidade e vigor espermáticos ($p < 0,05$) pós-descongelamento, nas amostras de sêmen envasadas em palhetas de 0,55 mL ou

mini palhetas de 0,25 mL, quando comparados aos obtidos no sêmen envasado em macrotubos de 4 mL.

Independentemente do tipo de envasamento do sêmen, mais uma vez observou-se superioridade do jumento 4 em relação aos demais, no que diz respeito aos parâmetros seminais pós-descongelamento, avaliados no presente experimento. Deve-se enfatizar que a influência do indivíduo sobre os parâmetros de motilidade e vigor espermáticos no sêmen pós-descongelamento, está amplamente respaldada na literatura, que também descreve a individualidade do reprodutor como um fator de fundamental importância para o sucesso da utilização do sêmen congelado de equídeos (Amann *et al.* 1987; Ferreira, 1993; Santos, 1994; Silva Filho, 1994; Palhares, 1997; Miró *et al.*, 2003; Rossi, 2008; Contri *et al.*, 2010).

4.1.4. Efeito do jumento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento

Os dados referentes ao efeito do jumento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento estão apresentados na tabela 4.8.

Tabela 4.8. Efeito do jumento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento, considerando-se a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3) isoladamente ou quando agrupados (motilidade $\geq 30\%$ e vigor ≥ 3)

Jumento	Motilidade $\geq 30\%$	Vigor ≥ 3	Motilidade $\geq 30\%$ Vigor ≥ 3
1	0/12 (0,00%)	1/12(8,33%)	0/12(0,00%)
2	0/10(0,00%)	2/10(20,00%)	0/10(0,00%)
3	1/10(10,00%)	2/10(20,00%)	1/10(10,00%)
4	10/12(83,33%)	11/12(91,67%)	10/12(83,33%)
5	2/7(28,57%)	2/7(28,57%)	2/7(28,57%)
TOTAL	13/51(25,49%)	18/51(35,29%)	13/51(25,49%)

Observou-se que os jumentos apresentaram uma influência significativa ($p < 0,05$) sobre o percentual de ejaculados aprovados, sendo mais uma vez notável a superioridade do jumento 4. Diante destes dados, vale ressaltar a importância da variação individual quanto aos resultados apresentados pelo sêmen dos reprodutores, quando submetido ao processo de congelamento e descongelamento, o que está de acordo com a literatura (Amann *et al.* 1987; Ferreira, 1993;

Santos, 1994; Silva Filho, 1994; Palhares, 1997; Miró *et al.*, 2003; Rossi, 2008; Contri *et al.*, 2010).

No presente experimento, 25,49% dos ejaculados avaliados foram considerados como aproveitáveis. Analisando cada reprodutor separadamente, observou-se uma taxa de aproveitamento de ejaculados variando de 0 a 83,33%. No trabalho realizado por Pickett *et al.*

(1987), as taxas de aproveitamento encontradas variaram de 33% a 76%, bem superiores às apresentadas pelos reprodutores do presente estudo, com exceção do jumento 4, que teve 83,33% (10/12) dos seus ejaculados considerados como aproveitáveis.

Tischner (1979) sugere a existência de uma congelabilidade específica para cada indivíduo. Assim, para obtenção de melhores resultados envolvendo o aproveitamento de ejaculados se faz necessária uma seleção dos reprodutores e/ou dos ejaculados, em relação à sua sensibilidade ao processo de congelamento/descongelamento (Canisso, 2008). Entretanto, esta seleção não foi

realizada no presente experimento, colaborando, possivelmente, para os baixos percentuais de aproveitamento de ejaculados apresentados pelos reprodutores em questão, quando apenas o jumento 4 apresentou resultados satisfatórios (83,33%).

4.1.5. Efeito do sistema de envasamento do sêmen sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento

Os dados referentes ao efeito do sistema de envasamento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento estão apresentados na tabela 4.9.

Tabela 4.9. Efeito do sistema de envasamento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento, considerando-se motilidade ($\geq 30\%$) e vigor (≥ 3) isoladamente ou quando agrupados (motilidade $\geq 30\%$ e vigor ≥ 3)

Sistema de Envasamento	Motilidade $\geq 30\%$	Vigor ≥ 3	Motilidade $\geq 30\%$ Vigor ≥ 3
FlatPack	6/28 (21,43%)	9/28(32,14%)	6/28(21,43%)
Palheta	7/23(30,43%)	9/23(39,13%)	7/23(30,43%)
TOTAL	13/51(25,49%)	18/51(35,29%)	13/51(25,49%)

Observou-se que o sistema de envasamento não influenciou ($p>0,05$) o percentual de ejaculados aproveitados. Tais resultados estão de acordo com os apresentados por Samper *et al.* (1994), Silva *et al.* (1997) e Oliveira (2005), que também não observaram diferenças estatísticas entre os métodos de envase avaliados. Entretanto, discordam dos resultados descritos por Papa *et al.* (1991), Heitland *et al.* (1996) e Dell'Aqua Júnior (2000), que observaram melhores resultados pós-descongelamento para o sêmen envasado em recipientes com menor volume (palhetas), em comparação àqueles com volume maior (macrotubos).

4.2. Experimento II: Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento lenta.

4.2.1. Comportamento sexual, características físicas do sêmen e protocolo utilizado para o congelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga

Utilizaram-se neste experimento 15 ejaculados oriundos de cinco jumentos da raça Pêga, sendo três ejaculados/jumento, coletados durante os meses de Setembro e Outubro de 2010. Os dados

referentes ao comportamento sexual, às características físicas do sêmen e ao protocolo utilizado para o congelamento do sêmen dos jumentos, estão apresentados na tabela 4.10.

Observa-se, na tabela 4.10, que o número de montas/ejaculado não diferiu ($p>0,05$) entre os jumentos, sendo em média de $1,47 \pm 0,19$, com variação de $1,00 \pm 0,42$ a $2,00 \pm 0,42$ montas/ejaculado.

No que se refere ao volume da fração rica do sêmen, os jumentos 2 e 5 apresentaram resultados superiores ($p<0,05$) aos observados para os jumentos 1 e 4, embora não diferissem ($p>0,05$) dos valores observados para o jumento 3. Por sua vez, o jumento 3 apresentou um volume intermediário, que não diferiu ($p>0,05$) de nenhum dos valores apresentados pelos jumentos 1, 2, 4 e 5. O volume da fração rica do sêmen dos ejaculados dos jumentos utilizados neste experimento, variou de $10,67 \pm 3,73$ a $32,67 \pm 3,73$ mL, demonstrando-se a influência da variação individual sobre este parâmetro, o que também foi observado nos trabalhos realizados por diversos autores (Berliner *et al.*, 1938; Lambert e Mckenzie, 1940; Nishikawa, 1959; Henry *et al.*, 1987; Ferreira, 1993; Mello *et al.*, 2000; Canisso, 2008; Rossi, 2008).

Tabela 4.10. Comportamento sexual, características físicas do sêmen e protocolo utilizado para o congelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga

Parâmetros avaliados	Jumentos					Total
	1	2	3	4	5	
N° montas/ejaculado	1,67± 0,42	2,00± 0,42	1,00± 0,42	1,00± 0,42	1,67± 0,42	1,47± 0,19
Volume de sêmen (mL)	10,67± 3,73 ^b	28,23± 3,73 ^a	18,33± 3,73 ^{ab}	11,40± 3,73 ^b	32,67± 3,73 ^a	20,26± 2,75
Motilidade (%)	85,00± 2,89	88,33± 2,89	88,33± 2,89	83,33± 2,89	95,00± 2,89	88,00± 1,53
Vigor (0-5)	4,00± 0,20	4,17± 0,20	4,17± 0,20	4,33± 0,20	4,83± 0,20	4,30± 0,11
N° espermatozoides/mL (×10 ⁶)	710,00± 142,31	586,67± 142,31	870,00± 142,31	1043,33± 142,31	860,00± 142,31	814,00± 67,91
N° espermatozoides móveis/mL (×10 ⁶)	610,00± 142,72	510,67± 142,72	778,33± 142,72	881,67± 142,72	817,00± 142,72	719,53± 65,31
N° espermatozoides totais/ejaculado (×10 ⁶)	7541,67± 3857,73 ^b	16118,00± 3857,73 ^{ab}	15608,33± 3857,73 ^{ab}	12026,00± 3857,73 ^{ab}	28631,67± 3857,73 ^a	15985,13± 2378,12
N° espermatozoides móveis/ejaculado (×10 ⁶)	6489,00± 3789,51 ^b	13982,67± 3789,51 ^{ab}	14274,00± 3789,51 ^{ab}	10184,80± 3789,51 ^b	27200,08± 3789,51 ^a	14426,11± 2354,28
Volume do diluidor 1 (mL)	13,00± 6,62 ^b	29,48± 6,62 ^b	26,58± 6,62 ^b	18,47± 6,62 ^b	54,83± 6,62 ^a	28,47± 4,59
Volume do diluidor 2 (mL)	13,00± 6,62 ^b	29,48± 6,62 ^b	26,58± 6,62 ^b	18,47± 6,62 ^b	54,83± 6,62 ^a	28,47± 4,59
Taxa de diluição (sêmen:diluidor)	1:2,43± 0,57	1:2,11± 0,57	1:2,99± 0,57	1:3,18± 0,57	1:3,34± 0,57	1:2,81± 0,25
Concentração da dose inseminante (×10 ⁶)	903,09± 134,42	934,60± 134,42	943,68± 134,42	1069,22± 134,42	851,78± 134,42	940,48± 54,32
Tempo da coleta à pré-diluição (min.)	2,00± 0,84	2,67± 0,84	3,00± 0,84	3,33± 0,84	4,00± 0,84	3,00± 0,37
Tempo da coleta ao resfriamento (min.)	3,67±0,68 ^b	6,00± 0,68 ^b	5,67± 0,68 ^b	6,33± 0,68 ^b	9,00± 0,68 ^a	6,13± 0,52
Tempo da coleta à diluição final (min.)	348,00± 44,24	256,67± 44,24	262,33± 44,24	279,00± 44,24	406,33± 44,24	310,47± 22,80
Tempo da coleta ao congelamento (min.)	435,67± 51,98	297,67± 51,98	369,00± 51,98	360,67± 51,98	463,00± 51,98	385,20± 25,11
N° de doses produzidas/ejaculado	6,00±3,72 ^b	13,67± 3,72 ^{ab}	13,67± 3,72 ^{ab}	9,67± 3,72 ^b	26,67± 3,72 ^a	13,93± 2,33
N° real de doses produzidas/ejaculado	7,33± 3,40 ^b	15,33± 3,40 ^b	14,33± 3,40 ^b	9,67± 3,40 ^b	33,00± 3,40 ^a	15,93± 2,73

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si (p < 0,05).

Aparentemente, com exceção do jumento 1, todos os demais reprodutores apresentaram um maior volume da fração rica do sêmen no experimento II, em relação ao experimento I.

No que se refere ao número total de espermatozoides (x10⁶) /ejaculado, o jumento 5 apresentou valor superior (p<0,05) ao do jumento 1, embora estes valores tenham sido

similares ($p>0,05$) aos apresentados pelos jumentos 2, 3 e 4. O número total de espermatozoides móveis ($\times 10^6$) /ejaculado também apresentou-se superior ($p<0,05$) no jumento 5, quando comparado aos valores apresentados pelos jumentos 1 e 4, que não diferiram entre si ($p>0,05$). Porém, os valores apresentados pelos reprodutores 2 e 3, relativos à mesma variável, foram similares entre si e aos dos demais reprodutores (J1, J4 e J5). Aparentemente, com exceção do jumento 3, todos os demais reprodutores apresentaram menores valores quanto ao número de espermatozoides totais e móveis ($\times 10^6$) /mL de sêmen no experimento II em relação ao experimento I.

Os maiores valores referentes ao jumento 5, quanto ao número total de espermatozoides ($\times 10^6$) /ejaculado e ao número de espermatozoides móveis ($\times 10^6$) /ejaculado deveu-se, provavelmente, ao maior volume de sêmen (mL) apresentado por este reprodutor, em relação aos demais reprodutores, embora as diferenças entre eles, nem sempre tenham sido significativas. Há que se salientar, ainda, a similaridade ($p>0,05$) observada entre os reprodutores, no que diz respeito à concentração espermática total e de móveis por mL de sêmen (Tabela 4.10).

O volume dos diluidores 1 (D1) e 2 (D2) foram superiores ($p<0,05$) para o reprodutor 5, em relação aos demais. Como explicado quando da discussão dos resultados do experimento I, as quantidades de D1 e D2, a serem adicionadas ao sêmen, foram determinadas pela concentração espermática do ejaculado. Neste caso, como o número de espermatozoides totais e móveis ($\times 10^6$) por mL de sêmen, não diferiram entre os reprodutores, o maior volume de sêmen apresentado pelo jumento 5 foi determinante para as maiores quantidades de D1 e D2, adicionadas ao sêmen, visando produzir doses inseminantes padrão, com 200×10^6 espermatozoides móveis por mL de sêmen diluído.

A concentração espermática por dose inseminante não apresentou-se diferente ($p>0,05$) entre os reprodutores deste experimento, quando envasadas em FlatPacks, variando de $851,78 \pm 134,42$ a $1.069,22 \pm 134,42$ ($\times 10^6$) espermatozoides, entre os cinco reprodutores. Estes valores são superiores àqueles descritos

como mínimos para promover taxas de fertilidade satisfatórias, quando da utilização do sêmen congelado de garanhões, que corresponde a 600 milhões de espermatozoides com 30 a 35% de motilidade progressiva mínima, após o descongelamento (Samper, 2000). Além disso, as doses inseminantes, congeladas em palhetas de 0,55 mL, apresentaram concentrações variando de 85,18 a $106,92 \times 10^6$ espermatozoides/dose, em virtude de representar esta forma de envase 1/10 daquela inerente ao FlatPack (5 mL).

O intervalo médio de tempo da coleta do sêmen ao resfriamento foi maior para o jumento 5, em relação aos demais. Como explicado anteriormente, este intervalo foi o menor possível dentro do protocolo estabelecido para o processamento do sêmen. Há que se salientar, neste sentido, que o jumento 5 apresentou um maior volume de sêmen, em relação aos demais, demandando um maior tempo para mensuração deste volume e para realização da pré-diluição da amostra, antes de proceder-se ao resfriamento da mesma, que em conjunto resultaram em um maior tempo da coleta ao resfriamento. Já para os intervalos de tempo da coleta do sêmen à pré-diluição, à diluição final e ao congelamento, não observou-se diferenças ($p>0,05$) entre os jumentos.

O número potencial médio de doses inseminantes produzidas/ejaculado foi superior ($p<0,05$) para o jumento 5, quando comparado aos dos jumentos 1 e 4, embora não diferisse ($p>0,05$) do rendimento dos jumentos 2 e 3, que não diferiram ($p>0,05$) entre si, nem dos demais reprodutores avaliados (J1, J4 e J5). Já o número real médio de doses inseminantes produzidas/ejaculado foi superior para o jumento 5 ($p<0,05$), em comparação aos demais, que por sua vez, não diferiram entre si ($p>0,05$). No presente experimento, a concentração por dose inseminante utilizada foi pré-estabelecida, de forma que o número de doses produzidas por ejaculado variou entre os reprodutores, proporcionalmente às concentrações espermáticas totais e de móveis/ejaculado, apresentadas por cada um. Tal procedimento está de acordo com Xavier (2006), quando descreveu ser possível a determinação do número de éguas a serem inseminadas utilizando-se um único ejaculado a partir do conhecimento do número total de espermatozoides presentes neste ejaculado, da percentagem de espermatozoides móveis e do

número de espermatozoides necessários para cada dose inseminante.

4.2.2. Efeito do jumento sobre a motilidade e vigor espermáticos no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen

Observa-se no item 3.2.6.6. do Material e Métodos (Avaliação do sêmen após o descongelamento), que as avaliações do sêmen, após o descongelamento, foram realizadas, tanto no experimento I, como anteriormente mencionado, como no experimento II, por dois avaliadores em um sistema duplo cego. As avaliações envolveram os cinco jumentos, duas formas de envasamento do sêmen (FlatPacks ou palhetas), bem como os três períodos de avaliação do sêmen, após o descongelamento (0, 60 e 120 minutos), além dos seus efeitos sobre a motilidade e vigor espermáticos.

Como não houve diferenças entre os avaliadores, quando da avaliação da motilidade ($p>0,05$) e do vigor ($p>0,05$), os dados foram agrupados, de forma que esta fonte de variação foi excluída dos modelos e das análises estatísticas envolvendo as duas características espermáticas mencionadas (motilidade e vigor).

Os efeitos do jumento, do período de avaliação, bem como a interação jumento X momento de

avaliação, sobre a motilidade espermática, estão apresentadas na tabela 4.11.

Tabela 4.11. Análise dos fatores capazes de influenciar a motilidade espermática do sêmen de cinco jumentos, no transcorrer do processo de congelamento e após o descongelamento do sêmen

Fatores de variação	Valor de p*
Jumento	0,5580
Momento de avaliação	0,0001
Interação jumento X período de avaliação	0,1595

* $p<0,05$

Pode ser observado, no modelo acima, que apenas o momento de avaliação influenciou ($p<0,05$) a motilidade espermática, avaliada no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen. Vale salientar ainda, que o jumento não exerceu influência ($p>0,05$) sobre a motilidade espermática, nem houve interação ($p>0,05$) jumento X momento de avaliação.

Os dados referentes ao efeito do jumento e do momento de avaliação do sêmen, sobre a motilidade espermática, no decorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen, estão apresentados na tabela 4.12.

Tabela 4.12. Efeito do jumento e do período de avaliação do sêmen, sobre a motilidade espermática no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen

Jumento	Motilidade espermática no transcorrer do processo de congelamento/descongelamento			
	Sêmen Fresco	Pré-Diluído	Pós-Diluído	Pós-Descongelado
1	85,00±6,14	85,00±6,14	81,67±6,14	25,42±3,07
2	88,33±6,14	86,67±6,14	80,00±6,14	23,75±3,07
3	88,33±6,14	88,33±6,14	81,67±6,14	32,92±3,07
4	83,33±6,14	83,33±6,14	80,00±6,14	42,92±3,07
5	93,33±6,14	93,33±6,14	88,33±6,14	24,09±3,21
TOTAL	87,67±2,75 ^a	87,33±2,75 ^a	82,33±2,75 ^a	29,82±1,39 ^b

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ($p < 0,05$).

No presente experimento, observou-se que os valores de motilidade espermática foram similares ($p>0,05$) entre os cinco jumentos, durante todo o processo de congelamento do

sêmen (Tabela 4.12). Entretanto, o momento de avaliação influenciou ($p<0,05$) a motilidade, observando-se que os seus valores, após o descongelamento, apresentaram-se inferiores

($p < 0,05$) aos observados nos diferentes períodos avaliados, no transcorrer do processamento até o congelamento do sêmen (sêmen à fresco, pré-diluído e pós-diluído).

Os valores de motilidade para o sêmen a fresco, observados neste experimento, estão de acordo com os descritos como normais (70 a 100%), por diversos autores (Nishikawa, 1959; Kreuchauf, 1984; Henry *et al.*, 1987; Santos, 1994), embora tenham sido superiores aos observados por Canisso (2008) e Rossi (2008). Em relação ao experimento I, houve uma redução dos valores de motilidade espermática durante o processo de congelamento. Entretanto, observou-se no presente experimento (II), que os valores de motilidade espermática, pós-descongelamento foram superiores aos observados no experimento I. Infelizmente, análises estatísticas comparando os dois experimentos não puderam ser realizadas, por não se tratarem de experimentos contemporâneos.

Em um estudo conduzido por Kreuchauf (1984), o percentual médio de motilidade espermática, pós-descongelamento, obtido do sêmen asinino congelado, utilizando o diluidor preconizado por Nagase e Graham (1964), foi de 50%, sendo este superior ao maior percentual médio observado neste experimento, de $42,92 \pm 3,07\%$. Canisso (2008) observou uma motilidade total média, pós-descongelamento, de $37,32 \pm 5,91$ para o

sêmen de asininos, diluído em diluidor Nagase e Niwa (1964) modificado, sendo este valor superior aos apresentados pelos jumentos utilizados neste experimento, com exceção do jumento 4, que apresentou uma motilidade total média de $42,92 \pm 3,07$, pós-descongelamento.

Segundo Tischner (1979), os valores de motilidade espermática pós-descongelamento não dependem dos valores encontrados antes do processo de congelamento. Concordando com esta afirmação, observou-se que o jumento 4 deste experimento, apresentou o menor valor numérico médio, referente à motilidade, em todos os períodos de avaliação (à fresco, pré-diluído e pós-diluído), embora as diferenças entre os reprodutores não tenham diferido estatisticamente. Apesar disto, o sêmen do jumento 4 apresentou maior percentual de motilidade, pós- descongelamento ($42,92 \pm 3,07$) que, no entanto, não diferiu das dos demais jumentos estudados (Tabela 4.12).

Os dados de vigor espermático de cada reprodutor, nos diferentes momentos de avaliação, no transcorrer do congelamento e quando do descongelamento, compreendendo as avaliações realizadas logo após a coleta (sêmen a fresco), após a pré-diluição (pré-diluído), após a diluição final (pós-diluído) e após o descongelamento (pós-descongelado), encontram-se na tabela 4.13.

Tabela 4.13. Efeito do jumento e do momento de avaliação do sêmen sobre o vigor espermático no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen

Jumento	Vigor espermático no transcorrer do processo de congelamento/descongelamento			
	Sêmen Fresco	Pré-Diluído	Pós-Diluído	Pós-Descongelado
1	$4,00 \pm 0,46^{aA}$	$4,50 \pm 0,46^{aA}$	$4,33 \pm 0,46^{aA}$	$2,75 \pm 0,23^{bBC}$
2	$4,17 \pm 0,46^{aA}$	$4,50 \pm 0,46^{aA}$	$4,00 \pm 0,46^{aA}$	$2,21 \pm 0,23^{bC}$
3	$4,17 \pm 0,46^{aA}$	$4,33 \pm 0,46^{aA}$	$4,00 \pm 0,46^{aA}$	$3,04 \pm 0,23^{bB}$
4	$4,33 \pm 0,46^{abA}$	$4,67 \pm 0,46^{aA}$	$4,17 \pm 0,46^{abA}$	$4,00 \pm 0,23^{bA}$
5	$4,67 \pm 0,46^{aA}$	$4,67 \pm 0,46^{aA}$	$4,00 \pm 0,46^{aA}$	$2,64 \pm 0,24^{bBC}$
TOTAL	$4,27 \pm 0,21$	$4,53 \pm 0,21$	$4,10 \pm 0,21$	$2,93 \pm 0,10$

^{a, b, c} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ($p < 0,05$).

^{A, B, C} Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

Observou-se que os valores de vigor espermático não diferiram ($p > 0,05$) entre os reprodutores, do presente experimento, durante todo o processo de congelamento do sêmen (sêmen fresco, sêmen diluído e pós-diluído). Entretanto, com exceção

do jumento 4, os demais reprodutores apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) do vigor espermático quando da avaliação, após o descongelamento do sêmen. Por outro lado, o jumento 4 apresentou valores similares ($p > 0,05$)

durante o transcorrer de todo o processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen avaliado, com exceção do vigor observado no momento pré-diluído, que diferiu ($p < 0,05$) dos valores observados após o descongelamento ($4,67 \pm 0,46$ X $4,00 \pm 0,23$).

Quando da avaliação de vigor, após o descongelamento, observou-se que o jumento 4 apresentou o maior valor ($p < 0,05$) para a característica, em relação aos demais (J1, J2, J3 e J5). Entretanto, os valores de vigor apresentados pelos jumentos 1, 3 e 5, foram similares ($p > 0,05$). O menor valor foi apresentado pelo jumento 2, que diferiu ($p < 0,05$) dos jumentos 3 e 4. Finalmente, os valores dos jumentos 1, 2 e 5 não diferiram ($p > 0,05$) entre si (Tabela 4.13).

Os valores de vigor espermático do sêmen a fresco também encontraram-se dentro dos padrões descritos como normais para jumentos (Henry *et al.*, 1987; Arruda *et al.*, 1989; Canisso, 2008), porém foram inferiores aos observados por Rossi (2008). Entretanto, no que se refere ao vigor espermático avaliado após descongelamento do sêmen, apenas os jumentos 3 e 4 apresentaram valores satisfatórios de acordo com a literatura (Muller, 1987; Pickett *et al.*, 1987).

Ao se comparar, numericamente, os resultados de motilidade e de vigor espermáticos entre os dois experimentos *in vitro*, realizados na presente dissertação, observou-se uma superioridade do experimento II em relação ao I, quanto aos resultados obtidos após o descongelamento. No que se refere ao delineamento experimental, observou-se que a curva de resfriamento do sêmen diferiu entre eles, sendo esta mais lenta no experimento II. De acordo com Snoeck *et al.* (2001), a velocidade de resfriamento do sêmen é um dos pontos críticos para o sucesso da técnica de congelamento, uma vez que o resfriamento realizado de maneira inadequada provocará danos irreversíveis aos espermatozoides.

As células espermáticas, quando expostas à baixas temperaturas, são susceptíveis à ocorrência de lesões celulares diretas, as quais

dependem da taxa de resfriamento utilizada. Tem sido descrito que o resfriamento mais rápido responde pelos maiores danos às células espermáticas, em comparação ao mais lento (Silva Filho *et al.*, 1994). Dentro deste contexto, os melhores resultados obtidos, no presente trabalho, apontam para a utilização de uma curva mais lenta de resfriamento, antes de proceder-se ao processo de congelamento do sêmen. Infelizmente, comparações mais sólidas entre os dois experimentos, envolvendo análises estatísticas, não puderam ser realizadas, por não se tratarem de experimentos contemporâneos.

4.2.3. Efeito do jumento e do tipo de envasamento sobre a motilidade e vigor espermáticos, avaliados em diferentes períodos após o descongelamento do sêmen (0, 60 e 120 minutos)

Pode ser observado no item 3.2.6.6. do Material e Métodos (Avaliação do sêmen após o descongelamento), que as avaliações do sêmen, após o descongelamento, foram realizadas, tanto no experimento I, como anteriormente mencionado, como no experimento II, por dois avaliadores em um sistema duplo cego. As avaliações envolveram os cinco jumentos, as duas formas de envasamento do sêmen (FlatPacks ou palhetas), bem como os três períodos de avaliação do sêmen, após o descongelamento (0, 60 e 120 minutos), além dos seus efeitos sobre a motilidade e vigor espermáticos.

Como não houve diferenças entre os avaliadores, quando da avaliação da motilidade ($p > 0,05$) e do vigor ($p > 0,05$), os dados foram agrupados, de forma que esta fonte de variação foi excluída dos modelos e das análises estatísticas envolvendo as duas características espermáticas mencionadas (motilidade e vigor).

Os efeitos do jumento, do tipo de envasamento e do tempo de avaliação, bem como de suas interações sobre a motilidade espermática, estão apresentadas na tabela 4.14.

Tabela 4.14. Análise dos fatores capazes de influenciar a motilidade espermática do sêmen de cinco jumentos, submetidos à duas formas de envasamento e avaliado em diferentes momentos, após o descongelamento

Fatores de variação	Valor de p
Jumento	0,1312
Tipo de envasamento	0,0001
Tempo de avaliação	0,0001
Jumento X tipo de envasamento	0,8933
Tipo de envasamento X tempo de avaliação	0,3929
Jumento X tipo de envasamento X tempo de avaliação	0,0194

No modelo acima, pode ser observado que a motilidade espermática foi influenciada ($p < 0,05$) pelo tipo de envasamento do sêmen, bem como pelo tempo de avaliação, observando-se também uma interação tripla envolvendo o jumento, o tipo de envasamento e o tempo de avaliação.

Na tabela 4.15 estão apresentados os efeitos do jumento e do tipo de envasamento sobre a motilidade espermática avaliada em diferentes períodos após o descongelamento. Observou-se, nesta tabela, que as amostras de sêmen do jumento 4, quando avaliadas no tempo zero, apresentaram resultados similares ($p > 0,05$) entre as palhetas e os FlatPacks, para a motilidade espermática, que no entanto, diferiram ($p < 0,05$) dos valores observados para os FlatPacks, quando as células completaram 120 minutos de estocagem à 37°C, após o descongelamento. Além disso, vale salientar que os valores de motilidade observados para as duas formas de envasamento no tempo de 60 minutos após o descongelamento e para as palhetas, aos 120 minutos após o descongelamento, foram similares ($p > 0,05$) entre si e não diferiram dos demais ($p > 0,05$).

Na tabela 4.16 observa-se a influência do jumento e do tipo de envasamento sobre o vigor espermático avaliado nos períodos de 0, 60 e 120 minutos após o descongelamento do sêmen.

Tabela 4.15. Efeito do jumento e do tipo de envasamento sobre a motilidade espermática avaliada em diferentes períodos após o descongelamento do sêmen

Jumento	Períodos após o descongelamento (minutos)					
	0		60		120	
	FlatPack	Palheta	FlatPack	Palheta	FlatPack	Palheta
1	19,17±4,29 ^a	31,67±4,29 ^a	12,50±7,43 ^a	26,25±5,25 ^a	15,00±7,43 ^a	21,25±5,25 ^a
2	19,17±4,29 ^a	28,33±4,29 ^a	15,00±7,43 ^a	30,00±5,25 ^a	12,50±7,43 ^a	18,75±5,25 ^a
3	30,83±4,29 ^a	35,00±4,29 ^a	13,13±5,25 ^a	20,00±4,29 ^a	7,50±5,25 ^a	17,50±4,29 ^a
4	39,17±4,29 ^a	46,67±4,29 ^a	17,50±5,25 ^{ab}	21,67±4,29 ^{ab}	3,75±5,25 ^b	12,50±4,29 ^{ab}
5	17,00±4,29 ^a	30,00±4,29 ^a	5,00±7,43 ^a	23,75±5,25 ^a	5,00±7,43 ^a	7,50±5,25 ^a
TOTAL	24,67±1,95	35,34±1,98	13,39±2,85	25,83±2,18	7,86±2,85	13,33±2,18

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 4.16. Efeito do jumento e do tipo de envasamento sobre o vigor espermático avaliado à diferentes períodos após o descongelamento do sêmen

Jumento	Períodos após o descongelamento (minutos)					
	0		60		120	
	FlatPack	Palheta	FlatPack	Palheta	FlatPack	Palheta
1	2,00±0,34 ^{abB}	3,50±0,34 ^{abB}	1,50±0,58 ^{abA}	2,50±0,41 ^{baA}	2,00±0,58 ^{abA}	2,50±0,41 ^{baA}
2	1,75±0,34 ^{abB}	2,67±0,34 ^{abC}	2,00±0,58 ^{abA}	2,50±0,41 ^{baA}	1,25±0,58 ^{abA}	1,50±0,41 ^{baA}
3	2,83±0,34 ^{abB}	3,25±0,34 ^{abBC}	1,63±0,41 ^{cdA}	2,00±0,34 ^{abcdA}	1,25±0,41 ^{daA}	2,25±0,34 ^{bcA}
4	3,67±0,34 ^{baA}	4,33±0,34 ^{baA}	1,63±0,41 ^{caA}	2,33±0,34 ^{caA}	0,50±0,41 ^{caA}	1,83±0,34 ^{caA}
5	2,60±0,37 ^{abB}	2,67±0,34 ^{abBC}	1,00±0,58 ^{abA}	2,13±0,41 ^{abA}	1,00±0,58 ^{abA}	1,13±0,41 ^{baA}
TOTAL	2,55±0,16	3,33±0,16	1,57±0,23	2,48±0,18	1,11±0,23	1,67±0,18

^{a,b,c} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ($p < 0,05$).

^{A, B, C} Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

Pode ser observado na tabela 4.16 que o vigor espermático foi influenciado ($p < 0,05$) pelos jumentos apenas no tempo zero e envolveu os dois sistemas de envasamento do sêmen. No que se refere às células espermáticas envasadas em FlatPacks, observou-se que o jumento 4 apresentou o maior vigor, que diferiu ($p < 0,05$) dos demais jumentos (J1, J2, J3 e J5). Dentro do mesmo tempo e para a forma de envasamento em palhetas, observou-se que também o jumento 4 apresentou o mesmo comportamento anterior, quando diferiu ($p < 0,05$) de todos os outros jumentos, para a mesma característica seminal avaliada. Verificou-se também que os jumentos 1, 3 e 5 apresentaram resultados de vigor similares ($p > 0,05$) entre si. Os resultados do jumento 2 diferiram ($p < 0,05$) dos do jumento 1, embora tenham sido similares ($p > 0,05$) aos dos jumentos 3 e 5.

No tempo zero após o descongelamento não houve influência ($p > 0,05$) do tipo de envasamento sobre o vigor espermático, para os jumentos 2, 3 e 5. Entretanto, observou-se uma superioridade ($p < 0,05$) da palheta em relação ao FlatPack no sêmen dos jumentos 1 e 4. Aos 60 minutos após o descongelamento não observou-se efeito do jumento nem do tipo de envasamento ($p > 0,05$), sobre o vigor espermático. O mesmo pode ser dito, quando da avaliação do sêmen, após 120 minutos do descongelamento, com exceção do jumento 3, quando os valores de vigor, inerentes às palhetas, superaram ($p < 0,05$) os obtidos pelas células espermáticas congeladas em FlatPacks.

Considerando-se como satisfatórias as partidas de sêmen apresentando um mínimo de 30% de motilidade e vigor ≥ 3 (Muller, 1987; Pickett *et al.*, 1987), observou-se que as amostras envasadas em palhetas de 0,55 mL mantiveram uma melhor viabilidade espermática. Assim, ao analisar os valores de motilidade e vigor espermáticos das amostras envasadas neste sistema, no momento do descongelamento do sêmen, observou-se que apenas um dos cinco reprodutores não apresentou valores de motilidade espermática satisfatórios, enquanto dois dos cinco não apresentaram valores de vigor espermático aceitáveis. Já no experimento I, apenas o reprodutor 4 obteve resultados satisfatórios para estas características quando da avaliação realizada logo após o descongelamento do sêmen, independentemente do método de

envase utilizado. No que diz respeito ao FlatPack, apenas dois dos cinco jumentos apresentaram valores de motilidade acima de 30%, enquanto no que se refere ao vigor, apenas um de cinco jumentos apresentou resultados de vigor ≥ 3 .

Quando observadas após 60 e 120 minutos do descongelamento, todas as amostras apresentaram valores de motilidade e de vigor inferiores a 30% e 3, respectivamente, com exceção do jumento 2 que apresentou, quando da avaliação aos 60 minutos, após o descongelamento, motilidade de $30,00 \pm 5,25$ para a palheta.

Os resultados obtidos, no presente experimento, discordam dos descritos por Silva *et al.* (1997), quando observaram valores similares de motilidade e vigor espermáticos, após a realização do TTR, para as amostras de sêmen asinino envasadas em macrotubo (4 mL) ou em tubos de alumínio (10 mL). Samper *et al.* (1994) observaram taxas de gestação similares, ao utilizarem palhetas (64,3%) e macrotubos (59,8%) para o congelamento do sêmen de garanhões. Da mesma forma, Oliveira (2005), ao comparar dois tipos de envase para o congelamento de sêmen asinino (macrotubo de 2,5 mL e palhetas de 0,55 mL), também não observou diferença estatística entre eles. Saravia (2008) trabalhou com sêmen congelado de suínos e observou que o sistema de envasamento não influenciou a motilidade espermática. Entretanto, a integridade da membrana plasmática foi superior no sêmen envasado em FlatPack de 5mL (54%) e de 0,7 mL (49%), quando comparados à palhetas de 0,55 mL (38%).

Diferentemente dos estudos mencionados anteriormente, vários autores trabalharam com sêmen congelado de equinos e observaram diferenças estatísticas entre alguns tipos de envase. Neste sentido, Papa *et al.* (1991) observaram que a motilidade espermática das amostras de sêmen envasadas em palhetas foi superior às acondicionadas em macrotubos, correspondendo a 36% e 26%, respectivamente, após a realização do TTR. Heitland *et al.* (1996) também descreveram melhores resultados pós-descongelamento para o sêmen envasado em palhetas (menores volumes) em comparação aos macrotubos (maiores volumes). Ainda, Dell'Aqua Júnior (2000) observou melhores

resultados ($p < 0,05$) de motilidade e de vigor espermáticos, pós-descongelamento, nas amostras de sêmen envasadas em palhetas de 0,55 mL ou mini palhetas de 0,25 mL, quando comparadas àquelas envasadas em macrotubos de 4 mL.

O protocolo de congelamento utilizado no experimento II respondeu por uma melhor viabilidade espermática, em relação ao experimento I, podendo esta ser atribuída à curva de resfriamento lenta, pré-congelamento utilizada, uma vez que os reprodutores e os métodos de envase empregados foram comuns aos dois experimentos.

Os melhores resultados associados às palhetas, quanto à manutenção da viabilidade espermática, reforça o seu papel, como a forma de envasamento mais empregada para o congelamento do sêmen de asininos (Vieira *et al.*, 1985; Arruda *et al.*, 1986; Trimeche *et al.*, 1996; Trimeche *et al.*, 1997; Papa *et al.*, 1999).

4.2.4. Efeito do jumento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento

Os dados referentes ao efeito do jumento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento estão apresentados na tabela 4.17.

Tabela 4.17. Efeito do jumento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento, considerando-se a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3) isoladamente ou quando agrupados (motilidade $\geq 30\%$ e vigor ≥ 3)

Jumento	Motilidade $\geq 30\%$	Vigor ≥ 3	Motilidade $\geq 30\%$ Vigor ≥ 3
1	8/12 (66,67%)	9/12(75,00%)	8/12(66,67%)
2	6/12(50,00%)	6/12(50,00%)	6/12(50,00%)
3	11/12(91,67%)	10/12(83,33%)	10/12(83,33%)
4	12/12(100,00%)	12/12(100,00%)	12/12(100,00%)
5	6/11(54,55%)	7/11(63,64%)	6/11(54,55%)
TOTAL	43/59(72,88%)	44/59(74,58%)	42/59(71,19%)

No presente experimento, considerou-se como aprovados somente aqueles ejaculados que apresentaram uma motilidade espermática mínima de 30% e um vigor ≥ 3 , após o descongelamento do sêmen. Tal procedimento está de acordo com o descrito por Muller (1987) e Pickett *et al.* (1987). Embora tenha havido efeito do jumento ($p < 0,05$) sobre o percentual de ejaculados aprovados, não foi possível hierarquizá-los. Entretanto, observou-se que 71,19% (42/59) dos ejaculados avaliados no presente experimento foram considerados aprovados (Tabela 4.17), contra apenas 25,49% (13/51) aprovados no experimento I. Ao analisar-se cada reprodutor separadamente, observou-se uma taxa de aproveitamento de ejaculados variando de 50 à 100%, sendo este resultado muito superior ao encontrado no experimento I, quando observou-se uma variação de 0 a 83,33%. Já Pickett *et al.* (1987) observaram uma variação de 33 a 76% de aproveitamento dos ejaculados analisados, ao realizarem uma metanálise sobre o tema, envolvendo um

conjunto de dados da Universidade do Colorado - USA.

Os melhores resultados observados no experimento II, quando comparados aos do experimento I, quanto ao número de ejaculados aprovados, deveu-se, provavelmente, à curva de resfriamento do sêmen utilizada, pré-congelamento. Deve-se enfatizar que no experimento II utilizou-se os mesmos reprodutores, os mesmos tipos de envasamento e o mesmo protocolo do experimento I, porém utilizando uma curva de resfriamento mais lenta. Sendo assim, tais circunstâncias permitem apontar para esta variável, como provável responsável pelos melhores resultados alcançados. Tem sido enfatizado pela literatura que o resfriamento do sêmen, quando realizado de maneira inadequada, pode provocar danos irreversíveis aos espermatozoides. Sendo assim, a velocidade de resfriamento é considerada como um dos pontos críticos, quando do congelamento do sêmen (Snoeck *et al.*, 2001). Como no

experimento II utilizou-se uma curva mais lenta para o resfriamento do sêmen, evitou-se, provavelmente, a ocorrência de maiores danos às células espermáticas, já que estes são observados, com maior frequência, na presença de curvas de resfriamento mais rápidas (Silva Filho *et al.*, 1994).

Vale ressaltar que neste experimento, similarmente ao que aconteceu no experimento I, não realizou-se seleção dos reprodutores, nem

dos ejaculados de um mesmo reprodutor, para o congelamento.

4.2.5. Efeito do sistema de envasamento do sêmen sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento

Os dados referentes ao efeito do sistema de envasamento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento do sêmen, estão apresentados na tabela 4.18.

Tabela 4.18. Efeito do sistema de envasamento sobre o percentual de ejaculados aprovados após o descongelamento, considerando-se a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3) isoladamente ou quando agrupados (motilidade $\geq 30\%$ e vigor ≥ 3)

Sistema de Envasamento	Motilidade $\geq 30\%$	Vigor ≥ 3	Motilidade $\geq 30\%$ Vigor ≥ 3
FlatPack	18/30 (60,00%) ^B	18/30(60,00%) ^B	17/30(56,67%) ^B
Palheta	25/29(86,21%) ^A	26/29(89,66%) ^A	25/29(86,21%) ^A
TOTAL	43/59(72,88%)	44/59(74,58%)	42/59(71,19%)

^{A,B} Números seguidos por letras diferentes na coluna, diferem entre si ($p>0,05$)

Como pode ser observado na tabela 4.18, houve influência ($p<0,05$) do sistema de envasamento sobre o percentual de ejaculados aproveitados, sendo os melhores resultados obtidos quando do envase em palhetas de 0,55 mL, em comparação aos observados quando da utilização dos FlatPacks (86,21 vs 56,67, respectivamente – $p<0,05$). Tais resultados estão de acordo com os apresentados por Papa *et al.* (1991), Heitland *et al.* (1996) e Dell'Aqua Júnior (2000), que também observaram os melhores resultados após o descongelamento do sêmen, associado à utilização das palhetas. Entretanto, discordam dos resultados descritos por Samper *et al.* (1994), Silva *et al.* (1997) e Oliveira (2005), quando não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes métodos de envasamento avaliados.

Há que se enfatizar, ainda, a superioridade evidente dos resultados obtidos no experimento II, no que se refere ao percentual total de ejaculados aprovados, de 71,19%, contra apenas 25,49% no experimento I. Tal superioridade está relacionada, provavelmente, à utilização de uma

curva de resfriamento lenta, capaz de reduzir a ocorrência de maiores danos às células espermáticas, uma vez serem eles observados com maior frequência, quando da utilização de curvas de resfriamento mais rápidas (Silva Filho *et al.*, 1994).

4.3. Experimento III: Sincronização, indução da ovulação, local de deposição do sêmen no sistema genital e taxa de gestação de fêmeas equinas inseminadas com sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks e congelado.

4.3.1. Distribuição das éguas segundo o edema uterino no momento da aplicação da hCG

Os dados referentes à distribuição das éguas de acordo com o grau de edema uterino apresentado por elas, no momento da administração da hCG como agente indutor da ovulação, estão apresentados na tabela 4.19.

Tabela 4.19. Distribuição das éguas segundo o escore de edema uterino, quando da aplicação da hCG

Local de deposição do sêmen	Classificação das éguas por edema uterino (escore 1 - 3)		
	1	2	3
Corpo do útero	1 (5,56%)	2 (11,11%)	4 (22,22%)
Ápice do corno uterino	0	5 (27,78%)	6 (33,33%)
TOTAL	1 (5,56%)	7 (38,89%)	10 (55,56%)

No presente experimento, utilizou-se uma classificação subjetiva (1-3) para o edema uterino intramural apresentado pelas éguas, onde o grau 1 correspondeu à presença de discreto edema uterino intramural e o grau 3, ao edema uterino intramural máximo.

De acordo com Samper (1997), a indução da ovulação pela hCG, na presença de alto grau de edema uterino, associado a um folículo entre 35 e 40 mm de diâmetro, resulta em 95% de eficácia nos dois primeiros ciclos. Segundo Palmer (1993), a presença de um folículo com essas dimensões em um dos ovários, indica total responsividade do mesmo à ação do LH. Além disso, os graus de edema endometrial refletem a concentração circulante de estrógeno (Hayes *et al.*, 1985) que, por sua vez, tem a capacidade de aumentar o número de receptores ovarianos para LH. Como a hCG exerce função de LH, no momento em que observa-se um maior grau de edema uterino, estima-se uma alta concentração estrogênica circulante e, consequentemente, alta responsividade à ação da hCG. Desta forma,

buscou-se administrar o agente indutor da ovulação no momento em que as éguas apresentavam maior grau de edema uterino, evitando-se assim a ocorrência de falhas na ovulação.

4.3.2. Distribuição dos jumentos por local de deposição do sêmen no sistema genital das éguas

Na tabela 4.20 estão apresentados os dados envolvendo a distribuição dos jumentos por local de deposição do sêmen no sistema genital das éguas utilizadas no presente experimento.

Buscou-se a maior uniformidade possível quando da distribuição dos jumentos por tratamento (local de deposição do sêmen), procurando-se respeitar, entretanto, os acasalamentos pré-estabelecidos pelo proprietário dos animais, a partir da avaliação da conformação e andamento dos produtos oriundos destes acasalamentos, em estações reprodutivas anteriores.

Tabela 4.20. Distribuição dos jumentos por local de deposição do sêmen no sistema genital das éguas

Local de deposição do sêmen	Jumentos					Total
	1	2	3	4	5	
Corpo do útero	1	1	3	1	1	7
Ápice do corno uterino	1	1	5	2	2	11
TOTAL	2	2	8	3	3	18

Observou-se que o jumento mais utilizado para as inseminações artificiais (J3) não apresentou os melhores resultados de motilidade e vigor espermáticos, após o descongelamento do sêmen, (Tabela 4.20), como pode ser observado nos experimentos I e II, mas sim o jumento 4, utilizado para inseminar apenas três fêmeas.

4.3.3. Distribuição das ovulações das éguas submetidas à aplicação da hCG

No presente experimento, a grande maioria das éguas (15/18) ovularam no intervalo entre 30 e 42 horas da administração da hCG, sendo que

das outras três, uma (5,56%) ovulou até 24 horas após a aplicação da hCG, outra (5,56%) no intervalo entre 24 e 30 horas e a última (5,56%), no intervalo entre 42 e 48 horas da indução da ovulação, observando-se uma distribuição uniforme das mesmas ($p>0,05$), entre os tratamentos.

De acordo com Samper (1997) a indução da ovulação com hCG, na presença de grande edema uterino e de um folículo entre 35 a 40 mm de diâmetro, apresenta 95% de eficácia nos dois primeiros ciclos, ocorrendo dentro de uma amplitude de 36 a 48 horas, na maioria das

éguas. Barbacini *et al.* (2000) descreveu que a administração da hCG foi capaz de induzir a ovulação dentro de 48 horas, em 80% das éguas. Entretanto, ele ressalta que a distribuição das ovulações pode variar de 0 a mais de 72h. No presente experimento, 100% das éguas induzidas apresentaram ovulação dentro do período esperado (até 48 horas após a indução).

Uma única dose de hCG tem sido utilizada para induzir a ovulação. Aparentemente, não existe uma dose padrão a ser utilizada, que tem variado, desta forma, entre 1000 UI a 6000 UI ou mais, sendo que na maioria das vezes, utiliza-se doses entre 2000 a 3000 UI (Bergfelt, 2000). Neste sentido, Samper *et al.* (2002) utilizaram uma dose de 2500 UI de hCG, quando observaram um intervalo da indução à ovulação de 28 a 96 horas. Em um trabalho realizado por Rozas (2005), 64,70% das jumentas ovularam entre 36 e 48 horas após a administração de 5000 UI de hCG por via endovenosa, sendo que 70,58% ovularam dentro de 72h da sua administração. Ao administrarem 5000 UI de hCG, na presença de um folículo de 36 mm de diâmetro, em um dos ovários, Castejón (2005) verificou que em 18 ciclos reprodutivos utilizados de seis jumentas, todas as ovulações ocorreram dentro de 36 a 48 horas após a sua indução. No presente trabalho, visando-se a redução dos custos de indução, sem prejuízo da sua eficiência, utilizou-se uma dose de aproximadamente 1.666 UI de hCG, ou seja,

cada ampola de 5.000UI foi dividida igualmente e utilizada em três éguas, suficiente para induzir a ovulação, em 100% dos casos, dentro de 48 horas da sua aplicação.

Segundo Duchamp *et al.* (1987), apesar de muito utilizada como agente indutor da ovulação, a hCG induz a formação de anticorpos após aplicações sucessivas. Roser *et al.* (1979) demonstraram que a formação de anticorpos inicia-se após duas a cinco injeções de hCG, embora não tenham descrito a ocorrência de refratariedade, em virtude das altas taxas de anticorpos. Tal observação discorda dos resultados apresentados por Sullivan *et al.* (1973), os quais observaram uma refratariedade das éguas, após a terceira administração da hCG. Entretanto, Barbacini *et al.* (2000) não observaram uma redução da resposta ovulatória, após repetidas aplicações de hCG. Já McCue *et al.* (2004) também descreveram que repetidas doses da hCG, durante a estação de monta, respondeu por uma menor eficácia da droga para a indução da ovulação, sugerindo que a mesma deva ser utilizada, no máximo, duas vezes por estação. No presente experimento, foram utilizados até dois ciclos reprodutivos de algumas éguas, não observando-se refratariedade das mesmas, pois todas ovularam dentro de 48 horas da aplicação da hCG, como pode ser observado na tabela 4.21.

Tabela 4.21. Distribuição das ovulações de éguas submetidas à aplicação da hCG, quando apresentavam um folículo com $3,76 \pm 0,21$ e $3,61 \pm 0,05$ cm de diâmetro em um dos ovários para os tratamentos I e II, respectivamente

Local de deposição do sêmen	Dias da aplicação da hCG ^a						
	Primeiro dia		Segundo dia			Terceiro dia	
	13:00	19:00	07:00	13:00	19:00 ^b	07:00 ^c	13:00 19:00
Corpo do útero	-	-	-	-	1/7 (14,29%)	5/7 (71,43%)	1/7 (14,29%)
Ápice do corno uterino	-	-	-	1/11 (9,09%) ^d	-	10/11 (90,91%)	-
TOTAL	-	-	-	1/18 (5,56%)	1/18 (5,56%)	15/18 (83,33%)	1/18 (5,56%)

^a Aplicação de 1.666 UI de hCG

^b Realização da primeira inseminação artificial

^c Realização da segunda inseminação artificial

^d A égua pode ter ovulado dentro das 24 horas após a aplicação da hCG, em virtude da primeira palpação ter sido realizada apenas 24 horas após a sua administração.

4.3.4. Taxa de gestação de éguas inseminadas com sêmen congelado em FlatPacks de jumentos da raça Pêga, depositado no corpo ou no ápice do corno uterino

Os dados referentes à taxa de gestação de éguas inseminadas com sêmen congelado em FlatPacks de jumentos da raça Pêga, depositado no corpo ou no ápice do corno uterino, estão descritos na tabela 4.22.

Observou-se que as taxas de gestação das éguas, independentemente do local de deposição do sêmen, foram zero.

A idade das éguas utilizadas variou entre 10,64±0,84 e 11,27±0,95 anos e não diferiu ($p>0,05$) entre os tratamentos. Têm sido observados resultados de fertilidade satisfatórios em éguas com idade entre 2 e 13 anos, havendo uma redução progressiva dos mesmos, a partir

dos 14 anos (Woods *et al.*, 1987). Além disso, tem sido observado que a atividade ovariana tende a decrescer a partir dos 15 anos de idade (Wesson e Ginther, 1981), faixa etária na qual se encontram apenas três das 16 éguas utilizadas no presente experimento, que apresentavam idade superior a 14 anos.

Em éguas utilizadas para a produção de muare, Jordão *et al.* (1954) observaram que aquelas com idade entre 9 e 11 anos responderam pelas maiores taxas de fertilidade, quando comparadas às com idade entre 21 e 23 anos.

Em trabalho realizado por Woods *et al.* (1987), observou-se uma taxa de gestação de 55% para as éguas com 6 a 9 anos de idade; de 60% para aquelas entre 10 e 13 anos; de 51% para aquelas entre 14 e 17 anos de idade; de 45% dos 18 aos 21 anos de idade e de 33% para aquelas éguas com idade superior a 21 anos.

Tabela 4.22. Taxa de gestação de éguas inseminadas com sêmen congelado em FlatPacks de jumentos da raça Pêga, depositado no corpo ou no ápice do corno uterino

Parâmetros avaliados	Local de deposição do sêmen	
	Corpo do útero	Ápice do corno uterino
Número de Ciclos	7	11
Idade das éguas (anos)	10,64±0,84	11,27±0,95
Tamanho do folículo quando da aplicação da hCG (cm)	3,76±0,21	3,61±0,05
Intervalo da aplicação da hCG à 1ª IA (horas)	30,17±0,13	29,60±0,51
Intervalo da aplicação da hCG à 2ª IA (horas)	42,28±0,15	42,20±0,09
Intervalo da aplicação da hCG à ovulação (horas)	40,90±2,26	40,36±1,64
Número de jumentos utilizados	5	5
Espermatozoides móveis/dose inseminante ($\times 10^6$) – 1ª IA	2009,20±84,34 ^a	960,21±51,85 ^b
Espermatozoides móveis/dose inseminante ($\times 10^6$) – 2ª IA	2035,08±106,38 ^a	1012,01±29,26 ^b
Intervalo entre as duas últimas palpações (horas)	10,05±1,28	13,09±1,09
Taxa de Gestação	0,00 (0/7)	0,00 (0/11)

^{a, b} Médias seguidas por letras diferentes na linha, diferem ($p<0,05$)

Ao avaliarem o efeito da idade sobre a fertilidade de éguas, Valle *et al.* (1999) observaram uma queda da fertilidade relacionada ao aumento da idade, representada pela redução da taxa de gestação/ciclo. Assim, na avaliação de 147 ciclos estrais de 99 éguas, divididas em grupos de 3 a 6

anos; 7 a 10 anos; 11 a 14 anos e 15 a 19 anos, observaram percentuais de gestação/ciclo de 62,07%; 63,64%; 52,50% e 29,41%, respectivamente. Morris e Allen (2002) também observaram um maior nascimento de potros (86,6%) advindos de éguas entre 3 a 8 anos de

idade, em relação às de 14 a 18 anos. Entretanto, McDowell *et al.* (1992) trabalhando com éguas Puro Sangue Inglês, com idade variando entre um e 30 anos, durante duas estações de monta consecutivas, observaram que a percentagem de potros nascidos foi maior no grupo de éguas com idade entre 3 e 10 anos, havendo uma queda progressiva da eficiência reprodutiva a partir daí.

A indução da ovulação, no presente trabalho, foi realizada somente na presença de um folículo com no mínimo 34 mm de diâmetro e de edema uterino intramural. Desta forma, 100% das éguas induzidas ovularam dentro do período esperado, resultados superiores aos descritos por Samper (1997) e Barbacini *et al.* (2000).

Ovulação 24h após hCG	• 1/18(5,56%) • IA Pós-ovulação (Menos de 24 horas pós-ovulação – 1ª palpação às 24 após hCG)
Ovulação 30h após hCG	• 1/18(5,56%) • IA Pós-ovulação (Até 6 h pós-ovulação)
Ovulação 42h após hCG	• 15/18(83,33%) • IA Pré-ovulação (Até 12h pré-ovulação) • IA Pós-ovulação (Menos de 12h pós-ovulação)
Ovulação 48h após hCG	• 1/18(5,56%) • IA Pré-ovulação (Até 18 h pré-ovulação) • IA Pré-ovulação (Até 06 h pré-ovulação)

No presente experimento, empregou-se um protocolo de inseminações artificiais em tempo fixo, de acordo com o proposto por Squires *et al.* (2003) e Barbacini *et al.* (2005), visando-se diminuir os custos e simplificar o manejo reprodutivo das éguas inseminadas com sêmen congelado. Assim, as primeiras inseminações foram realizadas em média, $30,17 \pm 0,13$ e $29,60 \pm 0,51$ horas após a administração da hCG, para os tratamentos 1 e 2, respectivamente. Já a segunda inseminação ocorreu em média, às $42,28 \pm 0,15$ horas da aplicação da hCG no tratamento 1 e às $42,20 \pm 0,09$ horas no tratamento 2. Desta forma, os intervalos de tempo médios das inseminações à ovulação ocorreram dentro do considerado ideal por diversos autores, compreendendo o intervalo de 12 horas antes até 6 horas após a ovulação (Kloppe *et al.*, 1988;

Barbacini *et al.*, 1999). Squires *et al.* (1999) recomendaram que a inseminação devia ser realizada de zero a 24 horas antes da ovulação ou até seis horas após a sua ocorrência, uma vez que o sêmen congelado equino apresenta uma menor habilidade para interagir com as células da tuba uterina da fêmea, mantendo-se viável por menos tempo. Já Barbacini (2009), recomendou que o protocolo deveria compreender o intervalo de 12 horas pré-ovulação até seis horas após a ovulação, uma vez que as inseminações de éguas com sêmen congelado, realizadas com mais de seis horas da ovulação, também apresentaram taxas de gestação inadequadas.

Diante das propostas apresentadas pela literatura, pretendia-se que as inseminações artificiais nos dois tratamentos do presente experimento,

fossem realizadas em momentos adequados, de forma a não constituir uma fonte de variação inoportuna.

Neste experimento, as doses inseminantes para a primeira e segunda inseminações, realizadas no corpo do útero, envolveram concentrações de $2009,20 \pm 84,34$ e $2035,08 \pm 106,38 \times 10^6$ espermatozoides móveis, respectivamente. Já para as inseminações realizadas no ápice do corno uterino, utilizou-se doses inseminantes apresentando $960,21 \pm 51,85$ e $1012,01 \pm 29,26 \times 10^6$ espermatozoides móveis na primeira e segunda inseminações, respectivamente. Há que se considerar que estes números de espermatozoides móveis se referem aos dados pré-congelamento. Considerando-se que as doses utilizadas apresentavam, após o descongelamento, no mínimo 30% de motilidade com vigor ≥ 3 , verifica-se que as depositadas no corpo do útero, apresentavam, no mínimo 600×10^6 de espermatozoides móveis por dose inseminante, enquanto as depositadas no ápice do corno apresentavam um mínimo de 300×10^6 espermatozoides móveis por dose inseminante.

O número de espermatozoides padrão por dose inseminante não foi estabelecido para o sêmen congelado de asininos. Entretanto, os critérios mínimos requeridos para obter-se taxas de fertilidade satisfatórias quando do uso do sêmen congelado de garanhões, tem sido de 600 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva mínima de 30 a 35%, após o descongelamento (Samper, 2000). Papa *et al.* (1989) obtiveram taxas de gestação superiores ao utilizarem concentrações de 200 ou 400×10^6 espermatozoides por dose inseminante, em relação ao que obteve-se com doses apresentando 100×10^6 espermatozoides. Dell'Aqua Júnior (2000), utilizando doses inseminantes de 50, 100, 300 e 800×10^6 , não observou diferenças significativas quanto às taxas de gestação obtidas em éguas. Entretanto, Samper (1995), avaliando os fatores capazes de influenciar a fertilidade do sêmen congelado equino, concluiu que as doses inseminantes contendo menos que 150×10^6 e mais de 800×10^6 espermatozoides, independentemente da motilidade pós-descongelamento, não resultaram em gestação.

Trimeche *et al.* (1998) utilizaram o sêmen congelado de jumentos com 600×10^6 espermatozoides, apresentando motilidade

progressiva mínima de 35% após o descongelamento, por dose inseminante, para inseminar jumentas da raça Poitou, quando obtiveram uma taxa de gestação de 38%. No mesmo sentido, Papa *et al.* (1999), trabalhando com sêmen congelado de jumentos e uma dose de 800×10^6 de espermatozoides/dose inseminante, obtiveram uma taxa de gestação de 66%. Ao trabalharem com sêmen congelado de asininos, Oliveira *et al.* (2006) utilizaram doses inseminantes contendo 800×10^6 de espermatozoides móveis, quando obtiveram uma taxa de gestação de 40% em éguas. Entretanto, não obteve-se nenhuma gestação quando da inseminação de jumentas, no mesmo estudo.

Ao trabalhar com o sêmen equino congelado em macrotubos, Papa (1987) utilizou uma dose inseminante de 400×10^6 espermatozoides, depositados no corpo do útero, obtendo-se uma taxa de gestação de 52%. Neves Neto (1998), também trabalhando com sêmen equino, utilizou uma dose inseminante de 800×10^6 espermatozoides, congelados em palhetas de 0,55 mL, obtendo uma taxa de gestação de até 53,3% em seu estudo.

Em um estudo realizado por Dell'Aqua Júnior (2000), estudou-se o efeito do local de deposição do sêmen, da concentração da dose inseminante e do momento da inseminação em relação à ovulação, sobre os índices de fertilidade, quando da utilização do sêmen equino congelado. Neste estudo, obteve-se uma taxa de gestação de 20% para as éguas inseminadas no corpo do útero, com 800×10^6 espermatozoides por dose, pós-ovulação. Já para as éguas inseminadas pré e pós-ovulação, com uma dose inseminante de 400×10^6 espermatozoides, depositados também no corpo do útero, obteve-se uma taxa de gestação de 30%. No mesmo estudo, realizou-se inseminações com sêmen congelado pré e pós-ovulação, utilizando-se uma concentração de 150×10^6 espermatozoides por dose inseminante, quando obteve-se taxas de gestação de 40 e 50%, para as inseminações realizadas no corpo do útero e no ápice do corno uterino, respectivamente.

Vidament *et al.* (1997) observaram taxas de gestação mais elevadas em éguas inseminadas duas ou mais vezes por ciclo, em comparação àquelas inseminadas apenas uma vez, de 34% ($n=1.576$) e 26% ($n=626$), respectivamente.

Resultados similares foram descritos por Samper (2001), também trabalhando com sêmen congelado, quando observou-se taxas de gestação mais elevadas para as éguas inseminadas por mais de uma vez, a cada ciclo. Loomis e Squires (2005) avaliaram os dados de duas estações reprodutivas consecutivas, quando observaram taxas de gestação similares para éguas inseminadas uma ou várias vezes por ciclo, obtendo-se valores de 51,5 e 51,7%, na primeira estação e de 47,1 e 46,1% para a segunda estação de monta, respectivamente. As éguas inseminadas duas vezes por ciclo, antes e depois da ovulação, apresentaram taxas de gestação similares às aquelas inseminadas uma vez, dentro de até seis horas após a ovulação, sendo os valores de 48,1% e 47,3%, respectivamente.

Em estudo realizado na Itália, Reger *et al.* (2003), trabalhando com sêmen equino congelado, obtiveram uma taxa de gestação de 76% (26/34), ao utilizarem duas inseminações em tempo fixo, enquanto uma única inseminação, realizada até seis horas após a ovulação, respondeu por uma taxa de gestação de 71% (15/21). Já Barbacini (2005), ao realizar duas inseminações em tempo fixo, antes e após a ovulação, obteve taxas de gestação similares às alcançadas com uma única inseminação, realizada após a ovulação. Sieme *et al.* (2003) observaram que éguas inseminadas duas vezes por ciclo, com intervalo de 24 horas, apresentaram uma taxa de gestação por ciclo de 50%, sendo que aquelas inseminadas uma vez, apresentaram uma taxa de gestação por ciclo, de 42%. As taxas de gestação para éguas inseminadas apenas uma vez, 12 horas pré-ovulação ou 12 horas pós-ovulação foram de 41 e 50%, respectivamente. Segundo os mesmos autores, as inseminações com sêmen congelado deveriam ser realizadas dentro de um intervalo de até 12 horas pré e pós-ovulação.

Entretanto, o uso de várias inseminações por ciclo não é indicado para todas as éguas, como por exemplo, aquelas susceptíveis à endometrite pós-inseminação, como é o caso das éguas velhas ou solteiras (Barbacini, 2009). Estas fêmeas podem necessitar de um manejo mais intensivo de modo a minimizar a contaminação do útero (Moreira, 2010). Sieme *et al.* (2003) descreveram que a fertilidade advinda da utilização do sêmen equino congelado melhorava quando as éguas eram inseminadas mais de uma

vez por ciclo. Já Metcalf (2000) observou que a inseminação das éguas com sêmen equino congelado, duas vezes por ciclo, não influenciou a fertilidade, assim como não aumentou a incidência de endometrite pós-inseminação.

Visando avaliar a fertilidade do sêmen congelado de jumentos da raça Zamorano-Leonés e inseminando jumentas da mesma raça, uma única vez, 24 horas após a indução da ovulação pela administração de hCG, Castejón (2005) obteve uma gestação em 18 ciclos reprodutivos de seis jumentas. Rozas (2005) ao repetir inseminações a cada 12 horas, até a ovulação, obteve também uma gestação em 24 ciclos reprodutivos de 10 jumentas.

Ao realizarem inseminações artificiais em 28 éguas, com sêmen congelado de jumento, Jepsen (2010) utilizou duas inseminações por ciclo, sendo o sêmen depositado no corpo do útero, seis horas pré e seis horas após a ovulação, obtendo-se taxas de gestação de até 58,3% ao longo de cinco estações reprodutivas. Neste estudo, utilizou-se doses inseminantes de 300×10^6 espermatozoides móveis.

Tem sido estabelecido que o intervalo entre a inseminação e a ovulação exerce maior influência sobre a taxa de gestação de éguas que o número de inseminações realizadas, desde que na presença de uma concentração espermática adequada (Palhares, 1997).

Ao trabalharem com sêmen asinino a fresco ou resfriado, diluído em diluidor de lactose-gema de ovo modificado, pela retirada do glicerol de sua formulação, diversos autores obtiveram taxas de gestação satisfatórias, acima de 50% (Silva, 1988; Ferreira, 1993). Quando comparados ao presente experimento, observa-se diferenças entre eles quanto ao método de coleta e o tipo de sêmen utilizado. Enquanto no presente experimento, realizou-se a coleta fracionada para obtenção da fração rica do ejaculado, nos experimentos descritos anteriormente foram utilizados os ejaculados totais dos reprodutores. Além disso, Silva (1988) utilizou o sêmen fresco diluído e Ferreira (1993) o sêmen diluído e resfriado, enquanto no presente experimento, utilizou-se o sêmen congelado, embora todos tenham utilizado o diluidor de lactose-gema de ovo.

O colesterol, quando em altas concentrações, pode exercer um efeito negativo sobre a célula espermática (Parks *et al.*, 1981), ocasionando a infertilidade do sêmen de humanos e garanhões (Sugkraroek *et al.*, 1991; Brinsko *et al.*, 2005). Além disto, tem sido descrito que a presença do colesterol pode induzir um estado de decapacitação, inibindo a reação acrossômica (Davis, 1978). Entretanto, a presença de 20% de gema de ovo nos diluidores para o sêmen de asininos, utilizados por Silva (1988), Ferreira (1993) e Rossi (2008), não reduziu as taxas de gestação. Provavelmente estes resultados estiveram relacionados à manutenção do plasma seminal, em virtude de em todos estes trabalhos ter sido utilizada a coleta total do sêmen. No presente experimento, procurou-se reduzir, ao máximo, a presença do plasma seminal, utilizando coleta fracionada, obtendo-se taxas de gestação de 0 %, independentemente do local de deposição do sêmen, quando da utilização do mesmo diluidor (lactose-gema), contendo 20% de gema de ovo, ao qual adicionou-se glicerol (3,5%).

Em um experimento recente, ainda não publicado, (Carvalho 2011, comunicação pessoal) comparou-se a eficiência de dois diluidores para diluir o sêmen de jumentos, submetidos à coleta fracionada, sendo o sêmen resfriado a 5°C por um período de 18,09±0,23 a 17,91±0,23 horas, em um contêiner especial. Enquanto o diluidor de leite em pó desnatado-glicose (LPDG) proporcionou uma taxa de gestação/ciclo de 56,52% (13/23), o diluidor de lactose-gema de ovo, sem glicerol, respondeu por uma taxa de gestação/ciclo de apenas 4,76% (1/21), sendo que a única égua gestante sofreu morte embrionária precoce, antes dos 20 dias pós-ovulação.

Tem sido observado que quando da utilização da coleta fracionada, para obtenção da fração rica em espermatozoides, as frações pré e pós-espermática são descartadas. Tais frações apresentam baixa concentração espermática e altas concentrações de cloreto de sódio e ácido láctico (Mann *et al.*, 1963). Segundo Padilla e Foote (1991) e Kareskoski *et al.* (2006), altas concentrações de cloro e sódio são prejudiciais à sobrevivência espermática durante o armazenamento do sêmen.

Em um trabalho realizado por Rozas (2005), avaliou-se a eficiência reprodutiva de jumentas inseminadas com sêmen asinino resfriado. Observou-se, neste experimento que o sêmen submetido à remoção do plasma seminal, utilizando-se centrifugação foi capaz de induzir uma forte resposta inflamatória uterina, obtendo-se uma taxa de gestação/ciclo de 21% (6/28). Diferentemente, quando da utilização do sêmen não centrifugado, diluído em leite desnatado ultrapasteurizado, obteve-se maior taxa de gestação por ciclo, de 27% (23/85), sugerindo a influência do plasma seminal na modulação da resposta inflamatória uterina em jumentas.

Vale salientar, entretanto, que Jasko *et al.* (1992), observaram um aumento das motilidades total e progressiva acompanhando a remoção do plasma seminal por centrifugação, seguida pela diluição do sêmen equino destinado ao processo de resfriamento, quando da adição de quatro, oito ou 16% de gema de ovo ao diluidor à base de leite. Bedford *et al.* (1995) obtiveram resultados similares quando adicionaram 4% de gema de ovo ao diluidor à base de leite, sendo esta benéfica à manutenção da viabilidade espermática *in vitro* do sêmen resfriado. Entretanto, quando da avaliação *in vivo*, utilizando inseminação de éguas, concluíram que a adição de gema de ovo ao diluidor à base de leite para diluição do sêmen livre de plasma, embora não tenha influenciado a motilidade espermática, promoveu uma queda da fertilidade. Desta forma, observou-se uma taxa de recuperação embrionária de apenas 17% para as éguas inseminadas com o diluidor acrescido de 4% de gema de ovo, em comparação à de 50% obtida das éguas inseminadas com sêmen diluído em diluidor à base de leite, sem adição de gema. No presente experimento, ao realizar-se avaliações *in vitro*, obteve-se bons resultados de motilidade e de vigor espermáticos, notadamente quando o sêmen foi envasado em palhetas (Tabelas 4.15 e 4.16, experimento II). Entretanto, quando da avaliação *in vivo*, nenhuma gestação foi obtida com a utilização do sêmen congelado em diluidor contendo 20% de gema de ovo e 3,5% de glicerol. Resultados similares foram relatados por Carvalho (2011), em comunicação pessoal, ao utilizar o mesmo diluidor, sem glicerol, para diluir e resfriar o sêmen à 5°C, em contêiner especial, envolvendo apenas a fração rica do sêmen oriundo de coleta fracionada.

Em trabalho conduzido por Jepsen *et al.* (2010), a utilização de diluidor de congelamento contendo alta concentração de gema de ovo influenciou negativamente a taxa de gestação de éguas inseminadas. No experimento, observou-se que o sêmen congelado em diluidor contendo 20% de gema de ovo, associado à presença do glicerol como crioprotetor, resultou em uma taxa de gestação de 0%. Ao substituir-se o glicerol pelo etilenoglicol, obteve-se uma taxa de gestação de 6,3%, enquanto para as éguas inseminadas com sêmen congelado, na presença de apenas 5% de gema de ovo, observou-se uma taxa de gestação de 46,5%. Assim, a baixa fertilidade obtida não foi influenciada, apenas, pela utilização do glicerol como crioprotetor, mas também pela concentração de gema de ovo presente no diluidor. Observou-se, ainda, que ao adicionar-se ciclodextrina ao diluidor de congelamento, mesmo na presença de 20% de gema de ovo, neutralizou-se o efeito negativo da alta percentagem de gema de ovo, obtendo-se uma taxa de gestação de 58,3%. A capacidade das ciclodextrinas de se ligarem aos lipídios, principalmente ao colesterol, sugere que este esteroide pode ser o componente da gema de ovo responsável pela redução da fertilidade na espécie asinina.

Diante dos trabalhos apresentados pela literatura, envolvendo o sêmen de garanhões e de asininos, pode-se concluir que, no presente experimento, a remoção do plasma seminal, através da coleta fracionada, a presença de 20% de gema de ovo e de 3,5% de glicerol exerceram, aditivamente, forte efeito contraceptivo. Se aos resultados deste experimento, acrescenta-se os maus resultados obtidos por Carvalho (2011), também utilizando o mesmo diluidor, sem glicerol, para o sêmen resfriado, ressalta-se o efeito nocivo da gema de ovo, em altas concentrações, quando da redução da presença do plasma seminal.

Preocupações neste sentido, haviam sido mencionadas anteriormente por Bedford *et al.* (1995), em garanhões, quando da redução da taxa de recuperação de embriões em éguas inseminadas com diluidor acrescido de gema de ovo, sendo o sêmen livre de plasma. Contribuições importantes sobre o assunto também foram dadas seguidamente por Davis (1978), Parks *et al.* (1981), Sugkraroek *et al.* (1991) e Brinsko *et al.* (2005), quanto aos efeitos nocivos do colesterol, em altas concentrações,

envolvendo a inibição da reação acrossômica, levando, conseqüentemente, à um estado de decapacitação, acompanhada pela subfertilidade e/ou infertilidade do sêmen de humanos e garanhões. Acrescenta-se a estes estudos, o importante trabalho conduzido por Jepsen *et al.* (2010) em asininos, quando reenfatizou-se o efeito contraceptivo da gema de ovo, quando presente em altas concentrações no diluidor.

Tem sido uma constante em todos os trabalhos realizados no Brasil e no mundo, a redução da fertilidade do sêmen congelado de jumentos quando da inseminação de éguas e, especialmente, quando da inseminação de jumentas. Os resultados inerentes às taxas de gestação obtidos quando da inseminação de éguas são muito variáveis. Neste sentido, Krause e Grove (1967) obtiveram uma taxa de gestação de 50%, ao inseminarem apenas 2 éguas (1/2). Já Vieira *et al.* (1985) descreveram uma taxa de gestação de 66,7% (6/9). Valores de 44% (7/16) de gestação, foram observados por Arruda *et al.* (1986) e de 66% (2/3), descritos por Papa *et al.* (1999). Em trabalho realizado por Oliveira (2005), observou-se uma taxa de gestação de 40% (4/10) em éguas inseminadas com sêmen diluído em diluidor MP 50 + 3% Glicerol + 2% DMF (Desglicerolizado). Já Canisso (2008) observou taxas de gestação variando de 50% (aos 13 dias) à 10% (aos 35 dias) e de 53,3% (aos 13 dias) à 16,6% (aos 35 dias). Vidament *et al.* (2005, 2009) obtiveram uma taxa de gestação de até 36% (18/50), enquanto Jepsen *et al.* (2010), obtiveram uma taxa de gestação de até 58,3% (14/24) em éguas.

Com relação à inseminação de jumentas, Trimeche *et al.* (1998) observaram uma taxa de gestação de 0% (0/17) em jumentas inseminadas com diluidor T2 - 94 (sem desglicerolização), observando-se uma melhora significativa desta variável quando da utilização do diluidor T2 - 94 (com desglicerolização), de 62% (8/13). Rozas (2005) obteve uma taxa de gestação de apenas 4,16% (1/24), em jumentas. Já Oliveira (2005), não obteve nenhuma prenhez em seu trabalho, quando da inseminação de jumentas. Em trabalho realizado por Castejón (2005), observou-se apenas uma prenhez em jumentas, de 18 ciclos utilizados. Vidament *et al.* (2005, 2009) obtiveram uma taxa de gestação máxima de 13% em jumentas, quando da realização de dois trabalhos na França.

Entretanto, trabalhos de pesquisa realizados seguidamente no Brasil, utilizando o ejaculado total de jumentos e um diluidor com 20% de gema de ovo, sempre responderam por bons índices de fertilidade, qualquer que fosse o tipo de sêmen utilizado, ou seja, a fresco diluído (Silva, 1988; Silva Filho, 1994) ou resfriado e/ou transportado (Ferreira, 1993; Silva Filho, 1994; Rossi, 2008). Tem sido ainda, amplamente discutida a utilização do glicerol como inadequada à criopreservação do sêmen de asininos (Vidament *et al.*, 2009; Jepsen *et al.*, 2010).

Diante da ampla discussão apresentada anteriormente, apontou-se para uma forte interação negativa entre a retirada do plasma seminal, a presença de altas concentrações de gema de ovo e de glicerol, como possíveis responsáveis pela contraceptividade do sêmen congelado dos jumentos, no presente experimento. Diante disso, e na impossibilidade da utilização do sêmen para o congelamento, sem a retirada do plasma seminal, há que se salientar a necessidade da redução ou mesmo da eliminação da gema de ovo dos diluidores a serem utilizados, para o congelamento do sêmen de asininos. Associa-se a esta recomendação, a substituição do glicerol pelo etilenoglicol como crioprotetor. Deve-se enfatizar, finalmente, que os mesmos cuidados deveriam permear os trabalhos envolvendo a utilização do sêmen à fresco diluído, ou do diluído, resfriado e/ou transportado, envolvendo o sêmen oriundo de coletas fracionadas.

Tem havido nos últimos anos, uma redução progressiva dos estudos *in vivo*, tendo como ponto final a avaliação da fertilidade de éguas. Os estudos *in vitro*, envolvendo a manutenção das características físicas e morfológicas do sêmen, acompanhadas por indicadores de integridade de membrana (provas funcionais), tem sido uma constante, no presente momento, em todo o mundo. Os altos custos envolvidos na experimentação com animais, a longa duração dos experimentos, o reduzido número de animais utilizados por tratamento e a grande eficiência das máquinas e dos procedimentos “não subjetivos” de avaliação das células espermáticas, quando submetidas à diferentes tratamentos, tem sido explicações constantemente utilizadas por diferentes

pesquisadores, ao utilizarem tão e somente experimentos *in vitro*.

Várias revistas científicas, em todo o mundo, tem se recusado a publicar trabalhos que não tenham, por exemplo, avaliações de sêmen, realizadas por métodos objetivos (CASA). Interessante é que a inseminação artificial de bovinos e de outras espécies tem sido apontada como uma prova incontestável da grande contribuição da ciência ao melhoramento genético dos rebanhos, no mundo inteiro. Enfatiza-se que até há bem pouco tempo atrás, utilizou-se o homem e as inadequadas avaliações “subjetivas”, como instrumentos únicos para a mensuração da qualidade espermática.

Os resultados dos experimentos II e III, bem como aqueles obtidos por Carvalho (2011), devem servir como alerta para os que depositam credibilidade total aos experimentos *in vitro*. Embora tenham sido observados resultados satisfatórios, quanto à manutenção das características espermáticas (motilidade e vigor), após o processo de congelamento e descongelamento (Tabelas 4.15 e 4.16 – Experimento II), as taxas de gestação acompanhando as inseminações foram zero. O mesmo pode ser dito dos dados obtidos por Carvalho (2011), quando utilizou-se o mesmo diluidor, para a diluição e resfriamento do sêmen, submetido à coleta fracionada. Se porventura, em ambos os experimentos, fêmeas não tivessem sido inseminadas, por certo o protocolo utilizado no experimento II seria apontado como altamente satisfatório, em virtude de ter respondido por um aproveitamento de 71,19% (42/59) dos ejaculados.

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho concluiu-se que:

- a) As características físicas seminais diferiram entre os jumentos, evidenciando-se, assim, a presença de grande variação individual entre eles;
- b) O período de avaliação do sêmen influenciou os resultados de motilidade e de vigor espermáticos nos experimentos *in vitro* (I e II), que foram sempre inferiores ($p < 0,05$) no

sêmen congelado/descongelado, em relação ao que observou-se quando das avaliações realizadas em diferentes momentos, no transcorrer do processo de congelamento do sêmen (sêmen a fresco, pré-diluído, pós-diluído);

- c) As amostras envasadas em palhetas de 0,55 mL mantiveram uma melhor viabilidade espermática, quando comparadas às envasadas em FlatPacks;
- d) O percentual de ejaculados aprovados foi influenciado pelo reprodutor, tipo de envasamento e pela curva de resfriamento utilizada, sendo os melhores resultados obtidos para as amostras envasadas em palhetas, quando da utilização de uma curva de resfriamento lenta;
- e) A administração de 1.666 UI de hCG foi eficiente para promover a indução da ovulação em éguas, na presença de um folículo ≥ 34 mm de diâmetro em um dos ovários e edema uterino intramural, sendo que a maioria delas ocorreu entre 30 e 42 horas após a sua indução (Experimento III);
- f) A remoção do plasma seminal, utilizando-se coleta fracionada, associada a um diluidor contendo 20% de gema de ovo e 3,5% de glicerol, exerceram, possivelmente, forte efeito contraceptivo, resultando em uma taxa de gestação de 0% (Experimento III);

Finalmente, os resultados satisfatórios obtidos quanto à manutenção das características espermáticas após o congelamento e descongelamento do sêmen, observados nos experimentos *in vitro* (I e II) deste trabalho, especialmente no experimento II, associados à taxa de gestação de 0%, observada no experimento *in vivo* (III), demonstraram, mais uma vez, que testes laboratoriais isolados não são capazes de estimar o potencial de fertilização de uma amostra de sêmen, sendo, para isso, fundamental a realização de testes de fertilidade *in vivo*. Tais resultados devem estimular a reflexão daqueles que depositam total confiança nas avaliações *in vitro*.

6. PROPOSTAS FUTURAS

- a) Comparar em um mesmo experimento, diferentes procedimentos para a retirada do plasma seminal, incluindo a coleta fracionada e/ou a centrifugação do sêmen, antes do seu congelamento;
- b) Ajustar o diluidor, estabelecendo a percentagem de gema de ovo adequada ao sêmen asinino, ou substituí-la integralmente por outra macromolécula, como por exemplo, as oriundas do leite;
- c) Alterar o crioprotetor utilizado, substituindo o glicerol pelo etilenoglicol, ou por outros, menos tóxicos às células espermáticas do jumento;
- d) Utilizar uma curva de resfriamento pré-congelamento mais lenta;
- e) Realizar experimentos em que estejam associados testes laboratoriais e a avaliação da fertilidade *in vivo*, quando da utilização de novos protocolos envolvendo a criopreservação do sêmen asinino.

7. REFERÊNCIAS

- AGUILAR, J.J.; LOSINNO, L.; KONCURAT, M. *et al.* Nuclear, cytoplasmic and mitochondrial patterns of ovulated oocytes in young and aged mares. *Theriogenology*, v.58, p.689-692, 2002.
- AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and postthawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*, v.57, p.1801-1808, 2002.
- AKCAY, E.; REILAS, T.; ANDERSSON, M. *et al.* Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *J. Vet. Med. Association*, v.53, p.481-485, 2006.

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS *et al.* Organização interna da célula: Estrutura da membrana. In: _____. *Biologia Molecular da Célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap.10, p. 583-595.
- ALIEV, A.I. The effect of ovariotropin on reproductive function of mares, and the optimum time of insemination with frozen-thawed semen. *Anim. Breed. Abst.*, v.49, n.12, p.805, 1981.
- ALLEN, W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*, v.121, p.513- 527, 2001.
- ALLEN, W.R., COOPER, M.J. Prostaglandins. In: McKinnon, A.O. e Voss, J.L. *Equine Reprod.*. Malvern: Lea e Febiger, 1993, p.69-80.
- ALLEN, W.R.; WILSHER, S.; MORRIS, L. *et al.* Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v.94, p.242-243, 2006.
- ALMEIDA, F.Q.; FONSECA, F.A.; ESPECHIT, C.J.B. *et al.* Efeito da prostaglandina f-2 alfa e de progesterona na eficiência reprodutiva de éguas mestiças no período pós-parto. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v.24, p.652-659, 1995.
- ALMEIDA, F.Q.; SILVA, V.P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. *Rev. Bras. Zootec.*, v.39, p.119-129, 2010.
- ALVARENGA, M.A.; MCCUE, P.; SQUIRES, E.L. *et al.* Improvement of ovarian superstimulation in mares treated with EPE twice daily. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, suppl. 27, p.197, 1999.
- ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; MAGALHÃES, L.C.O.; PAPA, F.O. A new method to concentrate equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.* v.121, p.186-187, 2010.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; CARMO, M.T.; KIEVITSBOSCH, T.; CHAVES, M.M.B.C.; NETO, C.R. Methods of concentrating stallion semen. *J. Equine Vet. Sci.*, v.32, p.424-429, 2012.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. *et al.* Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Anim. Reprod. Sci.* v.89, p.105-113, 2005.
- ALVAREZ, A.L.; SERRES, C.; CRESPO, F. *et al.* Cryopreservation of Zamorano-Leonés donkey semen using different amides. *Reprod. Dom. Anim.*, v.39, n.4, p.267, 2004. (Abstract).
- ALVAREZ, A.L.; SERRES, C.; TORRES, P. *et al.* Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* v.95, p.89-91, 2006.
- AMANN, R.P.; CRISTANELLI, M.S.; SQUIRES, E.L. Proteins in stallion seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl.35, p.105-112, 1987.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.R. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Ed.). *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. p.715-745.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, v.7, p.145-173, 1987.
- AMBROSE, J.D.; PIRES, M.F.A.; MOREIRA, F. *et al.* Influence of deslorelin (GnRH-agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, v.50, p.1157-1170, 1998.
- ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH, A.S.; CARPENTER, J.F. *et al.* Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipides during freezing. *Cryobiology*, v.24, p.324-331, 1987.
- ANDRADE, L.S. Endocrinologia: o funcionamento hormonal na égua e no garanhão. In: _____. *Fisiologia e manejo da reprodução equina*. 2.ed. Recife, 1986. p.43-84.

- ARRUDA, R.P. *Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)*. 2000. 120f. Tese (Tese de Livre Docência em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; BARBOSA, R.T. *et al.* Características Seminais de equídeos destinados a seleção para a congelamento. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Supl.1, p.214, 1989. (resumo)
- ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; MANZANO, A. Inseminação artificial de equídeos com sêmen congelado em palhetas de 0.5 mL. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 10., 1986, Cuiabá. Anais... Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso. p.181.
- ATGER, V.M.; MOYA, M.L.; STOUT, G.W. *et al.* Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *J. Clin. Invest.*, v.99, p.773-780, 1997.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.65-75, 2005.
- AURICH, C. Advances in artificial insemination. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION (WEVA), 9, Marrakech. *Proc...*, Marrakech:Morocco, 2006. p. 230-234.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. *Anim. Reprod. Sci.*, v.107, p.268-275, 2008.
- AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H. *et al.* Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, v.46, p.791-797, 1996.
- BALL, B. Reduced reproductive efficiency in the aged mare: role of early embryonic loss. Recent Advances In: BALL, B. (Ed.) *Recent Advances in Equine Reproduction*, 1 ed. 2000. Disponível em: International Veterinary Information Service (www.ivis.org). Acesso em: 10 de abril. 2011.
- BALL, B.A.; LITTLE, T.V.; HILLMAN, R.B. *et al.* Pregnancy rates at days 2 and 14 and estimated pregnancy loss rates prior day 14 in normal and subfertile mares. *Theriogenology*, v.26, p.611-619, 1986.
- BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G. *et al.* Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.56, p.577-589, 2001.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.*, v.22, p.1061-1069, 2001.
- BARBACINI, S. (2009). Frozen semen processing and quality control. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION (WEVA), 11.2009, Guarujá. *Proc...*, Guarujá: [s.n] 2009. p.109-211.
- BARBACINI, S.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; *et al.* Incidence of embryo loss in mares inseminated before or after ovulation. *Equine Vet. Educ.*, v. 11, p.252-254, 1999.
- BARBACINI, S.; LOOMIS, R.P.; SQUIRES, E.L. The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen-thawed spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.203-205, 2005.
- BARBACINI, S.; MARCHI, V.; ZAVAGLIA, G. Equine frozen semen: results obtained in Italy during the 1994-1997 period. *Equine Vet. Educ.*, v.11, p.109-112, 1999.
- BARBACINI, S.; SAVAGLIA, G.; GULDEN, P.; *et al.* Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Vet. Educ.*, v.2, p.404-410, 2000.
- BARRETO, M.A.P. *Influência de um termo-sistema de descongelamento ultra-rápido na motilidade e integridade de membranas de espermatozoides bovinos criopreservados*. 2002. 44f. Tese (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.

- BARRETO, M.A.P. *Efeitos das proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kda sobre a congelabilidade do sêmen, reação inflamatória uterina e fertilidade*. 2007. 78f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, RJ.
- BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J. *et al.* Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.48, p.391–417, 1997.
- BEDFORD, S.J.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K. *et al.* Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.43, n.5, p.955-967, 1995.
- BEKER, A.R.C.L. *Efeitos de diferentes concentrações espermáticas e de antibióticos sobre a longevidade de sêmen asinino (Equus asinus), resfriado a 5°C*. 1997. 91f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- BELL, R.J.; BRISTOL, F. Fertility and pregnancy loss after delay of foal oestrus with progesterone and oestradiol-17 β . *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. 35, p.667–668, 1987.
- BENCHIMOL, M. Congelamento e criofratura. In: BENCHIMOL, M. (ED); ATTLAS, M.; CUNHA E SILVA, N.L. E CARVALHO, T.U., *Métodos de Estudos da Célula*. FENORTE/UENF, Campos-RJ, 1996, p.101-107.
- BERGEFELT, D.R. Estrous synchronization. mare. In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Philadelphia: Saunders, 2000, p.195-228.
- BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; *et al.* Low density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.*, v.70, p.708-717, 2004.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Develop.*, v.73, n.10, p.1338–1344, 2006.
- BERLINER, V.R. Dilutors for stallion and jack semen. *J. Anim. Sci*, p.314-319, 1942.
- BERLINER, V.R.; SHEETS, E.W.; MEANS, R.H. *et al.* Oestrus cycle of jennets and sperm production of jacks. *J. Anim. Sci*, p.295-298, 1938.
- BERNDSTON, W.E.; FOOTE, R.H. The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol. *Cryobiology*. v.5, p.398-402, 1969.
- BITTMAR, A.; KOSINIAK, K. The role of selected biochemical components of equine seminal plasma in determining suitability for deep-freezing. *Arch. Vet. Pol.*, v.32, p.17-29, 1992.
- BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J. *Manual of Equine Reproduction*. Missouri: Mosby. 1998.
- BOETA, M.; QUINTERO, L.Z. Utilización de la leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. *Vet. Méx.*, v.31, p.67-69, 2000.
- BOGART, R.; MAYER, D.T. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. *J. Anim. Sci.*, v.9, p.143-152, 1950.
- BORG, K.; COLENDER, B.; FAZELI, A. *et al.* Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.48, p.531-536, 1997.
- BOYLE, M.S.; CRAN, D.G.; ALLEN, W.R. *et al.* Distribution of spermatozoa in the mare's oviduct. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl.35, p.79-86, 1987.

- BRAGA, C.R. *Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído em diferentes diluidores e armazenado a 17°C ou a 5°C, em container especial, por 24 horas*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 198p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária – UFMG, 2007.
- BRINSKO, S.P.; BALL, B.A.; ELLINGTON, J.E. *In vitro* maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mares. *Theriogenology*, v. 44, p. 461-469, 1995.
- BRINSKO, S.P.; BALL, B.A.; MILLER, P.G. *In vitro* development of day 2 embryos obtained from young, fertile mares and aged, subfertile mares. *J. Reprod. Fertil.*, v.102, p.371-378, 1994.
- BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v.54, p.129-136, 2000.
- BRINSKO, S.P.; IGNOTZ, G.G.; BALL, B.A. *et al.* Characterization of polypeptides synthesized and secreted by oviductal epithelial cell explants obtained from young, fertile and aged, subfertile mares. *Am. J. Vet. Res.*, v.57, p.1346-1353, 1996.
- BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; BAUER, J. E. *et al.* Cholesterol and phospholipid analysis in sperm of stallions with unexplained subfertility. *Am. Assoc. Equine Pract.*, v. 51, 2005. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2005/brinsko/ chapter. asp? LA=1>. Acesso em: 10/06/2011.
- BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; LINDSEY, A.C, *et al.* Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally-guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. *Theriogenology*, v.59, p.1001-1009, 2003.
- BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (ed.) *Equine Reproduction*. Philadelphia: Williams e Wilkins, 1992. p.790-797.
- BRISTOL, F. Breeding behavior of a stallion at a pasture with 20 mares in synchronized oestrous. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 3, 1982, Sidney. *Proc...* Sydney: [s.n] 1982. p.71-77.
- BUCHANAN, B.R.; SEIDEL Jr., G.E.; McCUE, P.M. *et al.* Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*, v.53, p.1333-1344, 2000.
- BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants, lipid peroxidation, -tocopherol and ascorbate. *Arch. Bioch. Biophys.*, v.300, p.535-43, 1993.
- BWANGA, C.O.; DE BRAGANCA, M.; EINARSSON, S. *et al.* Freezing of boar semen in mini- and maxi-straws. *J. Vet. Med. Assoc.*, v.37, p.651-658, 1990.
- CALVETE, J.J.; NESSAU, S.; MANN, K.; *et al.* Isolation and biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. *Reprod. Dom. Anim.*, v.29, p. 411-426, 1994.
- CAMILLO, F.; MARMORINI, P.; ROMAGNOLI, S. *et al.* Fertility at the first post partum estrous compared with fertility at the following estrous cycles in foaling mares and with fertility in nonfoaling mares. *J. Equine Vet. Sci.*, v.17, p. 612-615, 1997.
- CANISSO, I.F. *Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (Equus asinus) da raça Pêga*. 2008. 211f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, MG.
- CANISSO, I.F.; CARVALHO, G.R.; DAVIES MOREL, M.C.G. *et al.* Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga donkeys (*Equus asinus*) mounting estrous horse mares (*Equus caballus*). *Theriogenology*, v.73, p.56-63, 2010.
- CANISSO, I.F.; CARVALHO, G.R.; SILVA FILHO, J.M. *et al.* 2007. Fertilidade do semen congelado de jumentos da raça Pega em éguas. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Curitiba. *Anais...*Paraná: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2007.

- CANISSO, I.F.; SOUZA, F.A.; CARVALHO, G.R. *et al.* Alguns aspectos fundamentais do exame clínico andrológico de jumentos (*Equus asinus*). *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, v.32, p.233-239, 2008.
- CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v.31, p.287-299, 1993.
- CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Follicular activity and concentrations of FSH and LH associated with senescence in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v.35, p.231-246, 1994.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationship of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*, v.37, p.1101-1115, 1992.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol. Reprod. Mono.*, v.1, p. 209-214, 1995.
- CARVALHO, G.R. *Fertilidade do sêmen equino diluído, resfriado a 20°C e transportado*. 1992. 87f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1992.
- CASLICK, E.A. The vulva and vulvo-vagina orifice and its relation to the genital health of the thoroughbred mare. *Cornell Veterinarian*, v.27, p.178-187, 1937.
- CASTEJÓN, F.C. *Estudio de la congelación del semen e inseminación artificial en el asno zamorano-leonés*. 2005. 173f. Tese (Doctor em Veterinaria). Facultad de Veterinaria - Universidad Complutense de Madrid.
- CHEVALIER-CLÉMENT, F. Pregnancy loss in the mare. *Anim. Reprod. Sci.*, v.20, p. 231-244, 1989.
- CHOONG, C.H.; WALES, R.G. The effect of cold shock on spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.15, p.543-551, 1962.
- 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.22, p.25-38, 1984.
- COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; SCHROEDER, F. *et al.* Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fertil.*, p.127-132, 2000.
- CONTRI, A.; DE AMICIS, I.; VERONESI, M.C. *et al.* Efficiency of different extenders on cooled semen collected during long and short day length seasons in Martina Franca donkey. *Anim. Reprod. Sci.*, v.120, p.136-141, 2010.
- COOK, W.H.E.; MARTINS, W.G. *Structure and functional aspects of lipoproteins in living systems*. 5.ed. London: Tria and A.M. Scaru, Academic Press, 1969. 579p.
- COOPER, G.M. *The cell: a molecular approach*. Washington: ASN Press, 1996, 673p.
- COTTORELLO, A.C.P. Criopreservação de sêmen equino utilizando associação de etilenoglicol e glicerol. 2002. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- COTTORELLO, A.C.P.; SNOECK, P.P.N.; BECKER, A.R.C. *et al.* Efeito da rediluição na longevidade do sêmen asinino (*Equus asinus*) preservado a 5°C. *Rev. Bas. Reprod. Anim.*, v. 27, p. 342-344, 2003.
- CRISTANELLI, M.J., SQUIRES, E.L., AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology*, v.22, p.39-45, 1984.
- CROWDER, M.E.; HERRING, R.D.; NETT, T.M. Rapid recovery of gonadotroph function after down-regulation of receptors for GnRH in ewes. *J.Reprod. Fertil.*, v.78, p.577-585. 1986.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F. *et al.* Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Bioch. Journal*, v.242, p.1-10, 1987.

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod.*, v.5, p.46-52, 2000.

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

DALMAU, C. S. *Evaluación y conservación del semen en el asno Zamorano-Leonés*. 2003. 190f. Tese (Doutorado). Facultad de Veterinaria - Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Espanha.

DARENIUS, A. Experiences with chilled, transported equine semen. In: STALLION REPRODUCTION SYMPOSIUM, 1998, Society for Theriogenology - American Association of Equine Practitioners. *Proceedings...* 1998, p.60-70.

DAVIES MOREL, M.C.G. *Equine artificial insemination*. Wallingford-Oxon: CAB international, 1999, 406p.

DAVIS, B. K. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. *Symposium on the pharmacological effects of lipids*. AOCS Monograph, n.5, p. 145-157, 1978.

DEICHSEL, K.; AURICH, J. Lactation and lactational effects on metabolism and reproduction in the horse mare. *Livestock Prod. Sci.*, v.98, p.25-30, 2005.

De LEEUW, F.E.; De LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G. *et al.* Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v.30, p.32-44, 1993.

DELL'AQUA JÚNIOR, 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 inseminante do sêmen congelado equino*. 2000. 81f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DELL'AQUA JÚNIOR., J.A.; PAPA, F.O. Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelação de sêmen equino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14, 2001, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2001. p. 460-462.

DÍAZ, N.; DUVERGER, O.; DENIS, R. *et al.* Resultados preliminares sobre fertilidad en yeguas inseminadas con semen fresco de burros para la obtención de mulus (*Equus mulus*). *Cien. Tecnol. Ganadera*, v.3, p.65-67, 2009.

DOUGLAS, R.H.; NUTI, L.; GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. *Theriogenology*, v.2, p.133-142, 1974.

DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; BURNS, P.J.; DRISCOLL, D.D. *et al.* Fertility and characteristics of slow-cooled stallion semen. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 4., 1986. Calgary. *Proc...* Calgary: 1987, p.649-660.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T. *et al.* Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membrane: A demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool.*, v.265, p.432-437, 1993.

DUCHAMP, G.; BOUR, B.; COMBARNOUS, Y. *et al.* Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J. Reprod. Fertil.Suppl.*, v.35, p.221-228, 1987.

- EL WISHY, A.B. Morphology of epididymal spermatozoa in the ass (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*). *Zeitschrift-fur-Tierzuchtungs-und-Zuchtungsbiologie*, v.92, p.67-72, 1975.
- EL-WISHY, A.B.; EL-SAYED, M.A.I.; Seida, A.A. *et al.* Some aspects of reproductive performance in arabian mares in egypt. *Reprod. Dom. Anim.*, v.25, p.227-234, 1990.
- ERIKSSON, B.M. Cryopreservation of boar semen – Studies on sperm viability *in vitro* and fertility. Doctoral thesis – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2000.
- ERIKSSON, B.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Anim. Reprod. Sci.*, v.63, p.205–220, 2000.
- EVANS, M.J.; HAMER, J.M.; GASON, L.M. *et al.* Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. *J. Reprod. Fertil.Ssuppl.* v.35, p.327-342, 1987.
- FAGUNDES, B. *Análise do congelamento e descongelamento de semen equino utilizando proteínas do plasma seminal em diferentes concentrações*. 47f. Dissertação (Mestrado em Produção animal - Área de Biotecnologia da Reprodução Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2003.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, v.23, p.1-13, 1986.
- FERNANDES, C.; CARNEIRO, U.; BORGES, C. *et al.* Eficiência reprodutiva de éguas PSI no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.389.
- FERREIRA, M.F.L. *Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e fertilidade do sêmen de jumento (equus asinus)*. 1993. 94f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- FERREIRA, M.F.L.; JONES, D.N.; HENRY, M. *et al.* Efeito da centrifugação e de diluentes sobre a preservação do sêmen resfriado de jumentos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p.452.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, v.43, p.1-16, 1997.
- FIALA, S.M.; AMARAL, M.G.; PIMENTEL, C.A. *et al.* Inflammatory lesions in the mare's oviducts. *Anim. Reprod. Sci.*, v.94, p.265-267, 2006.
- FITZGERALD, B.P.; PETERSON, K.D.; SILVIA, P.J. Effect of constant Administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist on reproductive activity in mares:Preliminary evidence on suppression of ovulation during the breeding season. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p.1746-1751, 1993.
- FLEURY, J.J.; CASSOLI, P.D. Inseminação artificial em equino com baixa dose de sêmen congelado. In: ARQUIVOS DA FACULDADE DE VETERINÁRIA UFRGS, 27, 1999, Porto Alegre. *Anais...* Campos do Jordão: XIV reunião anual da SBTE, 1999. p.223.
- FLEURY, J.J.; COSTA NETO, J.B.; ALVARENGA, M.A. Results from a embryo transfer programe with Mangalarga in Brazil. *Equine Vet. J.*, Suppl. 8, p.73-74, 1989.
- FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.49, p.277-284, 1977.
- FONSECA, C.O., FILHO, V.R.V. FILHO, A.M., ABREU, J.J. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1997) Manual para exame Andrológico e avaliação do sêmen animal; Ministério da Agricultura e do Abastecimento /CBRA Nº021/1997. Belo Horizonte .

- FONSECA, C.W. *Efeito de uma nova técnica de coleta fracionada sobre a composição do plasma seminal e qualidade do sêmen equino pós-descongelamento*. 2006. 108f. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2006.
- FORD, W.C.L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update*, v.10, p.387-399, 2004.
- FRASER, H.M. Luteinizing hormone-releasing hormone and fertility control. *Rev. Reprod. Biol.*, v.3, p.1-48, 1981.
- FURST, R. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento em concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino. 2006. 96f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoide e plasma seminal. In: Hafez, E.S.E. *Reprodução animal*. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p.97-110.
- GASTAL, E.I.; GASTAL, M.O.; NOGUEIRA, G.P. *et al.* Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biol. Reprod.*, v.57, p.1320-1372, 1997.
- GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; NOGUEIRA, G.P. *et al.* Temporal interrelationships among luteolysis, FSH, and LH concentrations and follicle deviation in mares. *Theriogenology*, v.53, p.925-940, 2000.
- GIGAX, A.P.; GANJAM, V.K.; KENNEY, R.M. Clinical, microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.27, p.571-578, 1979.
- GINTHER, O.J. In: *Reproductive biology of the mare: Basic and Applied Aspect*. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing. 1979, ...p
- GINTHER, O.J. *Reproductive Biology of the Mare: basic and applied aspects*. Cross Plains WI, Equiservices, 1992. 478p.
- GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod.Sci.* v.60, p. 61-79, 2000.
- GINTHER, O.J.; BAUCUS, K.L.; BERGFELT, D.R. Follicular and FSH responses to parturition during the anovulatory season in mares. *Theriogenology*, v.41, p.613-627, 1994.
- GINTHER, O. J.; CARNEVALE, E.M.; BERGFELT, D.R. Delay in emergence of the ovulatory follicular wave in old mares. *J. Equine Vet. Sci.*, v.13, p.75-79, 1993.
- GODOI, D.B.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.A. Comparative study of follicular dynamics between lactating and non-lactating mares: effect of the body condition. *Theriogenology*, v.58, p.553-556, 2002.
- GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L. *et al.* Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, v.58, p.277- 279, 2002.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Reprod. Tech.*, v.12, p. 131-147, 1996.
- GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, v.24, p.42-52, 1987.
- GREENHOFF, G. R; KENNEY R. M. Evaluation of reproductive status of nonpregnant mares. *J. Am.Vet.Med. Assoc.*, v.167, p.449-58, 1975.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 7. ed. Barueri-SP: Manole, 2004, 513p.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology*, v.29, p.26-38, 1992.
- HAMMES, A.M.; PIMENTEL, C.A.; FERNANDES, C.E. Fertilidade em garanhões avaliada através do exame andrológico. *Ciência Rural*, v.26, p.277-283, 1996.

- HART, P.J.; SQUIRES, E.L.; IMEL, K.J. *et al.* Seasonal variation in hypothalamic contents of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH, and pituitary content of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the mare. *Biol. Reprod.*, v.30, p.1055-1062, 1984.
- HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J. Dairy Sci.*, v.66, p.2645-2660, 1983.
- HAYES, K.E.N.; GINTHER, O.J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. *Theriogenology*, v.25, p.581-589, 1986.
- HAYES, K.E.N.; PIERSON, R.A.; SCRABA, S.T. *et al.* Effect of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. *Theriogenology*, v.24, p.65-77, 1985.
- HEBER, D.; SWERDLOFF, R.S. Down-regulation of pituitary gonadotropin secretion in postmenopausal females by continuous gonadotropin-releasing hormone administration. *J. Clin. Endocrinol. e Metab.*, v.52, p.171-172, 1981.
- HEIDLER, B.; PARVIZI, N.; SAUERWEIN, H. *et al.* Effects of lactation on metabolic and reproductive hormones in lipizzaner mares. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.25, p.47-59, 2003.
- HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES E.L. *et al.* Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet. J.*, v.28, p.47-53, 1996.
- HELLANDER, J.C.; SAMPER, J.C.; CRABO, B.G. Fertility of stallion with low sperm motility and a height incidence of an unusual sperm tail defect. *Vet. Rec.*, v.128, p.449-451, 1991.
- HENRY, M.; LAGO, L.A.; MENDONÇA, L.F. Asininos: animais com características sociais e reprodutivas próprias. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.33, p.223-230, 2009.
- HENRY, M.; OLIVEIRA, M.M.F.; DIAZ, A.P. *et al.* Comportamento de jumentos no período de cortejo e ato sexual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1987, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987, p.71.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
- HOSHIBA, H.; SINOWATZ, F. Immunohistochemical localization of the spermadhesin AWN-1 in the equine male genital tract. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, v.27, n.5, p.351 – 353, 1998.
- HUGHES, J.P. Curso de Equinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte : CBRA, 1991.
- HUNTER, R.H.F. Gamete lifespan in the mare's genital tract. Editorials. *Equine Vet. J.*, v.22, p.378- 379, 1990.
- HURTGEN, J.P. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. *Theriogenology*, v.66, p.560-566, 2006.
- IRVINE, C H.G. Gonadotropin-releasing hormone. *J. Equine Vet. Sci.*, v.3:168-170, 1983.
- IRVINE, C.H.G.; ALEXANDER, S.L. GnRH. In: *Equine Reproduction*. Malvern: Lea e Febiger, 1993, p.37-44.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *ARS Veterinaria*, v.10, p.156-165, 1994.
- JASKO, D.J.; BEDFORD, S.J.; COOK, N.L. *et al.* Effects of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.40, p.885-893, 1993.
- JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SACHALTENBRAND, V.I. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.37, p. 1241-1252, 1992.

- JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E. *et al.* Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, v.35, p.1059-1067, 1991.
- JEPSEN, R.J.; EVANS, L.E.; YOUNGS, C.R. Use of direct thaw insemination to establish pregnancies with frozen-thawed semen from a standard jack. *J. Equine Vet. Sci.*, v.30, p.651-656, 2010.
- JOCHLE, W.E.; TRIGG, T.E. Control of ovulation in the mare with Ovuplant™. A short-term release implant (STI) containing the GnRH analogue deslorelin acetate: Studies from 1990-1994. *World J. Equine Vet. Sci.*, v.14, p. 632-644, 1994.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P. Storage of boar semen. *Veterinary Clinics of North America*, v.62, p.143-172, 2000.
- JONES, D. M.; FIELDEN, E. E.; CARR, D. H. Some physiological and pharmacological factors affecting uterine e motility as measured by electromyography in the mare. *Journal of Reproduction and fertility suppl.* v. 44, p. 357-358, 1991.
- JORDÃO, L.P.; DE CAMARGO, M.X.; GOUVEIA, P.F. Eficiência, na reprodução, das éguas mulateiras da coudelaria paulista. *Bol. Ind. Anim.*, v.14, p.49-62, 1954.
- KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T. *et al.* Recycling of vitamin E in low density lipoproteins. *J. Lip. Res.*, v.33, p.385-397, 1992.
- KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J. *et al.* Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.63, p.1354-1365, 2005.
- KARESKOSKI, M.; KATILA T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim. Reprod. Sci.*, v.107, p. 249–256, 2008.
- KARESKOSKI, A.M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M. *et al.* Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. *Reprod. Dom. Anim.*, v.41, p. 33-38, 2006.
- KARESKOSKI, A.M.; REILAS, T.; SANKARI, S. *et al.* Composition of fractionated stallion ejaculates. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 89, p. 228–230, 2005.
- KATILA, K. Characteristics of the successive jets of ejaculated semen of stallions. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, p. 267-272, 2001.
- KATILA, T., ANDERSSON, M., REILAS, T., *et al.* Post-thaw motility and viability of fractioned and frozen stallion ejaculates. *Theriogenology*, v.58, p.241-244, 2002. (abstract)
- KATILA, T.; REILAS, T.; GUVENC, K.; *et al.* The effect of seminal plasma on motility characteristics and viability of spermatozoa after cooled storage. In: 3rd Meeting of the European Equine Gamete Group. Havemeyer Foundation Monograph Series, n. 13, p.3-5, 1994.
- KATILA, T.; SANKARI, S.; MÄKELÄ, O. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* v.56, p.571-578, 2000.
- KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Rum. Res.*, v.44, p.153-158, 2002.
- 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, p.601–614, 1992.
- KEITH, S.L. *Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa.* 1998. 104f. Thesis (Master of Science) - Colorado State University. Fort Collins, Colorado, USA.
- KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. *et al.* Minimal contamination techniques for breeding. Technique and preliminary findings. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, v.21, p.327-336, 1975.
- KENNEY, R.M.; GANJAM, V.K. Selected pathological changes of the mare uterus and ovary. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.23, p.335-339, 1975.

- KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.P.; PIERSON, R. *et al.* *Society for theriogenology manual for clinical fertility evaluation of the stallion*. Hastings: Society for Theriogenology, 1983. 100p.
- KLEIN, U.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with β -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry*, v.34, p.13784-13793, 1995.
- KLOPPE, L.H.; VARNER, D.D.; ELMORE, R.G. *et al.* Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.29, p.429-439, 1988.
- KLUG, E. Routine AI application in the Hannoverian Sport Horse Breeding Association. *Anim. Reprod. Sci.*, v.28, p.39-44, 1992.
- KNOTTENBELT, D.C.; Le BLANC, M.; LOPATE, C. *et al.* *Equine Stud Farm Medicine and Surgery*. :Saunders, 2003, 402p.
- KOSINIAK, K. Characteristics of the successive jets of ejaculated semen of stallions. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl.23, p.59-61, 1975.
- KOSKINEN, E.; KARLSSON, M.; REILAS, T. *et al.* Catalase activity and total protein in fractionated stallion seminal plasma. *Theriogenology*, v.58, p.337-440, 2002.
- KRAUSE, D.; GROVE, D. Deep freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form. *J. Reprod. Fert.*, v.14, p.139-141, 1967.
- KREUCHAUF, A. Reproductive physiology in the jackass. *Anim. Res. Develop.*, v.20, p.51-78, 1984.
- KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUMDER, G.C. Effect of amino acid on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using chemically defined model system. *Cryobiology*, v.41, p.21-27, 2001.
- LAGARES, M.A.; AMARAL, D.C.G.; SOUZA, P.C. *et al.* Efeito de diluidores e curvas de resfriamento sobre a motilidade e integridade da membrana plasmática do espermatozoide equino resfriado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.25, p.452-457, 2001.
- LAMBERT, W.V.; McKENZIE, F. F. *Artificial Insemination in Livestock Breeding*. Washington: United States Department of Agriculture, 1940. 67p. (Circular n.567 – Miscellaneous).
- LARDY, H.A.; PHILLIPS, P.H. Preservation of spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, v.1, p.219-221, 1939.
- LAUNAY, F. *Etude de la conservation de la semence de Baudet Du poitou*. 1990. 150f. Tese (Doutorado). École Nationale Vétérinaire de Nantes, France.
- LEÃO, K.M. Inseminação artificial por endoscopia com número reduzido de espermatozoides utilizando sêmen fresco e congelado de garanhões. 2002. Tese (Mestrado em). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- LEBLANC, M.M. Effects of oxytocin, prostaglandin and phenylbutazone on uterine clearance of radiocolloid. *Pferdeheilkunde*, v.13, p.483-485, 1997.
- LEBLANC, M.M. *Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment*. Publisher: International Veterinary Information Service. 2003. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 01 de Outubro de 2010.
- LEBLANC, M.M. *Reproduction deduction*. In: THE NAVC, Orlando, Flórida. 2005. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 25 de Novembro de 2010.
- LEIPOLD, S.D.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, P.M. *et al.* Effects of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology*, v.49, p.1537-1543, 1998.
- LEITE, S.V.F. *Influência do número de espermatozoides de jumento (Equus asinus) sobre a taxa de prenhe em éguas (Equus caballus) inseminadas a fresco*. 1994. 52f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.
- LEN, J.A.; JENKINS, J.A.; EILTS, B.E.; *et al.* Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm. *Theriogenology*, v.73, p.225-231, 2010.

- LIMA, M.C.C.; SILVA FILHO, J.M.; CARVALHO, G.R.; *et al.* Efeito do Número de Inseminações Artificiais por Ciclo sobre a Fertilidade de Éguas Inseminadas com Sêmen Equino Diluído, Resfriado a 20°C e Transportado. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29, p.1649-1653, 2000.
- LINDEBERG, H.; KARJALAINEN, H.; KOSKINEN, E. *et al.* Quality of stallion semen obtained by a new semen collection phantom (Equidame®) versus a Missouri® artificial vagina. *Theriogenology*, v.51, p.1157-1173, 1998.
- LINDSEY, A.C.; SCHENK, J.L.; GRAHAM, J.K. *et al.* Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet. J.*, v.34, p.121-127, 2002.
- LOOMIS, P.R.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L. *et al.* Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose egg yolk and package in straws. *J. Anim. Sci.*, v.56, p.687-693, 1983.
- LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding program. *Theriogenology*, v.64, p.480-491, 2005.
- LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L. *et al.* Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, v.63, p.1584-1591, 2005.
- LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; BRINSKO, S.P. *et al.* Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*, v.57, p.1135-1142, 2002.
- LOY, R.G. Characteristics of postpartum reproduction in mares. *Vet. Clin. North Am.-Large Anim. Pract.*, v.2, p. 345-349, 1980.
- LOY, R.G.; BUELL, J.R.; STEVENSON, W. Sources of variation in response intervals after prostaglandin treatment in mares with functional corpora lutea. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 27: 531, 1979.
- LYLE, S.K.; FERRER, M.S. Low-dose insemination - Why, when and how. *Theriogenology*, v.64, p.572- 579, 2005.
- MAGISTRINI, M. Semen evaluation. In: Samper JC. (Ed.). *Equine breeding management and artificial insemination*. Philadelphia: WB Saunders, 2000. p.91-108.
- MAIA, M.S. *Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase*. 2006. 147f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, Oct./Dez. 2009.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A., *et al.* Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.*, v.67, p.1250-1258, 2002.
- MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.*, v.53, p.109-119, 2002.
- MANN, T. Metabolism of semen: fructolysis respiration and sperm energetic. In: MANN, T. (ed). *The Biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. London: Methuen and Co., 1964, p. 265-307.
- MANN, T.; MINOTAKIS, C.S.; POLGE., C. Semen composition and metabolism in the stallion and jackass. *J. Reprod. Fertil.*, v.5, p.109-122, 1963.
- MARTIN, I.C.A. Diluents for the preservation of ram spermatozoa. I. Diluents used at 37°C and 5°C containing casein. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.19, p.645-653, 1966.

- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 27, p.47-51, 1979.
- MATTOS, R.C.; ROCHA, A.; GREGORY, R.M. *et al.* Relação entre aspectos clínicos e taxas de gestação no cio do potro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p.469.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, v.52, p.1353-1362, 1999.
- MAZUR, P. Freezing of having cells mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, v.247, p.251-272, 1984.
- MAZUR, P. Basic concepts in freezing cells. In: 1 INTERNATIONAL CONF. DEEP FREEZING BOAR SEMEN. Proc... Uppsala, Sweden, 1985, p.91-111.
- McCALL, J.P.; SORENSEN, A.M. Evaporated milk as an extender for stallion semen. *AI Digest*, v.12, p.8-10, 1971.
- McCUE, P.M.; HUDSON, J.J.; BRUEMMER, J.E., *et al.* Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. *Proc. Am. Assoc. Equine Prac.*, v.50, p.510-513, 2004.
- McCUE, P.M.; MAGEE, C.; GEE, E.K. Comparison of compounded Deslorelin and hCG for induction of ovulation in mares. *J. Equine Vet. Sci.*, v.27, p.58-61, 2007.
- McDONALD, B.J.; FOULKES, J.A. A spectrofluorometric investigation, using 1-anilinonaphthalen-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fertil.*, v.63, p. 407-414, 1981.
- MCDOWELL, K.J.; POWELL, D.G.; BAKER, C.B. Effect of book size and age of mare and stallion on foaling rates in thoroughbred horses. *J. Equine Vet. Sci.*, v.12, p.364-367, 1992.
- McKINNON, A.O.; NOBELLIUS, A. M.; TARRIDA DEL MARMOL FIGUEROA, S. *et al.* Predictable ovulation in mares treated with an implant of the GnRH analogue deslorelin. *Equine Vet. J.*, v.25, p.321-323, 1993.
- McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; HARRISON, B.S. *et al.* Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: Effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. *J. Am.Vet.Med. Association*, v.192, p.350-353, 1988.
- MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine reproduction*. Baltimore: Williams e Wilkins, 1993. 1137p.
- 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, 327-344, 2002.
- MEDEIROS, A.S.L.; SILVA JÚNIOR, B.L.; MELO, C.M. *et al.* Utilização do extrato de pituitária equina como agente indutor da ovulação em éguas. In: XIX REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 2005. Angra dos Reis. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 30, p. 195, 2005.
- MEINERT, C.; SILVA, J.F.; KROETZ, I. *et al.* Advancing the time of ovulation in the mare with a short-term implant releasing the GnRH analogue deslorelin. *Equine Vet. J.*, v.25, p.65-68, 1993.
- MELO, C.M. Efeito do armazenamento por 24 horas em diferentes sistemas de refrigeração sobre a viabilidade e fertilidade de sêmen congelado equino. 2005. 102f. Tese (Mestrado) - UNESP – Botucatu, 2005.
- MELO, C.M.; PAPA, F.O.; MEDEIROS, A.S.L. *et al.* Efeito da Deslorelina e do extrato de pituitária equina na indução da ovulação em éguas. In: XIX REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 2005. *Acta Sci.Vet.*, v.33, p.193, 2005.
- MELLO, F. G. C. *Efeitos das formas de adição da dimetil formamida ao meio diluidor base na preservação da viabilidade espermática equina pós-descongelamento avaliada in vitro*. 2005. 69f. Tese (Mestrado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte.

- MELLO, S.L.V.; HENRY, M.; SOUZA, M.C. *et al.* Effect of split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserved at 5°C. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.372-378, 2000.
- MERKT, H. Foal heat and embryonic resorption. *Zuchthygiene*, v.1, p.102-108, 1966 apud *Animal Breeding Abstracts*, v. 35, n.2, p. 195. 1967.
- MERKT, H. Exame andrológico e problemas de cobertura no garanhão. Esquema para o exame andrológico. In: ENCONTRO NACIONAL DE EQUIDEOCULTURA, 4, 1986, São Paulo, SP. *Anais...* São Paulo : Sociedade Brasileira de Hipologia, 1986. p.33-34.
- MERKT, H.; GUNZEL, A.R. A survey of early pregnancy losses in West German Thoroughbred mares. *Equine Vet. J.*, v.11, p.256-258, 1979.
- MERKT, H.; KLUG, E.; KRAUSE, D. *et al.* Results of long-term storage of stallion semen frozen by the pellet method. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 23, p.105-106, 1975.
- METCALF, E.S. The effect of postinsemination endometritis on fertility of frozen stallion semen. In: 40TH ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS (AAEP), 2000. *Proc...* San Antonio:[s.n], v.46, p.330-331.
- MIES FILHO, A. *Inseminação artificial*. Porto Alegre: Sulina, 1987. p.
- MIRÓ, J.; LOBO, V.; QUINTERO-MORENO, A.; *et al.* Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology*, v.63, p.1706-1716, 2005.
- MIRÓ, J.; MEDRANO, A.; LOBO, V. *et al.* Primeros resultados para la congelación de semen en el garañón Catalán. In: CONGRESO IBÉRICO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 4., 2003, Araucas. *Proc...* Araucas: 2003, p.87.
- MITCHELL, D.; ALLEN, W.R. Observations on reproductive performance in the yearling mares. *J. Reprod. Fert.*, Suppl.23, p.531-536, 1975.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v.51, n.3, p.241-249, 2005a.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.63, p.2372-2381, 2005b.
- MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. *et al.* Determination of temperature and cool rate induced cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.999-1012, 1992.
- MOREIRA, J.C.G.A. *Inseminação artificial em éguas: estudo da utilização de uma dose reduzida de sêmen congelado em diferentes locais de deposição*, 2010. 65f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- MORRIS, L.H.; ALLEN, E.R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Vet. J.*, v.34, p.51-60, 2002.
- MORRIS, L.H.; TIPLADY, C.; ALLEN, W.R. Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Vet. J.*, v.35, p.197-201, 2003.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. *et al.* Low density lipoprotein extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p.1695-1706, 2002.
- MÜLLER, Z. Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *J.Reprod. Fert. Suppl.*, v.35, p.121-125, 1987.
- MULLER, P.; ERLEMANN, K.R.; MULLER, K. *et al.* Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *Eur. Biophys. J.*, v.27, p.33-41, 1998.
- MURATA, L.S.; ARIKI, J.; MACHADO, C.R. *et al.* Effect of oils sources on blood lipid parameters of commercial laying hens. *Bras. J. Poul. Sci.*, v.5, p.203-206, 2003.

- NAGASE, H. Studies on the freezing of stallion semen. I. Fertility results with stallion semen frozen in concentrated pellets form. II. Factors affecting survival rates of stallion spermatozoa after freezing and thawing and results of a fertility trial. *Anim. Breed. Abst.*, v.35, p.195, 1967.
- NAGASE, H.; GRAHAM, E.F. Pellet semen: comparison of different extenders and processes on fertility of bovine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5, Trento, 1964. *Proc...* Trento: 1964. p. 387-391.
- 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. *Proc...* Trento, 1964. p.410-415.
- NAGASE, H.; SOEJIMA, A.; NIWA, T.; *et al.* Studies on the freezing storage of stallion semen. I. Fertility results of stallion frozen semen in concentrated pellet form. *J. Anim. Reprod.*, v.12, p.48-51, 1966.
- NAGY, P.; HUSZENICZA, G. Y.; JUHÁSZ, J. *et al.* Factors influencing ovarian activity and sexual behavior of postpartum mares under farm conditions. *Theriogenology*, v.50, p.1109-1119, 1998.
- NAMBO, Y.; NAGAOKA, K.; TANAKA, Y. *et al.* Mechanisms responsible for increase in circulating inhibin levels at time ovulation in mares. *Theriogenology*, v. 57, p.1707-1717, 2002.
- NASCIMENTO, J. *Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia e epifluorescência) de espermatozoides equinos criopreservados.* Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, 2006.
- NEILD, D.M.; GADELLA, B.M.; CHAVES, M.G.; *et al.* Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, v.59, p.1693-1705, 2003.
- NEVES NETO, J.R. *Avaliação da congelabilidade e fertilidade do sêmen equino frente a diferentes diluidores.* Botucatu, 1998. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- NEVES NETO, J.R. *Avaliação morfo-funcional e fertilidade de sêmen congelado equino utilizando diferentes diluentes e substâncias crioprotetoras.* 2004. 102f. Tese (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu 2004.
- NISHIKAWA, Y. *Studies on reproduction in horses.* Tokyo: Japan Racing Association, 1959, 340p.
- NISHIKAWA, Y. Studies on preservation of raw and frozen semen. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. 23, p.99-104, 1975.
- NOGUEIRA, C.E.W.; SILVA, C.A.M.; LINS, L.A. *et al.* Avaliação da limpeza uterina na égua após a infusão de carvão. *Ver. Fac. Zootec., Vet. Agron.*, v.14, p. 162-173, 2007.
- NORDBERG J.; ARNÉR E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.*, v.31, p.1287-1312, 2001.
- NUNES, D.B. Container (CP) para refrigeração e preservação do sêmen equino. 2006. 70p. Tese (Mestrado em ciência animal). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2006.
- OHATA, P.M.; BERNARDI, M.L.; REIS, G.R. *et al.* Archives of Veterinary Science v.10, n.1, p.69-74, 2005.

- OLIVEIRA, J.V. *Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumento (Equus asinus) por meio de testes laboratoriais e fertilidade*. 110f. 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". Botucatu, SP.
- OLIVEIRA, R.A. Índice de prenhez com sêmen congelado de garanhões crioulos usando glicerol ou dimetilformamida como crioprotetores. 2007. 47f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- OLIVEIRA, J.V.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M. *et al.* Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, v.94, p. 82-84, 2006.
- OSHIDA, H. Studies on frozen stallion semen III. *Jap. J. Anim. Reprod.*, v.13, p.136-140, 1967.
- OSORIO, J.P. *Efeito da adição fracionada de dimetil formamida e das curvas de congelamento na viabilidade in vitro pós-descongelamento do espermatozoide equino*. 2007. 61f. Tese (Mestrado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte - MG.
- PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk wich protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.*, v.39, p.1144-1149, 1974.
- PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl.23, p.115- 121, 1975.
- PADILLA, A.W.; FOOTE, R.H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, v.69, p.3308–3313, 1991.
- PALHARES, M.S. *Avaliação da atividade ovariana e eficiência reprodutiva de potras e éguas da raça Mangalarga Marchador*. 1989. 89f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- PALHARES, M.S. *Adequação de um novo container para o transporte do sêmen equino diluído e resfriado: I. Características termodinâmicas e funcionais; II. Desempenho reprodutivo das éguas inseminadas*. 1997. 246f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.
- PALHARES, M.S.; SILVA FILHO, J. M.; OLIVEIRA Jr., E. F. *et al.* Inseminação artificial em jumentas da raça Pega com cio induzido pelo Dinoprost. *Rev. Brasil. Reprod. Anim.*, v.10, p.157-163, 1986.
- PALMER, E. Factors affecting stallion sperm survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10, 1984, Urbana. *Proc...* Urbana: University of Illionois, 1984, v.3, abstr. 377.
- PALMER, E. Induction of ovulation. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine reproduction* . Pennsylvania. 1993.
- PAPA, F.O. *Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de equinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial*, 1987. 150f. Tese (Tese Livre Docência em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal, Botucatu, 1987.
- PAPA, F.O.; CAMPOS FILHO, E.P.; ALVARENGA, M.A. Influência da forma de acondicionamento sobre a integridade acrossômica e termo-resistência do sêmen congelado equino. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1991, Belo Horizonte-MG. *Proc....* Belo Horizonte, 1991, p.456.
- PAPA, F.O.; MEIRA, C.; SIMON, J.J. *et al.* Pregnancies in mares using donkey (*Equus asinus*) frozen semen. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.27, p.262, 1999.
- PAPA, F.O.; MELO, C.M.; DELL'AQUA JÚNIOR, J.A.. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. *Acta Sci. Vet.* v.33, p.19-27, 2005.

- PAPA, F.O.; NEVES NETO, J.R.; FERREIRA, J.C.P.; *et al.* A comparative study between the freezability and fertility of stallion semen using different extenders. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. *Proc....* Baltimore, 1998, p.155.
- PAPA, F.O.; SANTOS, T.B.; MACEDO, L.P., *et al.* Influência da distância entre o nível do nitrogênio líquido e as palhetas de sêmen durante o processo de congelamento sobre os parâmetros espermáticos de sêmen de equino. *Rev. Bras .Reprod.Anim.*, v.27, n.3, p.368-370, 2003.
- PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JÚNIOR, J.A. *et al.* Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. *Rev. Bas. Reprod. Anim.*, v.26, p.184-187, 2002.
- PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRE, J.; BARITEAU, F. *et al.* Effectiveness of frozen boar semen under practical conditions of artificial insemination. *Theriogenology*, v.14, p. 217-226, 1980.
- PARINAUD, J.; LE LANNOU, D.; VIEITEZ, G. *et al.* Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. *Hum. Reprod.* v.12, p.2434-2436, 1997.
- PARKER, W.G.; SULLIVAN, J.J.; FIRST, N.L. Sperm transport and distribution in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.23, p.63-66, 1975.
- PARKS, J.E.; EHRENWALD, E. *Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation.* In: BAVISTER, B.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. (Eds). *Fertilization in mammals.* Norwell, Mass: Sero Symposium, 1990. p.155-168.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.
- PARKS, J.E.; MEACHAM, T.N.; SAACHE, R.G. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids and viability at 4°C and 37°C. *Biol. Reprod.*, v.24, p. 399-404, 1981.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.*, v.41, p.683-699, 1989.
- PASCOE, R.R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl.27, p.299-305, 1979.
- PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTEDT, H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology*, v.66, p.307-313, 2006.
- PETTITT, M.J.; BUHR, M.M. Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behavior during cryopreservation. *J. Androl*, v.19, p.736-746, 1998.
- PHILLIPS, P.H. The preservation of bull semen. *J. Biol. Chem.*, v.130, p.415, 1939.
- PIAO, S.; WANG, Y.; CHENG, Y. A study of the technique of freezing concentrated semen of horses (donkeys) and the aspect of insemination. In: XI ICAR Meeting. Dublin: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. 1988.
- PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: A review. *Equine Vet. Sci.*, v.7, p.289-301, 1987.
- PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of Semen. In: MCKINNON, A.O.E; VOSS, J. L. *Equine reproduction*, Malvern: Lea e Febiger, 1993. p. 769-789.
- PICKETT, B.W.; KOMARECK, R.J. Effect of cold shock and freezing on loss of lipid from spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, v.50, p. 753-757, 1966.
- PICKETT, B.W.; SHINER, K.A. Recent developments in artificial insemination in horses. *Liv. Prod. Sci.*, v.40, p.31-36, 1994.

- PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; McKINNON, A.O. *et al.* Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins: Colorado State University Animal Reproduction Laboratory, 1987. 125p. (Bulletin, 03).
- PICKETT, B.W.; VOSS, J.L. The effect of semen extenders and sperm number on mare fertility. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl.23, p.95-98, 1975.
- PIMENTEL, C.A. Aspectos da patologia espermática e a fertilidade no garanhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1989, Belo Horizonte, MG. Anais... Belo Horizonte : CBRA, 1989. V.8, p.127-132.
- PITHA, J.; IRIE, T.; SKLAR, P.B. *et al.* Drug solubilizers to aid pharmacologists: Amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci.*, v.43, p.493-502, 1988.
- POLGE, C.; MINOTAKIS, C. Deep freezing of jackass and stallion semen. In: V ICAR Meeting. Trento: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. p.545-552, 1964.
- POLGE, C.; SMITH, A.; PARKES, A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v.164, p.666, 1949.
- RAJAMAHENDRAN, R.; AMBROSE, J.D.; SCHMITT, E.J. *et al.* Effects of buserelin and deslorelin (GnRH-agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, follicle and corpus luteum dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, v.50, p.1141-1155, 1998.
- REECE, W.O. Fisiologia de animais domésticos. São Paulo: Roca, p.281-311, 1996.
- REGER, H.P.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. *et al.* Effect of timing and placement of cryopreserved semen on fertility of mares. *Equine Vet. Educ.*, v.15, p.101-106, 2003.
- REGHINI, M.F.S.; ULIANI, R.C.; MONTEIRO, G.A. Utilização da n-acetilcisteína na conservação do sêmen equino a 5°C e 15°C. In: XI CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 2010, São Paulo. (Cartaz). Disponível em: www.abraveq.com.br/eventos_prev_06_10_conf_06.php. Acesso em: 12 de julho de 2011.
- REINER, U.R.; YUNES, C.M.; REINER, C. Cio Do Potro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1987, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1988. p. 400-407.
- RETHINASWAMY, A.; YANG, C.-H.; SRIVASTAVA, P.N. Purification and characterization of β -glucuronidase from bull seminal plasma and its role in fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, v.38, 404-409, 1994.
- RIBAS, J.A.S. Influência das estações cheia e seca nas características reprodutivas e seminais de garanhões da raça pantaneira. 2006. 107p. Tese (Doutorado em Produção animal)- Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes - RJ, 2006.
- RIGBY, S.; DERCZO, S.; BRINSKO, S. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, v.46, p.332-334, 2000.
- ROCA J.; HERNA´NDEZ, M.; CARVAJAL, G.J. *et al.* Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.*, v.84, p.2692-2699, 2006.
- ROSER, J.F.; KIEFER, B.L.; EVANS, J.W. *et al.* The development of antibodies to human chorionic gonadotrophin following its repeated injection in the cyclic mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 2, p.173-179, 1979.
- ROSSI, R. *Comparação de dois diluidores na fertilidade de éguas inseminadas com sêmen asinino a fresco ou resfriado.* 2008. 209f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- ROSSI, T.C.; PAPA, F.O.; SANTOS, T.B. *et al.* Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, p.350-352, 2003.
- ROTA, A.; MAGELLI, C.; PANZANI, D. *et al.* Effect of extender, centrifugation and remove of seminal plasma on cooled-preserved Amiat donkey spermatozoa. *Theriogenology*, v.69, p.176-185, 2008.

- ROZAS, A.L.A.G. *Actuaciones para la conservación del asno zamorano-leonés. Inseminación artificial con semen refrigerado y congelado*. 2005. 285f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Facultad de Veterinaria – Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Espanha.
- SALTIEL, A.; GUTIERREZ, A. Cervical endometrial cytology and physiological aspects of postpartum mares. *J. Reprod. Fert.*, v.35, p.305-309, 1987.
- SAMPER, J.C. Stallion semen cryopreservation: Male factors affecting pregnancy rates. In: THE SOCIETY FOR THE STUDY OF THERIOGENOLOGY, San Antonio. *Proc...* p.160, 1995.
- SAMPER, J.C. Ultrasonographic appearance and the use of uterine edema to time ovulation in mares. *Proc. Amer. Assoc. Equine Pract.*, v.43, p.41-43, 1997.
- SAMPER, J.C. *Equine breeding management and artificial insemination*. Philadelphia:W.B. Saunders Company, 2000.
- SAMPER, J.C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, p.219-228, 2001.
- SAMPER, J.C.; GEERTSEMA, H.P. Rate of Luteolysis, Folliculogenesis and interval to ovulation in mares treated with prostaglandin analogue on day 6 or 10 of the estrous cycle. In: 39TH ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS (AAEP). *Proc...* p.169-70, 1993.
- SAMPER, J.C.; HEARN, P.; GANHEIM, A. E. *et al.* Pregnancy rates and effect of extender and motility and acrosome status of frozen-thawed stallion spermatozoa. In: 40TH ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS (AAEP). *Vancouver. Proc...*, p.41-43, 1994.
- SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C.; CRABO, B.G. Relationship between the fertility of fresh and frozen semen and semen quality measured as sperm motility and with glass wool/sephadex filters. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. 44, p.107-114, 1991.
- SAMPER, J.C.; JENSEN, S.; SERGEANT, J. *et al.* Timing of induction of ovulation in mares treated with Ovuplant or Chorulon. *J. Equine Vet. Sci.*, v.22, p.320-323, 2002.
- SANTOS, G.F. *Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre características físicas e morfológicas dos espermatozoides de jumentos (Equus asinus) preservado a 5°C*. 1994. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- SANTOS, J.E.P.; BARTOLOME, J.A.; CERRI, R.L.A. *et al.* Effects of a deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function and reproductive performance of lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.61, p.421-435, 2004.
- SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; NAGY, S. *et al.* Deep freezing of concentrated boar semen for intrauterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, v.63, p.1320-1333, 2005.
- SARAVIA, F. *Cryopreservation of boar semen*. 2008. 63p. Doctoral Thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- SARLOS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M. *et al.* Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet. Hung.* v.50, p.235-245, 2002.
- SCOTT, M.A.; LIU, I.K.M.; OVERSTREET, J.W. Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, v. 41, p.1-2, 1995.
- SENGER, P.L. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2.ed. Moscow: Current Conceptions, 2003. 450p.
- SERRES, C.; RODRÍGUEZ, A.; ALVAREZ, A.L. *et al.* Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leone's donkey semen. *Theriogenology*, v.58, p.329-332, 2002.

- SIEME, H.; KATILA, T.; KLUG, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology*, v. 61, p.769-784, 2004.
- SIEME, H.; SCHAFER, T.; STOUT, T.A. *et al.* The effects of different insemination regimens on fertility in mares. *Theriogenology*, v.60, p.1153-1164, 2003.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl.*, v.25, p.5-18, 2004.
- SILVA, M.I.F. Viabilidade do uso da inseminação artificial em equinos a nível industrial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1987. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1988. p.47-63.
- SILVA, M.I.F. *Alterações morfológicas em útero, tubas e ovários da égua.* 1991. 253f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- SILVA, S.S.; HENRY, M.; NUNES, A.S. *et al.* Influência do sistema de envasamento sobre a qualidade espermática de jumentos (*Equus asinus*) avaliada *in vitro* pós-descongelamento. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.21, p.140-146, 1997.
- SILVA FILHO, J.M. *Aspectos do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial de éguas.* 1994. 497f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- SILVA FILHO, J.M.; FONSECA, F.A.; CARVALHO, G.R. *et al.* Efeito da frequência de inseminações sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen a fresco, diluído. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, 1991. p.366.
- SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; FONSECA, F.A. Transporte e inseminação artificial com sêmen resfriado equino. *Cad. Téc. Med. Vet. Zootec.*, n.11, p.3-112, 1994.
- 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.50, p.563-568, 1998.
- SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; SANTOS, L.M.G. Avaliação de crioprotetores no congelamento de sêmen equino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p. 454-455, 2001.
- SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. *Tecnol. e Ciên. Agropec.*, v.3, p.53-63, 2009
- SQUIRES, E.L. Hormonal manipulation of the mare: a review. *J. Equine Vet. Sci.*, v.28, p.627-634, 2008.
- SQUIRES, E.L.; BARBACINI, S.; NECCHI, D. *et al.* Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. In: 49TH ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS (AAEP). New Orleans. *Proc...*, New Orleans:[s.n], v. 49, p.353-356, 2003.
- SQUIRES, E.L.; BRUBAKER, J.K.; MC CUE, P.M. *et al.* Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*, v.49, p.743-749, 1998.
- SQUIRES, E.L.; COOK, V.M.; VOSS, J.L. Collection and transfer of equine embryos. *Bul. Anim. Reprod.*, v.1, p.1-37, 1985.
- SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K. *et al.* Biology and structure of spermatozoa and their response to cooling. In: *Cooled and frozen stallion semen.* Fort Collins: Colorado State University, 1999. p. 53-60 (College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, n.9).
- SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E. Superovulation. In: Collection and transfer of equine embryos. *Animinal Reproduction and Biotechnology Lab. Bulletin*, n.8, p.32-38, 1995.

- SQUIRES, E.L.; WALLACE, R.A.; VOSS, J.L. *et al.* The effectiveness of PGF2a, HCG, and GnRH for appointment breeding of mares. *J. Equine Vet. Sci.*, v.1, p.5-9, 1981.
- STANTON, M.B.; STEINER, J.V.; PUGH, D.G. Endometrial cysts in the mare. *J. Equine Vet. Sci.*, v.24, p.14-19, 2004.
- STOREY, B.T.; NOILES, E.E.; THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide defined cryoprotectant medium for mouse spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology*, v.37, p.46-58, 1998.
- SUGKRAROEK, P.; MORRIS, K.; LEADER, A. *et al.* Levels of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. *Fertil. Steril.*, v.55, p.820-827, 1991.
- SULLIVAN, J.J., PARKER, W.G., LARSON, L.L. Duration of estrus and ovulation time in non-lactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrous periods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.162, p.895-898, 1973.
- TANNUS, RJ; THUN, R. Influence of endometrial cysts on conception rate of mares. *J. Vet. Med.*, v.42, p.275, 1995.
- TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl.27, p.53-59, 1979.
- TISCHNER, M.; KOSINIAK, K. Techniques for collection and storage of stallion semen with minimal secondary contamination. *Acta Vet. Scand.*, Suppl.88, p.83-90, 1992.
- TISCHNER, M.; KOSINIAK, K.; BIELÁNSKI, W. Analysis of the pattern of ejaculation in stallion. *J. Reprod. Fertil.*, v.41, p.329-335, 1974.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C. *et al.* The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.159-170, 2005.
- TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P.; *et al.* Quail Egg Yolk: A Novel Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Poitou Jackass Sperm. *Cryobiology*, v.34, n.4, p.385-393, 1997.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LELANNOU, D. *et al.* Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. *Theriogenology*, v.45, p.1015-1027, 1996.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D. A procedure for poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology*, v.50, p.793-806, 1998.
- TROEDSSON, M.H.T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, v.52, p.461-471, 1999.
- TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; CRABO, B.G. Sperm transport and survival in the mare. *Theriogenology*, v.49, p.905-915, 1998.
- VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, p.47-53, 2007.
- VALLE, G.R. *Efeito da rufiação e manipulação do sistema genital e transporte de sêmen, em container "Celle" modificado, na avaliação da técnica de inseminação artificial em equinos.* 1997. 349f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.
- VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M. Membrana plasmática do espermatozoide. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.36, p.45-53, 2002.
- VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; OLIVEIRA, H.N. *et al.* Efeito da idade sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado a 14°C e transportado. *Rev. Bras. Zootec.*, v.28, p.1031-1036, 1999.
- VANDERWALL, D.K. The challenges of using frozen semen in horse breeding. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1997, Canadá. *Proceeding...* Canadá: Society for *Theriogenology*, 1997, p.178-179.

- VANDERWALL, D. K., JUERGENS, T. D., WOODS, G. L. Reproductive performance of commercial broodmares after induction of ovulation with hCG or Ovuplant™ (deslorelin). *J. Equine Vet. Sci.*, v.21, p.539-542, 2001.
- VANDERWALL, D.K. Early embryonic loss in the mare. *J. Equine Vet. Sci.*, v.28, p.691-702, 2008.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L. *et al.* Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v.28, p.709-723, 1987.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, J.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5°C or 20°C. *Theriogenology*, v.32, p.515-525, 1989.
- VARNER, D.D.; BOWEN, J.A.; JOHNSON, L. Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm. *Arch. Androl.*, v.31, p.199-207, 1993.
- VAZQUEZ, J. J. *et al.* Nonsurgical uterotubal insemination in the mare. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. *Proceedings...* Baltimore: Society for Theriogenology, 1998. p.82-83.
- VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.115-136, 2005.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P. *et al.* Equine frozen semen: freezability and 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 post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p.907-919, 2000.
- 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. Reprod. Sci.*, n.1, v.112, p.22-35, 2009.
- VIDAMENT, M.; VICENT, P.; YVON, J. M. *et al.* Glycerol in semen extender is a limiting factor in the fertility in asinine and equine species. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p. 302-305, 2005.
- VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I.; *et al.* Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, p.201-218, 2001.
- VIEIRA, R.C.; ARRUDA, R.P.; MANZANO, A. Inseminação intracornual de equídeos com sêmen congelado em palhetas de 0.5 mL. In: Anais da XXII Reunião Anual da SBZ, Balneário Camburiú, SC, 298 pp, 1985.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Anim. Reprod. Sci.*,
- VOLKMANN, D. *Management of mares during foal heat for optimal reproductive performance.* 2006. Disponível em: <www.avis.org/proceedings/avef/2006/volkmann2.pdf>. Acesso em 16 de Maio de 2011.
- VON LEPEL, J. Maintenance of fertility in the horse including artificial insemination. *Equine Vet. J.*, v.7, p.97-101, 1975.
- VOSS, J.L.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. *et al.* Effect of number and frequency of inseminations of fertility of mares. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl.32, p.53-57, 1982
- WAELECHLI, R.O. Endometrial biopsy in mares under non uniform breeding management conditions: prognostic value and relationship with age. *Can. Vet. J.*, v.31, p.379-384, 1990.
- WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. In: FINN, C.A. *Oxford reviews of reproductive biology.* New York: Oxford Univ Press. v.1, 1979. p.283-330.
- WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.J.; CLARKE, A. (Eds.). *Effects of low temperatures on biological membranes.* London: Academic Press, 1981. p.189-218.

- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, p. 871-91, 1995.
- WATSON, P.F., MORRIS, G.J. Cold shock injury in animal cells. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, v.41, p.311-340, 1987.
- WEITZE, K.F.; RATH, D.; BARON, G. New aspects of preservation of boar sperm by deep freezing in plastic tubes. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, v.94, p.485-486, 1987.
- WESSON, J.A.; GINTHER, O.J. Influence of season and age on reproductive activity in pony mares on the basis of a slaughterhouse survey. *J. Anim. Sci.* v.52, p.119-129, 1981.
- WOODS, G.L.; BAKER, C.B.; BALDWIN J.L. *et al.* Early pregnancy loss in brood mares. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. 35, p.455-459, 1987.
- WOODS, G.L.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Effect of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares. *Equine Vet. J.*, v.22, p.410-415, 1990.
- WOODS, G.L., GINTHER, O.J. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. *Theriogenology*, v.20, p.347-375, 1983.
- WOODS, J., RIGBY, S., BRINSKO, S. *et al.* Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E2 prior to insemination of mares in the uterine horn or body. *Theriogenology*, v.53, p.1827- 1836, 2000.
- XAVIER, I.L.G.S. *Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen a fresco diluído, no corpo ou ápice do corno uterino, utilizando diferentes números de espermatozoides por dose inseminante*. 2006. 86f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- YANCEY, P.G.; RODRIGUES, W.V.; KILSDONK, E.P.C. *et al.* Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins: Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chemistry*, v.271, p.16026-16034, 1996.
- YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M. *et al.* Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, v.54, p.579-585, 2000.
- ZAHN, F.S; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JÚNIOR, J.A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology*, v.58, p.237-240, p.2002.
- ZILBERSTEIN, ZAKUT, M., H., NAOR, Z. Coincidence of down-regulation and desensitization in pituitary gonadotrophs stimulated by gonadotropin releasing hormone. *Life Sci.*, v.32, p.663-669, 1983.
- ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology*, v.55, p.922-926, 2000.

8. ANEXOS

Anexo 8.1. Ficha Individual de Coleta de Sêmen

Reprodutor: _____ Data: _____ Ejaculado n°: _____

Hora coleta: _____ N° montas/ejaculado: _____

Volume: _____ ml

- Avaliação:

	Motilidade (%)	Vigor
Fresco		
Diluído LG		
Pós-adição de D2		

- Concentração espermática:

$\frac{\text{1}^{\circ}\text{C}}{\text{1}^{\circ}\text{C}} + \frac{\text{2}^{\circ}\text{C}}{\text{2}^{\circ}\text{C}} = \frac{\text{2}}{\text{2}} = \text{1} \times 20 = \text{20} \times 10^6 \text{ sptz/ml}$

- móveis/ml = $\frac{\text{[]}}{\text{[]}} \times \frac{\text{Mot}}{\text{Mot}} = \text{[]} \times 10^6 \text{ sptz móveis/ml}$

- móveis totais = $\frac{\text{Móveis/ml}}{\text{Vol.}} \times \text{Vol.} = \text{[]} \times 10^6 \text{ sptz móveis}$

- N° doses = $\frac{\text{móveis totais}}{1000 \times 10^6} = \text{[]} = \text{[]}$

- Volume total (ml) = $\frac{\text{[]}}{\text{n}^{\circ} \text{ doses}} \times 5 = \text{[]} \text{ ml}$

- Vol. Diluidor = $\frac{\text{Vol. Total}}{\text{Vol. sêmen}} - \text{[]} = \text{[]} : 2 = \text{[]} \text{ ml}$

D1 = $\text{[]} - \text{[]} = \text{[]} \text{ ml}$

D2 = $\text{[]} \text{ ml}$

- Hora diluição: _____ (D1) / _____ (D1) / _____ (D2)

- Hora resfriamento: _____ - Vol. Água: _____ ml

- Hora congelamento: _____

- Observações:

Anexo 8.2. Ficha de controle reprodutivo individual das éguas.

Égua: _____ Idade: _____ Data do
 Parto: _____ Sexo do produto:
 Reprodutor: _____ Experimento: _____ Tratamento: _____

Inseminações:

Data									
Horário									

Data									
Cio									
Útero/ cérvix									
Ovário Direito									
Ovário Esquerdo									

DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

DATA	ACHADOS

8.3. Análises Estatísticas Referentes ao Experimento I – Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento rápida.

8.3.1. Análises estatísticas referentes à tabela 4.1.

Análise 1. Comparação do número de montas para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	0,2667	0,0667	1,00	0,4516
Erro	10	0,6667	0,0667		
Total	14	0,9333			
CV: 24,21					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	1,00	0,15	0,0001		
2	1,00	0,15	0,0001		
3	1,33	0,15	0,0001		
4	1,00	0,15	0,0001		
5	1,00	0,15	0,0001		

Análise 2. Comparação da motilidade para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	0,0139	0,0035	1,12	0,4017
Erro	10	0,0311	0,0031		
Total	14	0,0449			
CV: 4,41					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	88,33	1,83	0,0001		
2	91,67	1,83	0,0001		
3	90,00	1,83	0,0001		
4	90,00	1,83	0,0001		
5	93,33	1,83	0,0001		

Análise 3. Comparação do número de espermatozoides/mL, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	244093,3333	61023,3333	0,37	0,8233
Erro	10	1639600,0000	163960,0000		
Total	14	1883693,3333			
CV: 40,47					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	993,33	233,78	0,0017		
2	1003,33	233,78	0,0016		
3	846,67	233,78	0,0047		
4	1230,00	233,78	0,0004		
5	930,00	233,78	0,0026		

Análise 4. Comparação do número de espermatozoides móveis/mL, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	230385,4333	57596,3583	0,38	0,8174
Erro	10	1512124,0000	151212,4000		
Total	14	1742509,4333			
CV: 42,50					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	878,17	224,51	0,0029		
2	922,83	224,51	0,0021		
3	762,00	224,51	0,0068		
4	1139,00	224,51	0,0005		
5	872,67	224,51	0,0030		

Análise 5. Comparação do volume do diluidor 1, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	875,1273	218,7818	3,21	0,0614
Erro	10	681,9467	68,1947		
Total	14	1557,0740			
CV: 34,52					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	16,75	4,77	0,0056		
2	32,22	4,77	0,0001		
3	22,13	4,77	0,0009		
4	15,08	4,77	0,0101		
5	33,42	4,77	0,0001		

Análise 6. Comparação do volume do diluidor 2, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	875,1273	218,7818	3,21	0,0614
Erro	10	681,9467	68,1947		
Total	14	1557,0740			
CV: 34,52					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	16,75	4,77	0,0056		
2	32,22	4,77	0,0001		
3	22,13	4,77	0,0009		
4	15,08	4,77	0,0101		
5	33,42	4,77	0,0001		

Análise 7. Comparação da taxa de diluição, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	3,8557	0,9639	0,32	0,8577
Erro	10	30,0462	3,0046		
Total	14	33,9019			
CV: 48,85					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	3,19	1,00	0,0097		
2	3,33	1,00	0,0076		
3	3,33	1,00	0,0076		
4	4,56	1,00	0,0011		
5	3,33	1,00	0,0077		

Análise 8. Comparação da concentração espermática da dose inseminante, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	76965,5774	19241,3943	1,25	0,3529
Erro	10	154530,1168	15453,0116		
Total	14	231495,6942			
CV: 12,60					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	1045,89	71,77	0,0001		
2	1039,68	71,77	0,0001		
3	849,25	71,77	0,0001		
4	996,63	71,77	0,0001		
5	1005,56	71,77	0,0001		

Análise 9. Comparação do tempo coleta pré-diluição, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	3,7333	0,9333	0,64	0,6482
Erro	10	14,6667	1,4667		
Total	14	18,4000			
CV: 37,84					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	3,66	0,70	0,0004		
2	3,33	0,70	0,0008		
3	3,66	0,70	0,0004		
4	2,33	0,70	0,0075		
5	3,00	0,70	0,0016		

Análise 10. Comparação do tempo coleta resfriamento, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	7,6000	1,9000	0,48	0,7482
Erro	10	39,3333	3,9333		
Total	14	46,9333			
CV: 33,42					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	6,33	1,15	0,0003		
2	5,33	1,15	0,0009		
3	7,00	1,15	0,0001		
4	5,00	1,15	0,0014		
5	6,00	1,15	0,0004		

Análise 11. Comparação do tempo coleta à diluição final, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	9394,9333	2348,7333	0,67	0,6260
Erro	10	34934,0000	3493,4000		
Total	14	44328,9333			
CV: 26,35					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	205,00	34,12	0,0001		
2	232,33	34,12	0,0001		
3	266,67	34,12	0,0001		
4	194,33	34,12	0,0002		
5	223,00	34,12	0,0001		

Análise 12. Comparação do tempo coleta ao resfriamento, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	9394,9333	2348,7333	0,67	0,6260
Erro	10	34934,0000	3493,4000		
Total	14	44328,9333			
CV: 33,42					
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	260,67	37,44	0,0001		
2	272,33	37,44	0,0001		
3	308,33	37,44	0,0001		
4	235,00	37,44	0,0001		
5	282,00	37,44	0,0001		

Análise 13. Comparação do tempo coleta ao congelamento, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	8751,3333	2187,8333	0,52	0,7232
Erro	10	42052,0000	4205,2000		
Total	14	50803,3333			
CV: 23,87					

Análise 14. Comparação do número real de doses, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	251,6000	62,9000	4,69	0,0216
Erro	10	134,0000	13,4000		
Total	14	385,6000			
CV: 29,52					

Jumentos	SNK grouping
1	ab
2	a
3	ab
4	b
5	a

Jumento	Média	Erro padrão	p
1	9,00	2,11	0,0017
2	17,00	2,11	0,0001
3	11,33	2,11	0,0003
4	7,33	2,11	0,0060
5	17,33	2,11	0,0001

Análise 15. Comparação do número potencial de doses, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	260,4000	65,1000	3,78	0,0399
Erro	10	172,0000	17,2000		
Total	14	432,4000			
CV: 33,99					

Jumentos	Duncan grouping
5	a
2	a
3	ab
1	b
4	b

Jumento	Média	Erro padrão	p
1	9,00	2,39	0,0037
2	17,00	2,39	0,0001
3	10,33	2,39	0,0015
4	7,33	2,39	0,0120
5	17,33	2,39	0,0001

Análise 16. Comparação do número de espermatozoides móveis/ejaculado, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	280757636,1307	70189409,0326	4,20	0,0299
Erro	10	167070138,1333	16707013,8133		
Total	14	447827774,2640			
CV: 32,63					
Jumentos			Duncan grouping		
	5			a	
	2			a	
	3			ab	
	1			b	
	4			b	
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	9383,00	2359,87	0,0026		
2	17615,87	2359,87	0,0001		
3	10490,40	2359,87	0,0012		
4	7393,00	2359,87	0,0106		
5	17751,83	2359,87	0,0001		

Análise 17. Comparação do volume do ejaculado, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	461,2693	115,3173	4,74	0,0210
Erro	10	243,4200	24,3420		
Total	14	704,6893			
CV: 33,73					
Jumentos			Duncan grouping		
	5			a	
	2			a	
	3			ab	
	1			ab	
	4			b	
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	11,50	2,85	0,0024		
2	20,57	2,85	0,0001		
3	12,90	2,85	0,0011		
4	6,83	2,85	0,0374		
5	21,33	2,85	0,001		

Análise 18. Comparação do número de espermatozoides totais, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	310961400,9333	77740350,2333	3,8	0,0397
Erro	10	204837118,6666	20483711,8666		
Total	14	515798519,6000			
CV: 33,73					
Jumentos			SNK grouping		
	5			a	
	2			a	
	3			ab	
	1			ab	
	4			b	
Jumento	Média	Erro padrão	p		
1	10636,67	2613,03	0,0022		
2	19304,33	2613,03	0,0001		
3	11656,00	2613,03	0,0012		
4	8156,67	2613,03	0,0108		
5	18988,33	2613,03	0,0001		

Análise 19. Comparação do vigor espermático, para os jumentos, no experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	2,7667	0,6917	10,37	0,0014
Erro	10	0,6667	0,0667		
Total	14	3,4333			
CV: 6,05					

Análise 20. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 3 e 5

Jumento	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
3	3	6,0	10,50	2,12	2,0
5	3	15,0	10,50	2,12	5,0
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	6,00	-1,88	0,0593		

Análise 21. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 3 e 4

Jumento	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
3	3	7,0	10,5	2,12	2,33
4	3	14,0	10,5	2,12	4,66
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	7,00	-1,41	0,1573		

Análise 22. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 3

Jumento	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	3	14,5	10,5	2,19	4,83
3	3	6,5	10,5	2,19	2,16
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	14,5		1,59	0,1101	

Análise 23. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 3

Jumento	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	3	14,0	10,5	2,12	4,66
3	3	7,0	10,5	2,12	2,33
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	14,0		1,41	0,1573	

Análise 24. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 4 e 5

Jumento	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
4	3	6,0	10,5	2,12	2,0
5	3	15,0	10,5	2,12	5,0
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	6,0		-1,88	0,0593	

Análise 25. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 5

Jumento	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	3	6,0	10,5	2,12	2,0
5	3	15,0	10,5	2,12	5,0
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	6,0		-1,88	0,0593	

Análise 26. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 5

Jumento	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	3	6,0	10,5	2,12	2,0
5	3	15,0	10,5	2,12	5,0
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	6,0		-1,88	0,0593	

Análise 27. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 4

Jumento	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	3	12,0	10,5	2,01	4,0
4	3	9,0	10,5	2,01	3,0
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	12,0		0,49	0,6193	

Análise 28. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 4

Jumento	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	3	10,5	10,5	1,89	3,5
4	3	10,5	10,5	1,89	3,5
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		10,5	0	1,0000	

Análise 29. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 2

Jumento	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	3	9,0	10,5	2,01	3,0
2	3	12,0	10,5	2,01	4,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		9,0	-0,49	0,6193	

8.3.2. Análises estatísticas referentes às tabelas 4.3 e 4.4.

Análise 30. Comparações dos valores de motilidade espermática no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen, para o experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	19	21,7976	1,1472	80,17	0,0001
Erro	76	1,0875	0,0143		
Total	95	22,8851			
CV: 15,56					
Jumentos x tempos	SNK grouping	Jumentos x tempos	SNK grouping		
Fresco 5	A	Fresco 1	a		
Pré-diluído 5	A	Pré-diluído 1	a		
Pré-diluído 2	A	Pós-diluído 3	a		
Fresco 2	A	Pós-diluído 1	a		
Fresco 4	A	Pós-diluído 4	a		
Pós-diluído 2	A	Descongelado 4	b		
Pré-diluído 4	A	Descongelado 5	c		
Pré-diluído 3	A	Descongelado 3	c		
Fresco 3	A	Descongelado 2	c		
Pós-diluído 5	A	Descongelado 1	c		

Análise 31. Comparações dos valores de vigor espermático no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen, para o experimento 1

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	19	180,0714	9,4774	17,33	0,0001
Erro	76	41,5535	0,5467		
Total	95	221,6250			
CV: 15,56					

Análise 32. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos, para o experimento 1.

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
Descongelado	12	98,0	132,0	13,68	8,17
Fresco	3	41,0	33,0	9,67	13,67
Pós-dil.	3	35,0	33,0	9,67	11,67
Pré-dil.	3	57,0	33,0	9,67	19,00
Teste		GL		p	
Kruskal-Wallis		3		0,0359	

Análise 33. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos fresco e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
Fresco	3	6,5	10,5	2,19	2,17
Pré-Dil.	3	14,5	10,5	2,19	4,83
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		6,5	-1,59	0,1101	

Análise 34. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos fresco e pós-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
Fresco	3	11,5	10,5	2,12	3,83
Pós-Dil.	3	9,5	10,5	2,12	3,17
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		11,5	0,23	0,8137	

Análise 35. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e fresco

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	12	85,0	96,0	6,64	7,08
fresco	3	35,0	24,0	6,64	11,67
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		35,0	1,58	0,1137	

Análise 36. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos pós-diluído e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
Pós-diluído	3	6,5	10,5	2,22	2,17
Pré-diluído	3	14,5	10,5	2,22	4,83
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		6,5	-1,57	0,1157	

Análise 37. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	12	80,0	96,0	6,77	6,67
Pré-diluído	3	40,0	24,0	6,77	13,33
Teste	S		Z	P > Z 	
Wilcoxon	40,0		2,28	0,0221	

Análise 38. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e pós-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	12	89,0	96,0	6,67	7,41
Pós-diluído	3	31,0	24,0	6,67	10,33
Teste	S		Z	P > Z 	
Wilcoxon	31,0		0,97	0,3298	

Análise 39. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos, para o exp.1

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
Descongelado	10	55,0	100,0	11,87	5,5
Fresco	3	37,5	30,0	8,67	12,5
Pós-dil.	3	43,5	30,0	8,67	14,5
Pré-dil.	3	54,0	30,0	8,67	18,0
Teste	GL		P		
Kruskal-wallis	3		0,0012		

Análise 40. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos pós-diluído e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
pós-diluído	3	6,0	10,5	2,12	2,0
pré-diluído	3	15,0	10,5	2,12	5,0
Teste	S		Z	P > Z 	
Wilcoxon	6,0		-1,88	0,0593	

Análise 41. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos fresco e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
fresco	3	6,0	10,5	2,22	2,0
pré-diluído	3	15,0	10,5	2,22	5,0
Teste	S		Z	P > Z 	
Wilcoxon	6,0		-1,79	0,0722	

Análise 42. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	10	55,0	70,0	5,42	5,5
pré-diluído	3	36,0	21,0	5,42	12,0
Teste	S		Z	P > Z 	
Wilcoxon	36,0		2,67	0,0075	

Análise 43. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos fresco e pós-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
fresco	3	7,5	10,5	1,89	2,5
pós-diluído	3	13,5	10,5	1,89	4,5
Teste	S		Z	P > Z 	
Wilcoxon	7,5		-1,31	0,1876	

Análise 44. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e pós-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	10	55,0	70,0	5,39	5,5
pós-diluído	3	36,0	21,0	5,39	12,0
Teste	S		Z	P > Z 	
Wilcoxon	36,0		2,68	0,0072	

Análise 45. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e fresco

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	10	55,0	70,0	5,42	5,5
fresco	3	36,0	21,0	5,42	12,0
Teste	S		Z	P > Z 	
Wilcoxon	36,0		2,67	0,0075	

Análise 46. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos, para o exp.1

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
Descongelado	7	28,0	59,5	9,02	4,0
Fresco	3	40,5	25,5	7,09	13,5
Pós-dil.	3	31,5	25,5	7,09	10,5
Pré-dil.	3	36,0	25,5	7,09	12,0
Teste	GL			P	
Kruskal-wallis	3			0,0050	

Análise 47. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos fresco e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
fresco	3	12,0	10,5	1,5	4,0
pré-diluído	3	9,0	10,5	1,5	3,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		12,0	0,67	0,5050	

Análise 48. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos fresco e pós-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
fresco	3	13,5	10,5	1,89	4,5
pós-diluído	3	7,5	10,5	1,89	2,5
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		13,5	1,31	0,1876	

Análise 49. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos descongelado e fresco

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	7	28,0	38,5	4,04	4,0
fresco	3	27,0	16,5	4,04	9,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		27,0	2,47	0,0133	

Análise 50. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos pós-diluído e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
pós-diluído	3	9,0	10,5	2,01	3,0
pré-diluído	3	12,0	10,5	2,01	4,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		9,0	-0,49	0,6193	

Análise 51. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos descongelado e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	7	28,0	38,5	4,08	4,0
pré-diluído	3	27,0	16,5	4,08	9,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		27,0	2,44	0,0144	

Análise 52. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos descongelado e pós-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	7	28,0	38,5	4,08	4,0
pós-diluído	3	27,0	16,5	4,08	9,0
Teste	S		Z	P > Z 	
Wilcoxon	27,0		2,44	0,0144	

Análise 53. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos, para o exp.1

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
Descongelado	10	55,0	100,0	12,12	5,5
Fresco	3	45,0	30,0	8,86	15,0
Pós-dil.	3	42,5	30,0	8,86	14,17
Pré-dil.	3	47,5	30,0	8,86	15,83
Teste	GL		P		
Kruskal-wallis	3		0,0030		

Análise 54. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos pós-diluído e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
pós-diluído	3	9,0	10,5	2,22	3,0
pré-diluído	3	12,0	10,5	2,22	4,0
Teste	S	Z	P > Z 		
Wilcoxon	9,0	-0,45	0,6531		

Análise 55. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos fresco e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
fresco	3	9,5	10,5	2,12	3,17
pré-diluído	3	11,5	10,5	2,12	3,83
Teste	S	Z	P > Z 		
Wilcoxon	9,5	-0,24	0,8137		

Análise 56. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	10	55,0	70,0	5,81	5,50
pré-diluído	3	36,0	21,0	5,81	12,0
Teste	S	Z	P > Z 		
Wilcoxon	36,0	2,50	0,0126		

Análise 57. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos fresco e pós-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
fresco	3	11,5	10,5	2,22	3,83
pós-diluído	3	9,5	10,5	2,22	3,17
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		11,5	0,22	0,8222	

Análise 58. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e pós-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	10	55,0	70,0	5,81	5,5
pós-diluído	3	36,0	21,0	5,81	12,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		36,0	2,50	0,0126	

Análise 59. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e fresco

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	10	55,0	70,0	5,81	5,5
fresco	3	36,0	21,0	5,81	12,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		36,0	2,50	0,0124	

Análise 60. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos, para o exp.1

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
Descongelado	12	78,00	132,0	13,72	6,5
Fresco	3	44,50	33,0	9,70	14,8
Pós-dil.	3	52,50	33,0	9,70	17,5
Pré-dil.	3	56,00	33,0	9,70	18,67
Teste			GL	P	
Kruskal-wallis			3	0,0011	

Análise 61. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos pós-diluído e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
pós-diluído	3	9,0	10,5	1,5	3,0
pré-diluído	3	12,0	10,5	1,5	4,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		9,0	-0,67	0,5050	

Análise 62. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos fresco e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
fresco	3	7,0	10,5	2,12	2,33
pré-diluído	3	14,0	10,5	2,12	4,67
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		7,0	-1,41	0,1573	

Análise 63. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e pré-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	12	78,0	96,0	6,67	6,5
pré-diluído	3	42,0	24,0	6,67	14,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		42,0	2,62	0,0087	

Análise 64. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos fresco e pós-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
fresco	3	7,5	10,5	1,90	2,5
pós-diluído	3	13,5	10,5	1,90	4,5
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		7,5	-1,31	0,1876	

Análise 65. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e pós-diluído

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	12	78,0	96,0	6,65	6,5
pós-diluído	3	42,0	24,0	6,65	14,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		42,0	2,63	0,0085	

Análise 66. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e fresco

Tempo	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
descongelado	12	78,0	96,0	6,67	6,5
fresco	3	42,0	24,0	6,67	14,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		42,0	2,62	0,0087	

Análise 67. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre jumentos

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	3	21,5	24,0	6,61	7,17
2	3	26,5	24,0	6,61	8,83
3	3	8,5	24,0	6,61	2,83
4	3	21,5	24,0	6,61	7,17
5	3	42,0	24,0	6,61	14,0
Teste		GL		P	
Kruskal-Wallis		4		0,0305	

Análise 68. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 5

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	3	6,0	10,5	2,12	2,0
5	3	15,0	10,5	2,12	5,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		6,0	-1,88	0,0593	

Análise 69. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 4 e 5

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
4	3	6,0	10,5	2,12	2,0
5	3	15,0	10,5	2,12	5,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		6,0	-1,88	0,0593	

Análise 70. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 5

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	3	6,0	10,5	2,12	2,0
5	3	15,0	10,5	2,12	5,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		6,0	-1,88	0,0593	

Análise 71. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 3 e 5

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
3	3	6,0	10,5	2,12	2,0
5	3	15,0	10,5	2,12	5,0
Teste		S	Z	P > Z 	
Wilcoxon		6,0	-1,88	0,0593	

Análise 72. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 4

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	3	12,0	10,5	2,01	4,0
4	3	9,0	10,5	2,01	3,0
Teste		S	Z	P > Z	
Wilcoxon		12,0	0,49	0,6193	

Análise 73. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 2

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	3	9,0	10,5	2,01	3,0
2	3	12,0	10,5	2,01	4,0
Teste		S	Z	P > Z	
Wilcoxon		9,0	-0,49	0,6193	

Análise 74. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 3

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	3	14,5	10,5	2,19	4,83
3	3	6,5	10,5	2,19	2,17
Teste		S	Z	P > Z	
Wilcoxon		14,5	1,59	0,1101	

Análise 75. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 4

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	3	10,5	10,5	1,89	3,5
4	3	10,5	10,5	1,89	3,5
Teste		S	Z	P > Z	
Wilcoxon		10,5	0	1,0000	

Análise 76. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 3 e 4

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
3	3	7,0	10,5	2,12	2,33
4	3	14,0	10,5	2,12	4,67
Teste		S	Z	P > Z	
Wilcoxon		7,0	-1,41	0,1573	

Análise 77. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 3

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	3	14,0	10,5	2,12	4,67
3	3	7,0	10,5	2,12	2,33
Teste		S	Z	P > Z	
Wilcoxon		14,0	1,41	0,1573	

Análise 78. Comparação do vigor espermático no tempo pré-diluição entre jumentos

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	3	22,0	24,0	6,20	7,33
2	3	18,0	24,0	6,20	6,00
3	3	22,0	24,0	6,20	7,33
4	3	29,0	24,0	6,20	9,67
5	3	29,0	24,0	6,20	9,67
Teste			GL	P	
Kruskal-Wallis			4	0,7434	

Análise 79. Comparação do vigor espermático no tempo pós-diluição entre jumentos

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	3	31,5	24,0	6,56	10,5
2	3	21,0	24,0	6,56	7,0
3	3	15,0	24,0	6,56	5,0
4	3	17,0	24,0	6,56	5,67
5	3	35,5	24,0	6,56	11,83
Teste			GL	P	
Kruskal-Wallis			4	0,1935	

Análise 80. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre jumentos

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	12	158,5	312,0	43,7	13,21
2	10	205,0	260,0	40,9	20,50
3	10	258,5	260,0	40,9	25,85
4	12	520,5	312,0	43,7	43,38
5	7	183,5	182,0	35,5	26,21
Teste			GL	P	
Kruskal-Wallis			4	0,0001	

Análise 81. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 4 e 5

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
4	12	155,50	120,0	11,49	12,96
5	7	34,50	70,0	11,49	4,93
Teste		S	Z	P > Z	
Wilcoxon		34,5	-3,05	0,0023	

Análise 82. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 3 e 4

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
3	10	63,5	115,0	14,67	6,35
4	12	189,5	138,0	14,67	15,79
Teste		S	Z	P > Z	
Wilcoxon		63,5	-3,48	0,0005	

Análise 83. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 4

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	10	62,0	115,0	14,97	6,20
4	12	191,0	138,0	14,97	15,92
Teste		S	Z	P > Z	
Wilcoxon		62,0	-3,51	0,0005	

Análise 84. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 4

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	12	81,5	150,0	17,05	6,79
4	12	218,5	150,0	17,05	18,21
Teste		S	Z	P > Z	
Wilcoxon		81,5	-3,99	0,0001	

Análise 85. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 3 e 5

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
3	10	89,5	90,0	8,18	8,95
5	7	63,5	63,0	8,18	9,07
Teste		S	Z	P > Z	
Wilcoxon		63,5	0	1,0000	

Análise 86. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 5

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	10	82,0	90,0	9,75	8,2
5	7	71,0	63,0	9,75	10,1
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	71,0		0,77	0,4418	

Análise 87. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 5

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	12	91,5	120,0	11,17	7,63
5	7	98,5	70,0	11,17	14,07
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	98,5		2,51	0,0122	

Análise 88. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 3

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	10	95,0	105,0	12,49	9,5
3	10	115,0	105,0	12,49	11,5
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	95,0		-0,76	0,4470	

Análise 89. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 3

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	12	97,5	138,0	14,26	8,13
3	10	155,5	115,0	14,26	15,6
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	155,5		2,8	0,0050	

Análise 90. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 2

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	12	122,0	138,0	14,32	10,17
2	10	131,0	115,0	14,32	13,10
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	131,0		1,08	0,2792	

8.3.3. Análises estatísticas referentes às tabelas 4.6 e 4.7

Análise 91. Compara motilidade e vigor por avaliador ao descongelamento no experimento 1

<i>Variável</i>	<i>N</i>	<i>Média</i>	<i>Erro</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>CV</i>
Motilidade	51	16,08	2,43	0	60,0	107,97
Vigor	51	2,11	0,18	0	5,0	61,91

Análise 92. Compara a motilidade entre avaliadores ao descongelamento no experimento 1

Avaliador	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Variância	T	GL	prob> T
1	22	0,37	0,28	0,06	Desigual	0,47	42,3	0,6373
2	29	0,33	0,25	0,05	Igual	0,48	49,0	0,6315
Para Ho: variâncias são iguais, F' = 1,26 GL = 21,28 Prob>F' = 0,5550								

Análise 93. Comparação do vigor espermático entre os avaliadores, ao descongelamento

Avaliadores	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	22	625,50	572,0	51,04	28,43
2	29	700,50	754,0	51,04	24,16
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	625,5	1,04	0,2990		

Análise 94. Comparação da motilidade espermática ao descongelamento

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	9	2,48	0,28	13,09	0,0001
Erro	41	0,86	0,02		
Total	50	3,34			
CV: 41,90					
Jumentos			SNK grouping		
4			a		
5			b		
3			b		
2			c		
1			c		

Análise 95. Motilidade ao descongelamento por jumento e tipo de envase

Jumento	Tipo de envase	Motilidade	Erro	P
1	FLATPACK	7,50	3,44	0,0350
1	Palheta	1,67	3,44	0,6305
2	FLATPACK	5,00	3,44	0,1535
2	Palheta	5,00	4,21	0,2419
3	FLATPACK	9,17	3,44	0,0109
3	Palheta	12,50	4,21	0,0050
4	FLATPACK	36,67	3,44	0,0001
4	Palheta	48,33	3,44	0,0001
5	FLATPACK	17,50	4,21	0,0002
5	Palheta	10,00	4,86	0,0461

Análise 96. Motilidade ao descongelamento por jumento

<i>Jumento</i>	<i>Motilidade</i>	<i>Erro</i>	<i>P</i>
1	4,58	2,43	0,0665
2	5,00	2,72	0,0731
3	10,83	2,72	0,0003
4	42,50	2,43	0,0001
5	13,75	3,22	0,0001

Análise 97. Motilidade ao descongelamento por tipo de envase

<i>Tipo de envase</i>	<i>Motilidade</i>	<i>Erro</i>	<i>P</i>
FLATPACK	15,17	1,61	0,0001
Palheta	15,50	1,82	0,0001

Análise 98. Comparação do vigor espermático ao descongelamento

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	9	51,97	5,77	7,13	0,0001
Erro	41	33,19	0,81		
Total	50	85,16			
CV: 42,68					

Análise 99. Vigor espermático ao descongelamento por jumento e tipo de envase

<i>Jumento</i>	<i>Tipo de envase</i>	<i>Vigor</i>	<i>Erro</i>	<i>P</i>
1	FLATPACK	1,33	0,37	0,0008
1	Palheta	0,50	0,37	0,1809
2	FLATPACK	1,50	0,37	0,0002
2	Palheta	1,50	0,45	0,0018
3	FLATPACK	2,17	0,37	0,0001
3	Palheta	2,38	0,45	0,0001
4	FLATPACK	3,17	0,37	0,0001
4	Palheta	4,00	0,37	0,0001
5	FLATPACK	2,50	0,45	0,0001
5	Palheta	2,00	0,52	0,0004

Análise 100. Vigor espermático ao descongelamento por jumento

<i>Jumento</i>	<i>Vigor</i>	<i>Erro</i>	<i>P</i>
1	0,92	0,26	0,0010
2	1,50	0,29	0,0001
3	2,27	0,29	0,0001
4	3,58	0,26	0,0001
5	2,25	0,34	0,0001

Análise 101. Vigor espermático ao descongelamento por tipo de envase

<i>Tipo de envase</i>	<i>Vigor</i>	<i>Erro</i>	<i>P</i>
FLATPACK	2,13	0,17	0,0001
Palheta	2,08	0,19	0,0001

Análise 102. Comparação do vigor espermático entre os tipos de envase, ao descongelamento

Envase	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
FLATPACK	28	721,0	728,0	51,28	25,75
Palhetas	23	605,0	598,0	51,28	26,30
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	605,00	0,13	0,8991		

Análise 103. Comparação do vigor espermático entre jumentos, ao descongelamento

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	12	158,50	312,0	43,71	13,21
2	10	205,00	260,0	40,91	20,50
3	10	258,50	260,0	40,91	25,85
4	12	520,50	312,0	43,71	43,38
5	7	183,50	182,0	35,46	26,21
Teste	GL	P			
Kruskal-Wallis	4	0,0001			

Análise 104. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 3 e 4, ao descongelamento

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
3	10	63,50	115,0	14,67	6,35
4	12	189,50	138,0	14,67	15,79
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	63,50	-3,48	0,0005		

Análise 105. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 4, ao descongelamento

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	10	62,0	115,0	14,97	6,20
4	12	191,0	138,0	14,97	15,91
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	62,00	-3,51	0,0005		

Análise 106. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 4 e 5, ao descongelamento

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
4	12	155,50	120,0	11,49	12,96
5	7	34,50	70,0	11,49	4,93
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	34,50	-3,05	0,0023		

Análise 107. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 4, ao descongelamento

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	12	81,50	150,0	17,05	6,79
4	12	218,50	150,0	17,05	18,21
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	81,50	-3,99	0,0001		

Análise 108. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 3, ao descongelamento

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	10	95,0	105,0	12,49	9,50
3	10	115,0	105,0	12,49	11,50
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	95,0	-0,76	0,4470		

Análise 109. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 3 e 5, ao descongelamento

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
3	10	89,50	90,0	8,18	8,95
5	7	63,50	63,0	8,18	9,07
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	63,7	0	1,0000		

Análise 110. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 3, ao descongelamento

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	12	97,50	138,0	14,26	8,13
3	10	155,50	115,0	14,26	15,56
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	155,50	2,80	0,0050		

Análise 111. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 2 e 5, ao descongelamento

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
2	10	82,0	90,0	9,75	8,20
5	7	71,0	63,0	9,75	10,14
Teste	S	Z	P > Z		
Wilcoxon	71,0	0,77	0,4418		

Análise 112. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 2, ao descongelamento

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	10	122,0	138,0	14,32	10,17
2	12	131,0	115,0	14,32	13,10
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	131,0		1,08	0,2792	

Análise 113. Comparação do vigor espermático entre os jumentos 1 e 5, ao descongelamento

Jumentos	n	Sum of Scores	Expected under HO	DP	Média
1	12	91,5	120,0	11,17	7,63
5	7	98,5	70,0	11,17	14,07
Teste	S		Z	P > Z	
Wilcoxon	98,50		2,51	0,0122	

8.3.4. Análises estatísticas referentes às tabelas 4.8 e 4.9

Análise 114. Avaliação dos ejaculados, por jumento, segundo a motilidade (>30%), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Jumentos	Aprovados	Reprovados	Total
1	0,00 (0/12)	100,00 (12/12)	23,53 (12/51)
2	0,00 (0/10)	100,00 (10/10)	19,61 (10/51)
3	10,00 (1/10)	90,00 (9/10)	19,61 (10/51)
4	83,33 (10/12)	16,67 (2/12)	23,53 (12/51)
5	28,57 (2/7)	71,43 (5/7)	13,73 (7/51)
Total	25,49 (13/51)	74,51 (38/51)	100,00 (51/51)
TESTE		GL	Valor de p
Qui -Quadrado		4	0,001

Análise 115. Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo a motilidade (>30%), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Tipo de envase	Aprovados	Reprovados	Total
FLATPACK	21,43 (6/28)	78,57 (22/28)	54,90 (28/51)
Palheta	30,43 (7/23)	69,57 (16/23)	45,10 (23/51)
Total	25,49 (13/51)	74,51 (38/51)	100,00 (51/51)
TESTE		GL	Valor de p
Qui -Quadrado		1	0,463

Análise 116. Avaliação dos ejaculados, por jumento, segundo o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Jumentos	Aprovados	Reprovados	Total
1	8,33 (1/12)	91,57 (11/12)	23,53 (12/51)
2	20,00 (2/10)	80,00 (8/10)	19,61 (10/51)
3	20,00 (2/10)	80,00 (8/10)	19,61 (10/51)
4	91,67 (11/12)	8,33 (1/12)	23,53 (12/51)
5	28,57 (2/7)	71,43 (5/7)	13,73 (7/51)
Total	35,29 (18/51)	64,71 (33/51)	100,00 (51/51)

TESTE	GL	Valor de p
Qui -Quadrado	4	0,001

Análise 117. Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Tipo de envase	Aprovados	Reprovados	Total
FLATPACK	32,14 (9/28)	67,86 (19/28)	54,90 (28/51)
Palheta	39,13 (9/23)	60,87 (14/23)	45,10 (23/51)
Total	35,29 (18/51)	64,71 (33/51)	100,00 (51/51)

TESTE	GL	Valor de p
Qui -Quadrado	1	0,603

Análise 118. Avaliação dos ejaculados, por jumento, segundo a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Jumentos	Aprovados	Reprovados	Total
1	0,00 (0/12)	100,00 (12/12)	23,53 (12/51)
2	0,00 (0/10)	100,00 (10/10)	19,61 (10/51)
3	10,00 (1/10)	90,00 (9/10)	19,61 (10/51)
4	83,33 (10/12)	16,67 (2/12)	23,53 (12/51)
5	28,57 (2/7)	71,43 (5/7)	13,73 (7/51)
Total	25,49 (13/51)	74,51 (38/51)	100,00 (51/51)

TESTE	GL	Valor de p
Qui -Quadrado	4	0,001

Análise 119. Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Tipo de envase	Aprovados	Reprovados	Total
FLATPACK	21,43 (6/28)	78,57 (22/28)	54,90 (28/51)
Palheta	30,43 (7/23)	69,57 (16/23)	45,10 (23/51)
Total	25,49 (13/51)	74,51 (38/51)	100,00 (51/51)

TESTE	GL	Valor de p
Qui -Quadrado	1	0,463

8.4. Análises Estatísticas Referentes ao Experimento II – Características físicas do sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks ou palhetas de 0,55 mL e congelado, utilizando-se uma curva de resfriamento lenta.

8.4.1. Análises estatísticas referentes à tabela 4.10

Análise 120. Comparação do número de montas/ejaculado para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	2,4000	0,6000	1,12	0,3981
Erro	10	5,3333	0,5333		
Total	14	7,7333			
Coefficiente de variação: 49,7930					
Jumentos	Média	Erro Padrão	p		
1	1,6667	0,4216	0,0027		
2	2,0000	0,4216	0,0008		
3	1,0000	0,4216	0,0392		
4	1,0000	0,4216	0,0392		
5	1,6667	0,4216	0,0027		

Análise 121 . Comparação da motilidade para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	0,0656	0,0164	2,93	0,0767
Erro	10	0,0561	0,0056		
Total	14	0,1217			
Coefficiente de variação: 6,1038					
Jumentos	Média	Erro Padrão	p		
1	85,0000	2,8868	0,0001		
2	88,3333	2,8868	0,0001		
3	88,3333	2,8868	0,0001		
4	88,3333	2,8868	0,0001		
5	95,0000	2,8868	0,0001		

Análise 122. Comparação do número de espermatozoides/mL, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	361026,6667	90256,6667	1,49	0,2781
Erro	10	607533,3333	60753,3334		
Total	14	968560,0000			
Coefficiente de variação: 30,2803					
Jumentos	Média	Erro Padrão	p		
1	710,0000	142,3064	0,0005		
2	586,6667	142,3064	0,0021		
3	870,0000	142,3064	0,0001		
4	1043,3333	142,3064	0,0001		
5	860,0000	142,3064	0,0001		

Análise 123. Comparação do número de espermatozoides móveis/mL, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	284601,7333	71150,4333	1,16	0,3826
Erro	10	611031,5000	61103,1500		
Total	14	895633,2333			
Coefficiente de variação: 34,3543					

Jumentos	Média	Erro Padrão	p
1	610,0000	142,7155	0,0016
2	510,6667	142,7155	0,0050
3	778,3333	142,7155	0,0003
4	881,6667	142,7155	0,0001
5	817,0000	142,7155	0,0002

Análise 124. Comparação da taxa de diluição, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	3,2434	0,8109	0,84	0,5307
Erro	10	9,6589	0,9659		
Total	14	12,9022			
Coefficiente de variação: 34,9997					

Jumentos	Média	Erro Padrão	P
1	2,4267	0,5674	0,0016
2	2,1100	0,5674	0,0040
3	2,9900	0,5674	0,0004
4	3,1767	0,5674	0,0002
5	3,3367	0,5674	0,0002

Análise 125. Comparação da concentração espermática da dose inseminante, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	77654,1313	19413,5328	0,36	0,8328
Erro	10	542033,2247	54203,3225		
Total	14				
Coefficiente de variação: 24,7552					

Jumentos	Média	Erro Padrão	P
1	903,0900	134,4164	0,0001
2	934,6033	134,4164	0,0001
3	943,6767	134,4164	0,0001
4	1069,2233	134,4164	0,0001
5	851,7833	134,4164	0,0001

Análise 126. Comparação do intervalo de tempo da coleta à pré-diluição, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	6,6667	1,6667	0,78	0,5624
Erro	10	21,3333	2,1333		
Total	14	28,0000			
Coefficiente de variação: 48,6865					

Jumentos	Média	Erro Padrão	P
1	2,0000	0,8433	0,0392
2	2,6667	0,8433	0,0101
3	3,0000	0,8433	0,0052
4	3,3333	0,8433	0,0027
5	4,0000	0,8433	0,0008

Análise 127. Comparação do intervalo de tempo da coleta à diluição final, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	50401,7333	12600,4333	2,15	0,1494
Erro	10	58726,0000	5872,6000		
Total	14	109127,7333			
Coefficiente de variação: 24,6831					

Jumentos	Média	Erro Padrão	P
1	348,0000	44,2440	0,0001
2	256,6667	44,2440	0,0002
3	262,3333	44,2440	0,0001
4	279,0000	44,2440	0,0001
5	406,3333	44,2440	0,0001

Análise 128. Comparação do intervalo de tempo da coleta ao congelamento, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	51378,4000	12844,6000	1,58	0,2525
Erro	10	81060,0000	8106,0000		
Total	14	132438,4000			
Coefficiente de variação: 23,3731					

Jumentos	Média	Erro Padrão	P
1	435,6667	51,9808	0,0001
2	297,6667	51,9808	0,0002
3	369,0000	51,9808	0,0001
4	360,6667	51,9808	0,0001
5	463,0000	51,9808	0,0001

Análise 129. Comparação do volume do ejaculado, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	1175,2293	293,8073	7,06	0,0057
Erro	10	416,3867	41,6387		
Total	14	1591,6160			
Coeficiente de variação: 31,8500					
Agrupamento pelo Teste					
Teste estatístico	Jumento1	Jumento 2	Jumento 3	Jumento 4	Jumento 5
SNK (p<0,05)	b	a	ab	b	a
Jumentos	Média	Erro Padrão	p		
1	10,6667	3,7255	0,0169		
2	28,2333	3,7255	0,0001		
3	18,3333	3,7255	0,0006		
4	11,4000	3,7255	0,0120		
5	32,6667	3,7255	0,0001		

Análise 130. Comparação do número de espermatozoides totais, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	741183909,7333	185295977,4333	4,15	0,0309
Erro	10	446462130,0000	44646213,0000		
Total	14	1187646039,7333			
Coeficiente de variação: 41,8000					
Agrupamento pelo Teste					
Teste estatístico	Jumento1	Jumento 2	Jumento 3	Jumento 4	Jumento 5
SNK (p<0,05)	b	ab	ab	ab	a
Jumentos	Média	Erro Padrão	p		
1	7541,6667	3857,7287	0,0791		
2	16118,0000	3857,7287	0,0019		
3	15608,3333	3857,7287	0,0023		
4	12026,0000	3857,7287	0,0109		
5	28631,6667	3857,7287	0,0001		

Análise 131. Comparação do número de espermatozoides móveis por ejaculado, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	4	733141799,4927	183285449,8732	4,25	0,0288
Erro	10	430810546,2983			
Total	14	1163952345,7910			
Coeficiente de variação: 45,4982					
Agrupamento pelo Teste					
Teste estatístico	Jumento1	Jumento 2	Jumento 3	Jumento 4	Jumento 5
SNK (p<0,05)	b	ab	ab	b	A
Jumentos	Média	Erro Padrão	p		
1	6489,0000	3789,5054	0,1176		
2	13982,6667	3789,5054	0,0042		
3	14274,0000	3789,5054	0,0037		
4	10184,8000	3789,5054	0,0228		
5	27200,0833	3789,5054	0,0001		

Análise 132. Comparação do número potencial de doses, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	730,2667	182,5667	4,40	0,0261
Erro	10	414,6667	41,4667		
Total	14	1144,9333			
Coeficiente de variação: 46,2162					
Teste estatístico	Agrupamento pelo Teste				
	Jumento1	Jumento 2	Jumento 3	Jumento 4	Jumento 5
SNK (p<0,05)	b	ab	ab	b	a
Jumentos	Média	Erro Padrão		p	
1	6,0000	3,7178		0,1376	
2	13,6667	3,7178		0,0043	
3	13,6667	3,7178		0,0043	
4	9,6667	3,7178		0,0265	
5	26,6667	3,7178		0,0001	

Análise 133. Comparação do número real de doses produzidas, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	1222,2667	305,5667	8,81	0,0026
Erro	10	346,6667	34,6667		
Total	14	1568,9333			
Coeficiente de variação: 36,9530					
Teste estatístico	Agrupamento pelo Teste				
	Jumento1	Jumento 2	Jumento 3	Jumento 4	Jumento 5
SNK (p<0,05)	b	b	b	b	a
Jumentos	Média	Erro Padrão		p	
1	7,3333	3,3993		0,0564	
2	15,3333	3,3993		0,0011	
3	14,3333	3,3993		0,0018	
4	9,6667	3,3993		0,0174	
5	33,0000	3,3993		0,0001	

Análise 134. Comparação do volume de diluidor 1 (D1), para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	3116,9977	779,2494	5,93	0,0104
Erro	10	1314,1667	131,4167		
Total	14	4431,1643			
Coeficiente de variação: 40,2612					
Teste estatístico	Agrupamento pelo Teste				
	Jumento1	Jumento 2	Jumento 3	Jumento 4	Jumento 5
SNK (p<0,05)	b	b	b	b	a
Jumentos	Média	Erro Padrão		p	
1	13,0000	6,6186		0,0779	
2	29,4833	6,6186		0,0012	
3	26,5833	6,6186		0,0025	
4	18,4667	6,6186		0,0191	
5	54,8333	6,6186		0,0001	

Análise 135. Comparação do volume de diluidor 2 (D2), para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	3116,9977	779,2494	5,93	0,0104
Erro	10	1314,1667	131,4167		
Total	14	4431,1643			
Coefficiente de variação: 40,2612					

Teste estatístico	Agrupamento pelo Teste				
	Jumento1	Jumento 2	Jumento 3	Jumento 4	Jumento 5
SNK (p<0,05)	b	b	b	b	a

Jumentos	Média	Erro Padrão	p
1	13,0000	6,6186	0,0779
2	29,4833	6,6186	0,0012
3	26,5833	6,6186	0,0025
4	18,4667	6,6186	0,0191
5	54,8333	6,6186	0,0001

Análise 136. Comparação do intervalo de tempo da coleta ao resfriamento, para os jumentos, no experimento II

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	4	43,7333	10,9333	7,81	0,0040
Erro	10	14,0000	1,4000		
Total	14	57,7333			
Coefficiente de variação: 19,2916					

Teste estatístico	Agrupamento pelo Teste				
	Jumento1	Jumento 2	Jumento 3	Jumento 4	Jumento 5
SNK (p<0,05)	b	b	b	b	a

Jumentos	Média	Erro Padrão	p
1	3,6667	0,6831	0,0003
2	6,0000	0,6831	0,0001
3	5,6667	0,6831	0,0001
4	6,3333	0,6831	0,0001
5	9,0000	0,6831	0,0001

Análise 137. Comparação do vigor espermático, para os jumentos, no experimento II

Jumentos	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	3	24,0	24,0	0,0	8,0
2	3	24,0	24,0	0,0	8,0
3	3	24,0	24,0	0,0	8,0
4	3	24,0	24,0	0,0	8,0
5	3	24,0	24,0	0,0	8,0
Teste		GL		p	
Kruskal-Wallis		4		1,0000	

Jumentos	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	3	13,5000	24,0	6,4741	4,5000
2	3	19,5000	24,0	6,4741	6,5000
3	3	22,0000	24,0	6,4741	7,3333
4	3	25,5000	24,0	6,4741	8,5000
5	3	39,5000	24,0	6,4741	13,1667
Teste		GL		p	
Kruskal-Wallis		4		0,1259	

Jumentos	Média	Erro Padrão	p
1	4,0000	0,1972	0,0001
2	4,1667	0,1972	0,0001
3	4,1667	0,1972	0,0001
4	4,3333	0,1972	0,0001
5	4,8333	0,1972	0,0001

8.4.2. Análises estatísticas referentes às tabelas 4.12 e 4.13

Análise 138. Comparações dos valores de motilidade e vigor espermáticos, entre os avaliadores, no momento do descongelamento do sêmen

Variável	N	Média	Erro P	Mínimo	Máximo	CV
Motilidade	59	29,9153	1,8391	0	60,0000	47,2222
Vigor	59	2,9322	0,1433	0	5,0000	37,5275

Análise 139. Comparações dos valores de motilidade espermática, entre os avaliadores, no momento do descongelamento do sêmen

Local	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	29	0,5626	0,2019	0,0375	Desigual	0,3680	57,0	0,7142
2	30	0,5429	0,2090	0,0382	Igual	0,3678	57,0	0,7144
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,07				DF= 29,28		Prob>F' = 0,8556		

Análise 140. Comparações dos valores de vigor espermático, entre os avaliadores, no momento do descongelamento do sêmen

Avaliadores	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	29	883,0	870,0	62,6065	30,4483
2	30	887,0	900,0	62,6065	29,5667
Teste	S		Z	P> Z	
Wilcoxon	883,0000		0,1997	0,8417	

Análise 141. Comparações dos valores de motilidade espermática no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen

Jumentos	Tempo	Mot. Média	Erro Padrão	p
1	Fresco	85,0000	6,1397	0,0001
1	Pré Diluído	85,0000	6,1397	0,0001
1	Pós Diluído	81,6667	6,1397	0,0001
1	Descongelado	25,4167	3,0698	0,0001
2	Fresco	88,3333	6,1397	0,0001
2	Pré Diluído	86,6667	6,1397	0,0001
2	Pós Diluído	80,0000	6,1397	0,0001
2	Descongelado	23,7500	3,0698	0,0001
3	Fresco	88,3333	6,1397	0,0001
3	Pré Diluído	88,3333	6,1397	0,0001
3	Pós Diluído	81,6667	6,1397	0,0001
3	Descongelado	32,9167	3,0698	0,0001
4	Fresco	83,3333	6,1397	0,0001
4	Pré Diluído	83,3333	6,1397	0,0001
4	Pós Diluído	80,0000	6,1397	0,0001
4	Descongelado	42,9167	3,0698	0,0001
5	Fresco	93,3333	6,1397	0,0001
5	Pré Diluído	93,3333	6,1397	0,0001
5	Pós Diluído	88,3333	6,1397	0,0001
5	Descongelado	24,0909	3,2063	0,0001

Análise 142. Valores totais médios de motilidade espermática por jumento, independentemente do tempo

Jumentos	Motilidade	Erro Padrão	p
1	69,2708	2,7671	0,0001
2	69,6875	2,7671	0,0001
3	72,8125	2,7671	0,0001
4	72,3958	2,7671	0,0001
5	74,7727	2,7768	0,0001

Análise 143. Valores totais médios de motilidade espermática por tempo, independentemente do jumento

Tempo	Motilidade	Erro Padrão	p
Fresco	87,6667	2,7457	0,0001
Pré diluído	87,3333	2,7457	0,0001
Pós diluído	82,3333	2,7457	0,0001
Descongelado	29,8182	1,3853	0,0001

Análise 144. Comparações dos valores de vigor espermático no transcorrer do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen

Jumentos	Tempo	Vigor Médio	Erro Padrão	p
1	Fresco	4,0000	0,4597	0,0001
1	Pré Diluído	4,5000	0,4597	0,0001
1	Pós Diluído	4,3333	0,4597	0,0001
1	Descongelado	2,7500	0,2299	0,0001
2	Fresco	4,1667	0,4597	0,0001
2	Pré Diluído	4,5000	0,4597	0,0001
2	Pós Diluído	4,0000	0,4597	0,0001
2	Descongelado	2,2083	0,2299	0,0001
3	Fresco	4,1667	0,4597	0,0001
3	Pré Diluído	4,3333	0,4597	0,0001
3	Pós Diluído	4,0000	0,4597	0,0001
3	Descongelado	3,0417	0,2299	0,0001
4	Fresco	4,3333	0,4597	0,0001
4	Pré Diluído	4,6667	0,4597	0,0001
4	Pós Diluído	4,1667	0,4597	0,0001
4	Descongelado	4,0000	0,2299	0,0001
5	Fresco	4,6667	0,4597	0,0001
5	Pré Diluído	4,6667	0,4597	0,0001
5	Pós Diluído	4,0000	0,4597	0,0001
5	Descongelado	2,6364	0,2401	0,0001

Análise 145. Valores totais médios de vigor espermático por jumento, independentemente do tempo

Jumentos	Vigor	Erro Padrão	p
1	3,8958	0,2072	0,0001
2	3,7188	0,2072	0,0001
3	3,8854	0,2072	0,0001
4	4,2917	0,2072	0,0001
5	3,9924	0,2079	0,0001

Análise 146. Valores totais médios de vigor espermático por tempo, independentemente do jumento

Tempo	Vigor	Erro Padrão	p
Fresco	4,2667	0,2056	0,0001
Pré diluído	4,5333	0,2056	0,0001
Pós diluído	4,1000	0,2056	0,0001
Descongelado	2,9273	0,1037	0,0001

Análise 147. Comparação dos valores de motilidade espermática nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	19	11,2212	0,5906	23,64	0,0001
Erro	84	2,0987	0,0250		
Total	103	13,3199			
Coeficiente de variação: 19,0441					

Teste estatístico	Agrupamento pelo Teste			
	Fresco	Pré diluído	Pós diluído	Descongelado
SNK (p<0,05)	a	a	a	b

Análise 148. Comparação dos valores de vigor espermático, do jumento 2, nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	51,0	33,0	9,7508	17,0000
Pré diluído	3	54,0	33,0	9,7508	18,0000
Pós diluído	3	48,0	33,0	9,7508	16,0000
Descongelado	12	78,0	132,0	13,7897	6,5000

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	3	0,0014

Análise 149. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos fresco e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	9,0	10,5	2,2249	3,0
Pré diluído	3	12,0	10,5	2,2249	4,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	9,0000	-0,4495	0,6531

Análise 150. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos pós-diluído e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Pós diluído	3	9,0	10,5	2,1213	3,0
Pré diluído	3	12,0	10,5	2,1213	4,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	9,0000	-0,4714	0,6374

Análise 151. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	78,0	96,0	6,6698	6,5
Pré diluído	3	42,0	24,0	6,6698	14,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	42,0000	2,6238	0,0087

Análise 152. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos fresco e pós-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	12,0	10,5	1,5	4,0
Pós diluído	3	9,0	10,5	1,5	3,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	12,0000	0,6667	0,5050

Análise 153. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e fresco

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	78,0	96,0	6,6698	6,5
Fresco	3	42,0	24,0	6,6698	14,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	42,0000	2,6238	0,0087

Análise 154. Comparação do vigor espermático do jumento 2 nos tempos descongelado e pós-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	78,0	96,0	6,6505	6,5
Pós diluído	3	42,0	24,0	6,6505	14,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	42,0000	2,6314	0,0085

Análise 155. Comparação dos valores de vigor espermático, do jumento 5, nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	52,5	31,5	9,2498	17,5000
Pré diluído	3	52,5	31,5	9,2498	17,5000
Pós diluído	3	36,0	31,5	9,2498	12,0000
Descongelado	11	69,0	115,5	12,8874	6,2727

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	3	0,0020

Análise 156. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos fresco e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	10,5	10,5	1,8974	3,5
Pré diluído	3	10,5	10,5	1,8974	3,5

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	10,5000	0	1,0000

Análise 157. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos fresco e pós-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	15,0	10,5	2,1213	5,0
Pós diluído	3	6,0	10,5	2,1213	2,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	15,0000	1,8856	0,0593

Análise 158. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos descongelado e fresco

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	11	66,0	82,5	6,2364	6,0
Fresco	3	39,0	22,5	6,2364	13,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	39,0000	2,5656	0,0103

Análise 159. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos pós-diluído e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Pós diluído	3	6,0	10,5	2,1213	2,0
Pré diluído	3	15,0	10,5	2,1213	5,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	6,0000	-1,8856	0,0593

Análise 160. Comparação do vigor espermático do jumento5 nos tempos descongelado e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	11	66,0	82,5	6,2364	6,0
Pré diluído	3	39,0	22,5	6,2364	13,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	39,0000	2,5656	0,0103

Análise 161. Comparação do vigor espermático do jumento 5 nos tempos descongelado e pós-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	11	69,0	82,5	6,1042	6,2727
Pós diluído	3	36,0	22,5	6,1042	12,0000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	36,0000	2,1297	0,0332

Análise 162. Comparação dos valores de vigor espermático, do jumento 3, nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	49,5	33,0	9,6548	16,5000
Pré diluído	3	53,0	33,0	9,6548	17,6667
Pós diluído	3	45,5	33,0	9,6548	15,1667
Descongelado	12	83,0	132,0	13,6539	6,9167

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	3	0,0043

Análise 163. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos fresco e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	10,0	10,5	1,9365	3,3333
Pré diluído	3	11,0	10,5	1,9365	3,6667

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	10,0000	0	1,0000

Análise 164. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos pós-diluído e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Pós diluído	3	8,5	10,5	2,1213	2,8333
Pré diluído	3	12,5	10,5	2,1213	4,1667

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	8,5000	-0,7071	0,4795

Análise 165. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	78,5	96,0	6,5531	6,5417
Pré diluído	3	41,5	24,0	6,5531	13,8333

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	41,5000	2,5942	0,0095

Análise 166. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos fresco e pós-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	11,5	10,5	2,1213	3,8333
Pós diluído	3	9,5	10,5	2,1213	3,1667

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	11,5000	0,2357	0,8137

Análise 167. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e fresco

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	80,0	96,0	6,5400	6,6667
Fresco	3	40,0	24,0	6,5400	13,3333

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	40,0000	2,3700	0,0178

Análise 168. Comparação do vigor espermático do jumento 3 nos tempos descongelado e pós-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	80,5	96,0	6,5400	6,7083
Pós diluído	3	39,5	24,0	6,5400	13,1667

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	39,5000	2,2936	0,0218

Análise 169. Comparação dos valores de vigor espermático, do jumento 4, nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	39,5	33,0	9,2013	13,1667
Pré diluído	3	52,5	33,0	9,2013	17,5000
Pós diluído	3	31,0	33,0	9,2013	17,5000
Descongelado	12	108,0	132,0	13,0126	9,0000

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	3	0,1230

Análise 170. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos fresco e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	8,0	10,5	1,9365	2,6667
Pré diluído	3	13,0	10,5	1,9365	4,3333

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	8,0000	-1,0328	0,3017

Análise 171. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos fresco e pós-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	12,0	10,5	2,0125	4,0
Pós diluído	3	9,0	10,5	2,0125	3,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	12,0000	0,4969	0,6193

Análise 172. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e fresco

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	88,5	96,0	6,3133	7,3750
Fresco	3	31,5	24,0	6,3133	10,5000
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	31,5000		1,1088	0,2675	

Análise 173. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos pós-diluído e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Pós diluído	3	7,0	10,5	2,1213	2,3333
Pré diluído	3	14,0	10,5	2,1213	4,6667
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	7,0000		-1,4142	0,1573	

Análise 174. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	82,5	96,0	6,4940	6,8750
Pré diluído	3	37,5	24,0	6,4940	12,5000
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	37,5000		2,0019	0,0453	

Análise 175. Comparação do vigor espermático do jumento 4 nos tempos descongelado e pós-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	93,0	96,0	6,1062	7,7500
Pós diluído	3	27,0	24,0	6,1062	9,0000
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	27,0000		0,4094	0,6822	

Análise 176. Comparação dos valores de vigor espermático, do jumento 1, nos diferentes momentos do processo de congelamento e quando do descongelamento do sêmen

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	40,5	33,0	9,5443	13,5000
Pré diluído	3	53,5	33,0	9,5443	17,8333
Pós diluído	3	51,5	33,0	9,5443	17,1667
Descongelado	12	85,5	132,0	13,4976	7,1250
Teste	GL			p	
Kruskal-Wallis	3			0,0051	

Análise 177. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos pós-diluído e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Pós diluído	3	9,5	10,5	2,1213	3,1667
Pré diluído	3	11,5	10,5	2,1213	3,8333
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	9,5000		-0,2357	0,8137	

Análise 178. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos fresco e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	7,5	10,5	1,9365	2,5
Pré diluído	3	13,5	10,5	1,9365	4,5
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	7,5000		-1,2910	0,1967	

Análise 179. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e pré-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	79,5	96,0	6,6440	6,6250
Pré diluído	3	40,5	24,0	6,6440	13,5000
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	40,5000		2,4082	0,0160	

Análise 180. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos fresco e pós-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Fresco	3	7,5	10,5	1,8974	2,5
Pós diluído	3	13,5	10,5	1,8974	4,5
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	7,5000		-1,3176	0,1876	

Análise 181. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e pós-diluído

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	79,5	96,0	6,6376	6,6250
Pós diluído	3	40,5	24,0	6,6376	13,5000
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	40,5000		2,4105	0,0159	

Análise 182. Comparação do vigor espermático do jumento 1 nos tempos descongelado e fresco

Tempo	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Descongelado	12	82,5	96,0	6,4807	6,8750
Fresco	3	37,5	24,0	6,4807	12,5000
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	37,5000		2,0059	0,0449	

Análise 183. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre jumentos

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	3	13,5	24,0	6,3403	4,5000
2	3	20,0	24,0	6,3403	6,6667
3	3	23,0	24,0	6,3403	7,6667
4	3	26,5	24,0	6,3403	8,8333
5	3	37,0	24,0	6,3403	12,3333
Teste	GL		p		
Kruskal-Wallis	4		0,1977		

Análise 184. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 5

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	3	7,0	10,5	2,1213	2,3333
5	3	14,0	10,5	2,1213	4,6667
Teste	S		Z	P> Z	
Wilcoxon	7,0000		-1,4142	0,1573	

Análise 185. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 3 e 5

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
3	3	8,0	10,5	1,9365	2,6667
5	3	13,0	10,5	1,9365	4,3333
Teste	S		Z	P> Z	
Wilcoxon	8,0000		-1,0328	0,3017	

Análise 186. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 5

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	3	6,0	10,5	2,1213	2,0
5	3	15,0	10,5	2,1213	5,0
Teste	S		Z	P> Z	
Wilcoxon	6,0000		-1,8856	0,0593	

Análise 187. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 4

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	3	9,0	10,5	2,0125	3,0
4	3	12,0	10,5	2,0125	4,0
Teste	S		Z	P> Z	
Wilcoxon	9,0000		-0,4969	0,6193	

Análise 188. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 3 e 4

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
3	3	10,0	10,5	1,9365	3,3333
4	3	11,0	10,5	1,9365	3,6667
Teste		S	Z	P> Z 	
Wilcoxon		10,0000	0	1,0000	

Análise 189. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 4

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	3	7,5	10,5	1,8974	2,5
4	3	13,5	10,5	1,8974	4,5
Teste		S	Z	P> Z 	
Wilcoxon		7,5000	-1,3176	0,1876	

Análise 190. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 2 e 3

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	3	10,0	10,5	2,1213	3,3333
3	3	11,0	10,5	2,1213	3,6667
Teste		S	Z	P> Z 	
Wilcoxon		10,0000	0	1,0000	

Análise 191. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 2

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	3	9,0	10,5	1,5000	3,0
2	3	12,0	10,5	1,5000	4,0
Teste		S	Z	P> Z 	
Wilcoxon		9,0000	-0,6667	0,5050	

Análise 192. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 1 e 3

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	3	9,0	10,5	2,1213	3,0
3	3	12,0	10,5	2,1213	4,0
Teste		S	Z	P> Z 	
Wilcoxon		9,0000	-0,4714	0,6374	

Análise 193. Comparação do vigor espermático no tempo fresco entre os jumentos 4 e 5

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
4	3	8,0	10,5	1,9365	2,6667
5	3	13,0	10,5	1,9365	4,3333
Teste		S	Z	P> Z 	
Wilcoxon		8,0000	-1,0328	0,3017	

Análise 194. Comparação do vigor espermático no tempo pré diluição entre jumentos

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	3	22,5	24,0	6,4343	7,5
2	3	27,0	24,0	6,4343	9,0
3	3	16,5	24,0	6,4343	5,5
4	3	27,0	24,0	6,4343	9,0
5	3	27,0	24,0	6,4343	9,0
Teste		GL		p	
Kruskal-Wallis		4		0,7994	

Análise 195. Comparação do vigor espermático no tempo pós diluição entre jumentos

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	3	33,5	24,0	5,7446	11,2
2	3	19,5	24,0	5,7446	6,5
3	3	21,0	24,0	5,7446	7,0
4	3	26,5	24,0	5,7446	8,8
5	3	19,5	24,0	5,7446	6,5
Teste		GL		p	
Kruskal-Wallis		4		0,4719	

Análise 196. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre jumentos

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	12	338,0	360,0	50,41	28,2
2	12	219,0	360,0	50,41	18,25
3	12	358,5	360,0	50,41	29,88
4	12	581,0	360,0	50,41	48,42
5	11	273,5	330,0	48,77	24,86
Teste		GL		p	
Kruskal-Wallis		4		0,0001	

Análise 197. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 3 e 4

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
3	12	94,5	150,0	16,53	7,9
4	12	205,5	150,0	16,53	17,1
Teste		S	Z	P> Z 	
Wilcoxon		94,5000	-3,3280	0,0009	

Análise 198. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 4

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	12	100,5	150,0	16,35	8,4
4	12	199,5	150,0	16,35	16,6
Teste		S	Z	P> Z 	
Wilcoxon		100,500	-2,9966	0,0027	

Análise 199. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 4 e 5

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
4	12	194,0	144,0	15,5	16,2
5	11	82,0	132,0	15,5	7,45
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	82,0000		-3,1926	0,0014	

Análise 200. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 4

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	12	84,0	150,0	16,8	7,0
4	12	216,0	150,0	16,8	18,0
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	84,0000		-3,9077	0,0001	

Análise 201. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 3

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	12	146,0	150,0	15,8	12,2
3	12	154,0	150,0	15,8	12,8
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	146,0000		-0,2209	0,8251	

Análise 202. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 3 e 5

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
3	12	158,0	144,0	14,9	13,2
5	11	118,0	132,0	14,9	10,7
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	118,0000		-0,9005	0,3678	

Análise 203. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 3

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	12	114,0	150,0	15,8	9,5
3	12	186,0	150,0	15,8	15,5
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	114,0000		-2,2415	0,0250	

Análise 204. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 5

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	12	151,0	144,0	15,2	12,6
5	11	125,0	132,0	15,2	11,4
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	125,0000		-0,4274	0,6691	

Análise 205. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 1 e 2

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	12	174,5	150,0	16,1	14,5
2	12	125,5	150,0	16,1	10,5

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	174,5000	1,4874	0,1369

Análise 206. Comparação do vigor espermático no tempo descongelamento entre os jumentos 2 e 5

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	12	129,5	144,0	15,2	10,8
5	11	146,5	132,0	15,2	13,3

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	146,5000	0,9230	0,3560

8.4.3. Análises estatísticas referentes às tabelas 4.15 e 4.16

Análise 207. Comparação dos valores de motilidade e vigor espermáticos, por avaliador, no momento do descongelamento do sêmen, no experimento II

Avaliador	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
1	67	0,4693	0,1977	0,0242	Desigual	0,6163	132,7	0,5388
2	68	0,4476	0,2102	0,0255	Igual	0,6160	133,0	0,5389

Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,13 DF= 67,66 Prob>F' = 0,6195

Análise 208. Comparação do vigor espermático entre os avaliadores, ao descongelamento

Avaliador	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	67	4870,0	4556,0	221,6	72,7
2	68	4310,0	4624,0	221,6	63,4

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	4870,00	1,4147	0,1571

Análise 209. Efeito do tipo de envasamento, do tempo e do jumento sobre a motilidade espermática

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	29	3,0017	0,1035	4,25	0,0001
Erro	105	2,5555	0,0243		
Total	134	5,5573			

Coefficiente de variação: 34,03641

Análise 210. Efeito do tempo e do jumento sobre a motilidade espermática

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Modelo	29	2,7280	0,0941	3,49	0,0001
Erro	105	2,8293	0,0270		
Total	134	5,5573			

Coefficiente de variação: 35,81308

Análise 211. Comparação do efeito do jumento, do tipo de envasamento e do período de avaliação sobre a motilidade espermática, quando do descongelamento do sêmen

Tratamento	Média	Erro Padrão	p
DescFP 1	19,1667	4,2878	0,0001
DescFP 2	19,1667	4,2878	0,0001
DescFP 3	30,8333	4,2878	0,0001
DescFP 4	39,1667	4,2878	0,0001
DescFP 5	17,0000	4,6970	0,0005
DescPalh 1	31,6667	4,2878	0,0001
DescPalh 2	28,3333	4,2878	0,0001
DescPalh 3	35,0000	4,2878	0,0001
DescPalh 4	46,6667	4,2878	0,0001
DescPalh 5	30,0000	4,2878	0,0001
TTRFP 60 1	12,5000	7,4267	0,0953
TTRFP 60 2	15,0000	7,4267	0,0460
TTRFP 60 3	13,1250	5,2514	0,0140
TTRFP 60 4	17,5000	5,2514	0,0012
TTRFP 60 5	5,0000	7,4267	0,5023
TTRFP120 1	15,0000	7,4267	0,0460
TTRFP120 2	12,5000	7,4267	0,0953
TTRFP120 3	7,5000	5,2514	0,1562
TTRFP120 4	3,7500	5,2514	0,4768
TTRFP120 5	5,0000	7,4267	0,5023
TTRPalh60 1	26,2500	5,2514	0,0001
TTRPalh60 2	30,0000	5,2514	0,0001
TTRPalh60 3	20,0000	4,2878	0,0001
TTRPalh60 4	21,6667	4,2878	0,0001
TTRPalh60 5	23,7500	5,2514	0,0001
TTRPalh120 1	21,2500	5,2514	0,0001
TTRPalh120 2	18,7500	5,2514	0,0005
TTRPalh120 3	17,5000	4,2878	0,0001
TTRPalh120 4	12,5000	4,2878	0,0043
TTRPalh120 5	7,5000	5,2514	0,1562

Análise 212. Comparação do efeito do jumento, do tipo de envasamento e do período de avaliação sobre o vigor espermático, quando do descongelamento do sêmen

Tratamento	Média	Erro Padrão	p
DescFP 1	2,0000	0,3364	0,0001
DescFP 2	1,7500	0,3364	0,0001
DescFP 3	2,8333	0,3364	0,0001
DescFP 4	3,6667	0,3364	0,0001
DescFP 5	2,6000	0,3685	0,0001
DescPalh 1	3,5000	0,3364	0,0001
DescPalh 2	2,6667	0,3364	0,0001
DescPalh 3	3,2500	0,3364	0,0001
DescPalh 4	4,3333	0,3364	0,0001
DescPalh 5	2,6667	0,3364	0,0001
TTRFP 60 1	1,5000	0,5826	0,0114
TTRFP 60 2	2,0000	0,5826	0,0009
TTRFP 60 3	1,6250	0,4120	0,0001
TTRFP 60 4	1,6250	0,4120	0,0001
TTRFP 60 5	1,0000	0,5826	0,0890
TTRFP120 1	2,0000	0,5826	0,0009
TTRFP120 2	1,2500	0,586	0,0342
TTRFP120 3	1,2500	0,4120	0,0030
TTRFP120 4	0,5000	0,4120	0,2276
TTRFP120 5	1,0000	0,5826	0,0890
TTRPalh60 1	2,5000	0,4120	0,0001
TTRPalh60 2	2,5000	0,4120	0,0001
TTRPalh60 3	2,0000	0,3364	0,0001
TTRPalh60 4	2,3333	0,3364	0,0001
TTRPalh60 5	2,1250	0,4120	0,0001
TTRPalh120 1	2,5000	0,4120	0,0001
TTRPalh120 2	1,5000	0,4120	0,0004
TTRPalh120 3	2,2500	0,3364	0,0001
TTRPalh120 4	1,8333	0,3364	0,0001
TTRPalh120 5	1,1250	0,4120	0,0074

Análise 213. Comparação dos efeitos do tipo de envasamento e do período de avaliação, sobre o vigor espermático, por jumento

Jumentos	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
DescFP 1	6	366,5000	408,0	91,2396	61,0833
DescPalh 1	6	666,0000	408,0	91,2396	111,0000
TTRFP 60 1	2	73,5000	136,0	53,4877	36,7500
TTRPalh60 1	4	298,0000	272,0	75,0721	74,5000
TTRFP120 1	2	106,0000	136,0	53,4877	53,0000
TTRPalh120 1	4	298,0000	272,0	75,0721	74,5000
DescFP 2	6	328,0000	408,00	91,2396	54,6667
DescPalh 2	6	490,0000	408,0	91,2396	81,6667
TTRFP 60 2	2	106,00	136,0	53,4877	53,0000
TTRPalh60 2	4	298,0000	272,0	75,0721	74,5000
TTRFP120 2	2	54,0000	136,0	53,4877	27,0000
TTRPalh120 2	4	147,0000	272,0	75,0721	36,7500
DescFP 3	6	532,0000	408,0	91,2396	88,6667
DescPalh 3	6	628,0000	408,0	91,2396	104,6667
TTRFP 60 3	4	160,0000	272,0	75,0721	40,0000
TTRPalh60 3	6	348,5000	408,0	91,2396	58,0833
TTRFP120 3	4	114,5000	272,0	75,0721	28,6250
TTRPalh120 3	6	384,5000	408,0	91,2396	64,0833
DescFP 4	6	696,0000	408,0	91,2396	116,0000
DescPalh 4	6	780,0000	408,0	91,2396	130,0000
TTRFP 60 4	4	167,0000	272,0	75,0721	41,7500
TTRPalh60 4	6	442,0000	408,0	91,2396	73,6667
TTRFP120 4	4	51,0000	272,0	75,0721	12,7500
TTRPalh120 4	6	323,5000	408,0	91,2396	53,9167
DescFP 5	5	394,0000	340,0	83,6122	78,8000
DescPalh 5	6	502,0000	408,0	91,2396	83,6667
TTRFP 60 5	2	41,0000	136,0	53,4877	20,5000
TTRPalh60 5	4	232,0000	272,0	75,0721	58,0000
TTRFP120 5	2	41,0000	136,0	53,4877	20,5000
TTRPalh120 5	4	112,0000	272,0	75,0721	28,0000
Teste	GL		p		
Kruskal-Wallis	29		0,0001		

Análise 214. Comparação do efeito do período de avaliação e do tipo de envase sobre o vigor espermático, para o jumento 1

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	60,5000	75,0	14,1475	10,0833
Desc. P	6	118,5000	75,0	14,1475	19,7500
TTR FP 120	2	15,0000	25,0	9,0301	7,5000
TTR P 120	2	10,0000	25,0	9,0301	5,0000
TTR P 120	4	48,0000	50,0	12,1762	12,0000
TTR P60	4	48,0000	50,0	12,1762	12,0000

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	5	0,0411

Análise 215. Comparação do vigor espermático do jumento 1, nos tempos descongelado e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc P	6	42,0	33,0	4,3205	7,0000
TTR P 120	4	13,0	22,0	4,3205	3,2500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	13,0000	-1,9674	0,0491

Análise 216. Comparação do vigor espermático do jumento 1, nos tempos descongelado e TTR 60, para as amostras envasadas em palhetas

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	42,0	33,0	4,3205	7,0000
TTR P 60	4	13,0	22,0	4,3205	3,2500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	13,0000	-1,9674	0,0491

Análise 217. Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento, nos dois tipos de envasamento

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	25,5	39,0	5,8036	4,2500
Desc. P	6	52,5	39,0	5,8036	8,7500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	25,5000	-2,2400	0,0251

Análise 218. Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento para a amostra envasada em palheta, e TTR 120, para o FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	33,0	27,0	2,8347	5,5000
TTR FP 120	2	3,0	9,0	2,8347	1,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	3,0000	-1,9402	0,0524

Análise 219. Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento para palheta, e TTR 60, para FlatPack

TempoXJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc.P	6	33,0	27,0	2,8536	5,5000
TTR FP 60	2	3,0	9,0	2,8536	1,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	3,0000	-1,9274	0,0539

Análise 220. Comparação do vigor espermático do jumento 1, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas

TempoXJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR P 120	4	18,0	18,0	3,0237	4,5000
TTR P 60	4	18,0	18,0	3,0237	4,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	18,0000	0	1,0000

Análise 221. Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 120, para palheta.

TempoXJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	31,0	33,0	4,3359	5,1667
TTR P 120	4	24,0	22,0	4,3359	6,0000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	24,0000	0,3459	0,7294

Análise 222. Comparação do vigor espermático do jumento 1, no tempo TTR 120, para os dois tipos de envase

TempoXJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	2	5,0	7,0	1,7889	2,5000
TTR P120	4	16,0	14,0	1,7889	4,0000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	5,0000	-0,8385	0,4017

Análise 223. Comparação do vigor espermático do jumento 1, no tempo TTR 60, para FlatPack, e TTR 120, para palheta

TempoXJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 60	2	4,0	7,0	2,0	2,0000
TTR P 120	4	17,0	14,0	2,0	4,2500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	4,0000	-1,2500	0,2113

Análise 224. Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 60, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	31,0	33,0	4,3359	5,1667
TTR P 60	4	24,0	22,0	4,3359	6,0000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	24,0000	0,3459	0,7294

Análise 225. Comparação do vigor espermático do jumento 1, no tempo TTR 120, para FlatPack, e TTR 60, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	2	5,0	7,0	1,7889	2,5000
TTR P 60	4	16,0	14,0	1,7889	4,0000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	5,0000	-0,8385	0,4017

Análise 226. Comparação do vigor espermático do jumento 1, no tempo TTR 60, nos dois tipos de envasamento

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 60	2	4,0	7,0	2,0	2,0000
TTR P 60	4	17,0	14,0	2,0	4,2500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	4,0000	-1,2500	0,2113

Análise 227. Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento e no tempo TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	28,0	27,0	2,8536	4,6667
TTR FP 120	2	8,0	9,0	2,8536	4,0000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	8,0000	-0,1752	0,8609

Análise 228. Comparação do vigor espermático do jumento 1, no momento do descongelamento e no tempo TTR 60, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	29,0	27,0	2,8909	4,8333
TTR FP 60	2	7,0	9,0	2,8909	3,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	7,0000	-0,5189	0,6038

Análise 229. Comparação do vigor espermático do jumento 1, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	2	6,0	5,0	1,0	3,0
TTR FP 60	2	4,0	5,0	1,0	2,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	6,0000	0,5000	0,6171

Análise 230. Comparação do efeito do período de avaliação e do tipo de envase sobre o vigor espermático, para o jumento 2

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	71,0	75,0	14,3022	11,8333
Desc. P	6	104,0	75,0	14,3022	17,3333
TTR FP 120	2	10,0	25,0	9,1289	5,0000
TTR FP 60	2	22,0	25,0	9,1289	11,0000
TTR P 120	4	30,0	50,0	12,3094	7,5000
TTR P 60	4	63,0	50,0	12,3094	15,7500

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	5	0,1154

Análise 231. Comparação do efeito do período de avaliação e do tipo de envase sobre o vigor espermático, para o jumento 3

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	131,0000	99,0	20,1680	21,8333
Desc. P	6	156,0000	99,0	20,1680	26,0000
TTR FP 120	4	25,0000	66,0	17,0887	6,2500
TTR FP 60	4	38,5000	66,0	17,0887	9,6250
TTR P 120	6	94,5000	99,0	20,1680	15,7500
TTR P 60	6	83,0000	99,0	20,1680	13,8333

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	5	0,0058

Análise 232. Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento, nos dois tipos de envasamento

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	31,5000	39,0	5,5881	5,2500
Desc. P	6	46,5000	39,0	5,5881	7,7500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	31,5000	-1,2527	0,2103

Análise 233. Comparação do vigor espermático do jumento 3, nos tempos descongelado e TTR 60, para as amostras envasadas em palhetas

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	50,5000	39,0	5,9658	8,4167
TTR P 60	6	27,5000	39,0	5,9658	4,5833

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	50,5000	1,8438	0,0652

Análise 234. Comparação do vigor espermático do jumento 3, nos tempos descongelado e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	53,0	39,0	5,8036	8,8333
TTR P 120	6	25,0	39,0	5,8036	4,1667

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	53,0000	2,3261	0,0200

Análise 235. Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento para palheta, e TTR 60, para FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	45,0	33,0	4,5314	7,5000
TTR FP 60	4	10,0	22,0	4,5314	2,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	10,0000	-2,5379	0,0112

Análise 236. Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento para palheta, e TTR 120, para o FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	45,0	33,0	4,4870	7,5000
TTR FP 120	4	10,0	22,0	4,4870	2,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	10,0000	-2,5630	0,0104

Análise 237. Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 120, para palheta.

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	48,5	39,0	5,9084	8,0833
TTR P 120	6	29,5	39,0	5,9084	4,9167

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	48,5000	1,5233	0,1277

Análise 238. Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 60, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	46,5	39,0	6,0678	7,7500
TTR P 60	6	31,5	39,0	6,0678	5,2500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	46,5000	1,1536	0,2487

Análise 239. Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento e no tempo TTR 60, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	44,0	33,0	4,5753	7,3333
TTR FP 60	4	11,0	22,0	4,5753	2,7500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	11,0000	-2,2949	0,0217

Análise 240. Comparação do vigor espermático do jumento 3, no momento do descongelamento e no tempo TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	44,5	33,0	4,5607	7,4167
TTR FP 120	4	11,5	22,0	4,5607	2,6250

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	10,5000	-2,4119	0,0159

Análise 241. Comparação do vigor espermático do jumento 3, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR P 120	6	42,0	39,0	6,1126	7,0
TTR P 60	6	36,0	39,0	6,1126	6,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	42,0000	0,4090	0,6825

Análise 242. Comparação do vigor espermático do jumento 3, no tempo TTR 60, para FlatPack, e TTR 120, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 60	4	15,5	22,0	4,3665	3,8750
TTR P 120	6	39,5	33,0	4,3665	6,5833

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	15,5000	-1,3741	0,1694

Análise 243. Comparação do vigor espermático do jumento 3, no tempo TTR 120, para os dois tipos de envase

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	4	12,5	22,0	4,4721	3,1250
TTR P 120	6	42,5	33,0	4,4721	7,0833
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	12,5000		-2,0125	0,0442	

Análise 244. Comparação do vigor espermático do jumento 3, no tempo TTR 60, nos dois tipos de envasamento

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 60	4	20,5	22,0	4,5314	5,1250
TTR P 60	6	34,5	33,0	4,5314	5,7500
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	20,5000		-0,2207	0,8253	

Análise 245. Comparação do vigor espermático do jumento 3, no tempo TTR 120, para FlatPack, e TTR 60, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	4	17,5	22,0	4,1633	4,3750
TTR P 60	6	37,5	33,0	4,1633	6,2500
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	17,5000		-0,9608	0,3367	

Análise 246. Comparação do vigor espermático do jumento 3, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	4	14,5	18,0	3,1623	3,6250
TTR FP 60	4	21,5	18,0	3,1623	5,3750
Teste	S		Z	P> Z 	
Wilcoxon	14,5000		-0,9487	0,3428	

Análise 247. Comparação do efeito do período de avaliação e do tipo de envase sobre o vigor espermático, para o jumento 4

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	141,0	99,0	20,3659	23,5000
Desc. P	6	171,0	99,0	20,3659	28,5000
TTR FP 120	4	19,0	66,0	17,2564	4,7500
TTR FP 60	4	39,5	66,0	17,2564	9,8750
TTR P 120	6	69,5	99,0	20,3659	11,5833
TTR P 60	6	88,0	99,0	20,3659	14,6667
Teste	GL		p		
Kruskal –Wallis	5		0,0002		

Análise 248. Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento, nos dois tipos de envasamento

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	27,0	39,0	5,5759	4,5000
Desc. P	6	51,0	39,0	5,5759	8,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	27,0000	-2,0624	0,0392

Análise 249. Comparação do vigor espermático do jumento 4, nos tempos descongelado e TTR 60, para as amostras envasadas em palhetas

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	57,0	39,0	6,0790	9,5000
TTR P 60	6	21,0	39,0	6,0790	3,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	57,0000	2,8788	0,0040

Análise 250. Comparação do vigor espermático do jumento 4, nos tempos descongelado e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	57,0	39,0	6,1681	9,5000
TTR P 120	6	21,0	39,0	6,1681	3,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	57,0000	2,8372	0,0046

Análise 251. Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento para palheta, e TTR 60, para FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	45,0	33,0	4,6043	7,5000
TTR FP 60	4	10,0	22,0	4,6043	2,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	10,0000	-2,4976	0,0125

Análise 252. Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento para a amostra envasada em palheta, e TTR 120, para o FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	45,0	33,0	4,5898	7,5000
TTR FP 120	4	10,0	22,0	4,5898	2,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	10,0000	-2,5055	0,0122

Análise 253. Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 60, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	53,0	39,0	5,7327	8,8333
TTR P 60	6	25,0	39,0	5,7327	4,1667

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	53,0000	2,3549	0,0185

Análise 254. Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 120, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	55,0	39,0	6,0114	9,1667
TTR P 120	6	23,0	39,0	6,0114	3,8333

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	55,0000	2,5785	0,0099

Análise 255. Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento e no tempo TTR 60, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	45,0	33,0	4,5166	7,5000
TTR FP 60	4	10,0	22,0	4,5166	2,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	10,0000	-2,5461	0,0109

Análise 256. Comparação do vigor espermático do jumento 4, no momento do descongelamento e no tempo TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	6	45,0	33,0	4,5019	7,5000
TTR FP 120	4	10,0	22,0	4,5019	2,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	10,0000	-2,5545	0,0106

Análise 257. Comparação do vigor espermático do jumento 4, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR P 120	6	33,5	39,0	5,7918	5,5833
TTR P 60	6	44,5	39,0	5,7918	7,4167

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	33,5000	-0,8633	0,3880

Análise 258. Comparação do vigor espermático do jumento 4, no tempo TTR 60, nos dois tipos de envasamento

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 60	4	15,5	22,0	4,5166	3,8750
TTR P 60	6	39,5	33,0	4,5166	6,5833

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	15,5000	-1,3284	0,1840

Análise 259. Comparação do vigor espermático do jumento 4, no tempo TTR 120, para FlatPack, e TTR 60, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	4	13,0	22,0	4,4721	3,2500
TTR P 60	6	42,0	33,0	4,4721	7,0000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	13,0000	-1,9007	0,0573

Análise 260. Comparação do vigor espermático do jumento 4, no tempo TTR 60, para FlatPack, e TTR 120, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 60	4	20,0	22,0	4,5607	5,0000
TTR P 120	6	35,0	33,0	4,5607	5,8333

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	20,0000	-0,3289	0,7422

Análise 261. Comparação do vigor espermático do jumento 4, no tempo TTR 120, para os dois tipos de envase

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	4	14,0	22,0	4,5461	3,5000
TTR P 120	6	41,0	33,0	4,5461	6,8333

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	14,0000	-1,6498	0,0990

Análise 262. Comparação do vigor espermático do jumento 4, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	4	12,0	18,0	3,2293	3,0000
TTR FP 60	4	24,0	18,0	3,2293	6,0000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	12,0000	-1,7031	0,0885

Análise 263. Comparação do efeito do período de avaliação e do tipo de envase sobre o vigor espermático, para o jumento 5

TempoXJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	5	81,0	60,0	13,0876	16,2000
Desc. P	6	96,5	72,0	13,9328	16,0833
TTR FP 120	2	10,0	24,0	8,9405	5,0000
TTR F 60	2	10,05	24,0	8,9405	5,0000
TTR P 120	4	26,5	48,0	12,0267	6,6250
TTR P 60	4	52,0	48,0	12,0267	13,0000

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	5	0,0422

Análise 264. Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento, nos dois tipos de envasamento

TempoXJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	5	27,0	30,0	5,1566	5,4000
Desc. P	6	39,0	36,0	5,1566	6,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	27,0000	-0,4848	0,6278

Análise 265. Comparação do vigor espermático do jumento 5, nos tempos descongelado e TTR 60, para as amostras envasadas em palhetas

TempoXJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	38,5	33,0	4,5166	6,4167
TTR P 60	4	16,5	22,0	4,5166	4,1250

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	16,5000	-1,1070	0,2683

Análise 266. Comparação do vigor espermático do jumento 5, nos tempos descongelado e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas

TempoXJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	41,0	33,0	4,6332	6,8333
TTR P 120	4	14,0	22,0	4,6332	3,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	14,0000	-1,6188	0,1055

Análise 267. Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento para palheta, e TTR 60, para FlatPack

TempoXJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	31,0	27,0	2,9459	5,1667
TTR FP 60	2	5,0	9,0	2,9459	2,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	5,0000	-1,1881	0,2348

Análise 268. Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento para a amostra envasada em palheta, e TTR 120, para o FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. P	6	31,0	27,0	2,9459	5,1667
TTR FP 120	2	5,0	9,0	2,9459	2,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	5,0000	-1,1881	0,2348

Análise 269. Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 60, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	5	30,0	25,0	3,6515	6,0000
TTR P 60	4	15,0	20,0	3,6515	3,7500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	15,0000	-1,2324	0,2178

Análise 270. Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento para FlatPack, e TTR 120, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	5	34,0	25,0	3,9441	6,8000
TTR P 120	4	11,0	20,0	3,9441	2,7500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	11,0000	-2,1551	0,0312

Análise 271. Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento e no tempo TTR 60, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	5	25,0	20,0	2,4398	5,0000
TTR FP 60	2	3,0	8,0	2,4398	1,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	3,0000	-1,8445	0,0651

Análise 272. Comparação do vigor espermático do jumento 5, no momento do descongelamento e no tempo TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Desc. FP	5	25,0	20,0	2,4398	5,0000
TTR FP 120	2	3,0	8,0	2,4398	1,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	3,0000	-1,8446	0,0651

Análise 273. Comparação do vigor espermático do jumento 5, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em palhetas

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR P 120	4	11,5	18,0	3,2514	2,8750
TTR P 60	4	24,5	18,0	3,2514	6,1250

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	11,5000	-1,8454	0,0650

Análise 274. Comparação do vigor espermático do jumento 5, no tempo TTR 60, nos dois tipos de envasamento

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 60	2	3,0	7,0	2,0	1,5000
TTR P 60	4	18,0	14,0	2,0	4,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	3,0000	-1,7500	0,0801

Análise 275. Comparação do vigor espermático do jumento 5, no tempo TTR 120, para FlatPack, e TTR 60, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	2	3,0	7,0	2,0	1,5000
TTR P 60	4	18,0	14,0	2,0	4,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	3,0000	-1,7500	0,0801

Análise 276. Comparação do vigor espermático do jumento 5, no tempo TTR 60, para FlatPack, e TTR 120, para palheta

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 60	2	6,0	7,0	2,0331	3,0000
TTR P 120	4	15,0	14,0	2,0331	3,7500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	6,0000	-0,2459	0,8057

Análise 277. Comparação do vigor espermático do jumento 5, nos tempos TTR 60 e TTR 120, para as amostras envasadas em FlatPack

TempoxJum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	2	5,0	5,0	0,0	2,5000
TTR FP 60	2	5,0	5,0	0,0	2,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	5,0000	0	1,0000

Análise 278. Comparação do vigor espermático do jumento 5, no tempo TTR 120, para os dois tipos de envase

Tempo x Jum	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
TTR FP 120	2	6,0	7,0	2,0331	3,0000
TTR P 120	4	15,0	14,0	2,0331	3,7500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	6,0000	-0,2459	0,8057

Análise 279. Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	6	96,0	90,0	17,4270	16,0000
2	6	45,0	90,0	17,4270	7,5000
3	6	79,0	90,0	17,4270	13,1667
4	6	150,0	90,0	17,4270	25,0000
5	5	65,0	75,0	16,2508	13,0000

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	4	0,0039

Análise 280. Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 4, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	6	25,5	39,0	5,7918	4,2500
4	6	52,5	39,0	5,7918	8,7500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	25,5000	-2,2445	0,0248

Análise 281. Comparação do vigor espermático entre jumentos 3 e 4, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
3	6	22,5	39,0	6,0114	3,7500
4	6	55,5	39,0	6,0114	9,2500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	22,5000	-2,6616	0,0078

Análise 282. Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 4, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	6	21,0	39,0	6,0678	3,5000
4	6	57,0	39,0	6,0678	9,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	21,0000	-2,8841	0,0039

Análise 283. Comparação do vigor espermático entre jumentos 4 e 5, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
4	6	48,0	36,0	5,1962	8,0000
5	5	18,0	30,0	5,1962	3,6000
Teste	S		Z	P> Z	
Wilcoxon	18,0000		-2,2132	0,0269	

Análise 284. Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 3, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	6	43,5	39,0	5,4772	7,2500
3	6	34,5	39,0	5,4772	5,7500
Teste	S		Z	P> Z	
Wilcoxon	43,5000		0,7303	0,4652	

Análise 285. Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 5, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	6	39,0	36,0	4,9543	6,5000
5	5	27,0	30,0	4,9543	5,4000
Teste	S		Z	P> Z	
Wilcoxon	27,0000		0,5046	0,6138	

Análise 286. Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 2, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	6	51,0	39,0	5,5391	8,5000
2	6	27,0	39,0	5,5391	4,5000
Teste	S		Z	P> Z	
Wilcoxon	51,0000		2,0761	0,0379	

Análise 287. Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 3, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	6	29,0	39,0	5,2354	4,8333
3	6	49,0	39,0	5,2354	8,1666
Teste	S		Z	P> Z	
Wilcoxon	29,0000		-1,8146	0,0696	

Análise 288. Comparação do vigor espermático entre jumentos 3 e 5, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
3	6	36,0	36,0	4,9681	6,0
5	5	30,0	30,0	4,9681	6,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	30,0000	0	1,0000

Análise 289. Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 5, para as amostras envasadas em palhetas, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	6	31,0	36,0	4,9955	5,1667
5	5	35,0	30,0	4,9955	7,0000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	35,0000	0,9008	0,3677

Análise 290. Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em palhetas, no tempo TTR 60

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	4	48,0	50,0	11,9146	12,0000
2	4	48,0	50,0	11,9146	12,0000
3	6	95,5	75,0	13,8435	15,9167
4	6	79,0	75,0	13,8435	13,1667
5	4	29,5	50,0	11,9146	7,3750

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	4	0,3769

Análise 291. Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em palhetas, no tempo TTR 120

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	4	77,0	50,0	12,3711	19,2500
2	4	44,0	50,0	12,3711	11,0000
3	6	60,5	75,0	14,3739	10,0833
4	6	84,5	75,0	14,3739	14,0833
5	4	34,0	50,0	12,3711	8,5000

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	4	0,1556

Análise 292. Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	6	70,5	93,0	18,3776	11,7500
2	6	61,0	93,0	18,3776	10,1667
3	6	102,0	93,0	18,3776	17,0000
4	6	152,0	93,0	18,3776	25,3333
5	6	79,5	93,0	18,3776	13,2500

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	4	0,0140

Análise 293. Comparação do vigor espermático entre jumentos 3 e 4, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
3	6	26,0	39,0	5,9084	4,3333
4	6	52,0	39,0	5,9084	8,6667

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	26,0000	-2,1156	0,0344

Análise 294. Comparação do vigor espermático entre jumentos 4 e 5, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
4	6	54,0	39,0	5,8621	9,0
5	6	24,0	39,0	5,8621	4,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	54,0000	2,4735	0,0134

Análise 295. Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 4, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	6	24,0	39,0	5,9084	4,0
4	6	54,0	39,0	5,9084	9,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	24,0000	-2,4541	0,0141

Análise 296. Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 4, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	6	23,0	39,0	6,0114	3,8333
4	6	55,0	39,0	6,0114	9,1667

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	23,0000	-2,5785	0,0099

Análise 297. Comparação do vigor espermático entre jumentos 3 e 5, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
3	6	45,0	39,0	5,7327	7,5000
5	6	33,0	39,0	5,7327	5,5000

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	45,0000	0,9594	0,3374

Análise 298. Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 3, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	6	32,0	39,0	5,8387	5,3333
3	6	46,0	39,0	5,8387	7,6667

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	32,0000	-1,1133	0,2656

Análise 299. Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 3, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	6	30,0	39,0	5,9886	5,0
3	6	48,0	39,0	5,9886	8,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	30,0000	-1,4194	0,1558

Análise 300. Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 5, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	6	36,0	39,0	5,7327	6,0
5	6	42,0	39,0	5,7327	7,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	36,0000	-0,4361	0,6628

Análise 301. Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 3, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	6	30,0	39,0	5,9886	5,0
3	6	48,0	39,0	5,9886	8,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	30,0000	-1,4194	0,1558

Análise 302. Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 5, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	6	36,0	39,0	5,7327	6,0
5	6	42,0	39,0	5,7327	7,0

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	36,0000	0,4361	0,6628

Análise 303. Comparação do vigor espermático entre jumentos 2 e 5, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
2	6	34,5000	39,0	5,8968	5,7500
5	6	43,5000	39,0	5,8968	7,2500

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	34,5000	-0,6783	0,4976

Análise 304. Comparação do vigor espermático entre jumentos 1 e 2, para as amostras envasadas em FlatPacks, no momento do descongelamento do sêmen

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	6	41,5000	39,0	5,9658	6,9167
2	6	36,5000	39,0	5,9658	6,0833

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	41,5000	0,3352	0,7374

Análise 305. Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em FlatPacks, no tempo TTR 60

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	2	14,0000	15,0	5,0383	7,0000
2	2	21,0000	15,0	5,0383	10,5000
3	4	31,5000	30,0	6,5044	7,8750
4	4	31,5000	30,0	6,5044	7,8750
5	2	7,0000	15,0	5,0383	3,5000

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	4	0,4800

Análise 306. Comparação do vigor espermático entre jumentos, para as amostras envasadas em FlatPacks, no tempo TTR 120

Jumento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
1	2	26,0000	15,0	4,9124	13,0000
2	2	17,5000	15,0	4,9124	8,7500
3	4	32,5000	30,0	6,3419	8,1250
4	4	16,0000	30,0	6,3419	4,0000
5	2	13,0000	15,0	4,9124	6,5000

Teste	GL	p
Kruskal-Wallis	4	0,0827

8.4.4. Análises estatísticas referentes às tabelas 4.17 e 4.18

Análise 307. Avaliação dos ejaculados, por jumento, segundo a motilidade ($>30\%$), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Jumentos	Aprovados	Reprovados	Total
1	66,67 (8/12)	33,33 (4/12)	20,34 (12/59)
2	50,00 (6/12)	50,00 (6/12)	20,34 (12/59)
3	91,67 (11/12)	8,33 (1/12)	20,34 (12/59)
4	100,00 (12/12)	0,00 (0/12)	20,34 (12/59)
5	54,55 (6/11)	45,45 (5/11)	18,64 (11/59)
Total	72,88 (43/59)	27,12 (16/59)	100,00 (59/59)

Teste Estatístico	Valor	GL	p
Qui-Quadrado	11,892	4	0,018

Análise 308. Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo a motilidade ($>30\%$), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Tipo de envase	Aprovados	Reprovados	Total
FP	60,00 (18/30)	40,00 (12/30)	50,85 (30/59)
Palheta	86,21 (25/29)	13,79 (4/29)	49,15 (29/59)
Total	72,88 (43/59)	27,12 (16/59)	100,00 (59/59)

Teste Estatístico	Valor	GL	p
Qui-Quadrado	5,124	1	0,024

Análise 309. Avaliação dos ejaculados, por jumento, segundo o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Jumentos	Aprovados	Reprovados	Total
1	75,00 (9/12)	25,00 (3/12)	20,34 (12/59)
2	50,00 (6/12)	50,00 (6/12)	20,34 (12/59)
3	83,33 (10/12)	16,67 (2/12)	20,34 (12/59)
4	100,00 (12/12)	0,00 (0/12)	20,34 (12/59)
5	63,64 (7/11)	36,36 (4/11)	18,64 (11/59)
Total	74,58 (44/59)	25,42 (15/59)	100,00 (59/59)

Teste Estatístico	Valor	GL	p
Qui-Quadrado	9,094	4	0,059

Análise 310. Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Tipo de envase	Aprovados	Reprovados	Total
FP	60,00 (18/30)	40,00 (12/30)	50,85 (30/59)
Palheta	89,66 (26/29)	10,34 (3/29)	49,15 (29/59)
Total	74,58 (44/59)	25,42 (15/59)	100,00 (59/59)

Teste Estatístico	Valor	GL	p
Qui-Quadrado	6,840	1	0,009

Análise 311. Avaliação dos ejaculados, por jumento, segundo a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Jumentos	Aprovados	Reprovados	Total
1	66,67 (8/12)	33,33 (4/12)	20,34 (12/59)
2	50,00 (6/12)	50,00 (6/12)	20,34 (12/59)
3	83,33 (10/12)	16,67 (2/12)	20,34 (12/59)
4	100,00 (12/12)	0,00 (0/12)	20,34 (12/59)
5	54,55 (6/11)	45,45 (5/11)	18,64 (11/59)
Total	71,19 (42/59)	28,81 (17/59)	100,00 (59/59)

Teste Estatístico	Valor	GL	p
Qui-Quadrado	9,951	4	0,041

Análise 312. Avaliação dos ejaculados, por tipo de envase, segundo a motilidade ($\geq 30\%$) e o vigor (≥ 3), visando a sua classificação (aprovados ou reprovados)

Tipo de envase	Aprovados	Reprovados	Total
FP	56,67 (17/30)	43,33 (13/30)	50,85 (30/59)
Palheta	86,21 (25/29)	13,79 (4/29)	49,15 (29/59)
Total	71,19 (42/59)	28,81 (17/59)	100,00 (59/59)

Teste Estatístico	Valor	GL	p
Qui-Quadrado	6,273	1	0,012

8.5. Análises Estatísticas Referentes ao Experimento III: Sincronização, indução da ovulação, inseminação artificial e fertilidade de fêmeas equinas inseminadas com sêmen asinino coletado de forma fracionada, diluído, envasado em FlatPacks e congelado.

8.5.1. Análises estatísticas referentes à tabela 4.22

Análise 313. Valores totais médios das variáveis utilizadas para avaliação das éguas, de acordo com o local de deposição do sêmen

Variável	N	Média	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	CV
Égua	18	75,9444	9,4113	10,0000	129,0000	52,5760
Idade	18	11,0277	0,6561	8,0000	17,5000	25,2429
Categoria Reprodutiva	18	2,6111	0,1645	1,0000	3,0000	26,7243
Tamanho Foliculo	18	3,6666	0,0867	3,4000	5,0000	10,0315
Grau de Edema Uterino	18	2,5000	0,1457	1,0000	3,0000	24,7339
hCG – 1º IA	18	29,8183	0,3190	24,5000	30,9300	4,5386
Jumentos	18	2,2777	0,3411	1,0000	5,0000	63,5414
Nº sptz/dose – 1ª IA	18	1368,15	131,6279	506,0000	2171,60	40,8179
hCG – 2º IA	18	42,2306	0,0778	42,0000	42,9300	0,7371
Nº sptz/dose – 2ª IA	18	1395,66	134,4983	757,8900	2207,16	38,5475
hCG – OV	18	40,5739	1,2913	24,0000	48,0000	13,5029
IA – OV	18	1,9444	0,0981	1,0000	3,0000	21,4033
Int. 2 últimas palpações	18	11,9072	0,8832	4,3300	24,0000	31,4679
Última palpação - OV	18	1,1111	0,1111	1,0000	3,0000	42,4264

Análise 314. Comparação da idade das éguas (anos), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Local	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
Ápice	11	11,2727	3,1652	0,9543	Desigual	0,4946	15,7	0,6277
Corpo	7	10,6429	2,2307	0,8431	Igual	0,4570	16,0	0,6538
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 2,01					DF= 10,6 Prob>F' = 0,4050			

Análise 315. Comparação do tamanho do folículo (cm), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Local	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
Ápice	11	3,6091	0,1814	0,0546	Desigual	-0,6780	6,8	0,5202
Corpo	7	3,7571	0,5593	0,2114	Igual	-0,8246	16,0	0,4217
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 9,51					DF= 6,10 Prob>F' = 0,0024			

Análise 316. Comparação do intervalo de tempo da administração da hCG à 1ª IA (horas), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Local	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
Ápice	11	29,5955	1,7030	0,5135	Desigual	-1,0812	11,3	0,3022
Corpo	7	30,1686	0,3484	0,1317	Igual	-0,8696	16,0	0,3974
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 23,89					DF= 10,6 Prob>F' = 0,0010			

Análise 317. Comparação do número de espermatozoides por dose inseminante na 1ª IA, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Local	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
Ápice	11	960,2055	171,9822	51,8546	Desigual	-10,5957	10,5	0,0001
Corpo	7	2009,2000	223,1306	84,3354	Igual	-11,2555	16,0	0,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,68					DF= 6,10 Prob>F' = 0,4450			

Análise 318. Comparação do intervalo de tempo da administração da hCG à 2ª IA (horas), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Local	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
Ápice	10	42,1990	0,2830	0,0895	Desigual	-0,4748	8,4	0,6470
Corpo	6	42,2833	0,3758	0,1534	Igual	-0,5116	14,0	0,6169
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,76					DF= 5,9 Prob>F' = 0,4329			

Análise 319. Comparação do número de espermatozoides por dose inseminante na 2ª IA, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Local	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
Ápice	10	1012,0130	92,5326	29,2614	Desigual	-9,2723	5,8	0,0001
Corpo	6	2035,0750	260,5872	106,3843	Igual	-11,4849	14,0	0,0000
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 7,93					DF= 5,9 Prob>F' = 0,0082			

Análise 320. Comparação do intervalo de tempo da administração da hCG à ovulação (horas), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Local	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
Ápice	11	40,3636	5,4272	1,6363	Desigual	-0,1938	12,0	0,8496
Corpo	7	40,9043	5,9786	2,2597	Igual	-0,1983	16,0	0,8453
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,21					DF= 6,10 Prob>F' = 0,7487			

Análise 321. Comparação do intervalo de tempo entre as duas últimas palpações (horas), entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Local	N	Média	DP	Erro P	Variância	T	DF	Prob> T
Ápice	11	13,0909	3,6181	1,0909	Desigual	1,8150	13,6	0,0916
Corpo	7	10,0471	3,3698	1,2737	Igual	1,7849	16,0	0,0933
Para Ho: Variâncias são iguais, F'= 1,15					DF= 10,6	Prob>F' = 0,9000		

Análise 322. Compara as categorias reprodutivas, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Frequência	Solteira	Cio do potro	Parida	Total
Ápice	1	3	7	11
Corpo	1	0	6	7
Total	2	3	13	18

Teste Estatístico	Valor	GL	p
Qui-Quadrado	2,302	2	0,316

Análise 323. Comparação do grau de edema uterino, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Tratamento	N	Sum Sco.	Expected	DP	Média
Ápice	11	106,0	104,5000	9,7011	9,6364
Corpo	7	65,0	66,5000	9,7011	9,2857

Teste	S	Z	P> Z
Wilcoxon	65,0000	-0,1031	0,9179

Análise 324. Comparação do grau de edema uterino, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Frequência	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Total
Ápice	0	5	6	11
Corpo	1	2	4	7
Total	1	7	10	18

Teste Estatístico	Valor	GL	p
Qui-Quadrado	1,890	2	0,389

Análise 325. Comparação do momento da última palpação em relação à ovulação, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Frequência	Pós ovulação	Pré ovulação	Total
Ápice	11	0	11
Corpo	6	1	7
Total			

Teste Estatístico	Valor	GL	p
Qui-Quadrado	1,664	1	0,197

Análise 326. Compara a distribuição dos jumentos, entre os tratamentos, de acordo com o local de deposição do sêmen

Frequência	Eclipse	Infante	Lorde	Prelúdio	Tigre	Total
Ápice	1	1	5	2	2	11
Corpo	1	1	3	1	1	7
Total	2	2	8	3	3	18

Teste Estatístico	Valor	GL	p
Qui-Quadrado	0,292	4	0,990