

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Colegiado de Pós Graduação em Ciência Animal

O uso de um novo diluidor para congelamento de sêmen de jumento na inseminação de fêmeas equinas com ovulação induzida.

FLÁVIA PEREIRA COSTA

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária - UFMG**  
**2015**

FLÁVIA PEREIRA COSTA

O uso de um novo diluidor para congelamento de sêmen de jumento na inseminação de fêmeas equinas com ovulação induzida.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a 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**  
**2015**

C837u Costa, Flávia Pereira, 1987-  
O uso de um novo diluidor para congelamento de sêmen de jumento na inseminação de fêmeas equinas com ovulação induzida / Flávia Pereira Costa. – 2015.  
154 p. : il.

Orientador: José Monteiro da Silva Filho  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

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

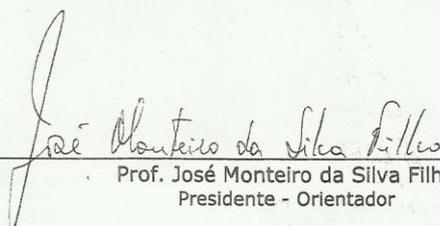
CDD – 636.108 926

## FOLHA DE APROVAÇÃO

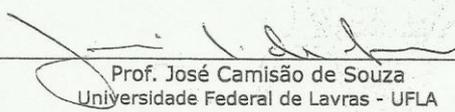
**FLÁVIA PEREIRA COSTA**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração REPRODUÇÃO ANIMAL.

Aprovada em 05 de março de 2015, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. José Monteiro da Silva Filho  
Presidente - Orientador

  
Prof. Marc Roger Jean Marie Henry  
Escola de Veterinária - UFMG

  
Prof. José Camisão de Souza  
Universidade Federal de Lavras - UFLA

  
Prof. Helton Mattana Saturnino  
Escola de Veterinária - UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Escola de Veterinária  
Av. Antônio Carlos, 6627 -  
Caixa Postal 567 - CEP 30123-970  
Belo Horizonte - Minas Gerais  
Telefone: (31) 3409-2057/2059(fax)  
[www.vet.ufmg.br](http://www.vet.ufmg.br)  
E-mail: [cap@vet.ufmg.br](mailto:cap@vet.ufmg.br)



Escola de Veterinária  
UFMG



## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Fernando e Marta.

Com amor, dedico.

"É melhor tentar e falhar que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar que em dias tristes me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver."

Martin Luther King

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original"

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar, por me dar forças para chegar até aqui e continuar seguindo em frente;  
Aos meus pais, Fernando e Marta e aos meus irmãos Fernanda e João Filipe, por me incentivar a ir mais longe, pelo carinho sempre presente, por entenderem minha ausência e por serem meu porto seguro.

Ao meu namorado Felipe, pela compreensão, companheirismo, incentivo e pelo amor, e à sua família pelo apoio.

Ao Toninho, Suely e toda sua família, pelo apoio, amizade e hospitalidade.

Ao meu cunhado Rafael, por toda sua ajuda.

À minha cunhada Isabela, pelo apoio.

Ao meu avô João, avó Marilda, avó Maria Antônia e todos os familiares que me apoiam e torcem por mim.

Ao professor José Monteiro, por ter me proporcionado tamanho crescimento pessoal e profissional.

À professora Maristela Palhares, pela disponibilidade para realização das análises estatísticas e pelo material cedido.

Ao Sr. Renato Resende, proprietário da Fazenda do Váú, pela grande receptividade para a realização dos experimentos, pela disponibilização dos animais e da infra-estrutura da fazenda.

À Sr<sup>a</sup> Sônia e filhas, Renata, Yolanda e Jaqueline, pelo apoio, amizade e por terem me recebido com todo o carinho em sua casa.

Aos funcionários da Fazenda do Váú, pela ajuda essencial no manejo dos animais e por todos os momentos de convivência.

À colega de orientação e doutoranda Raissa Rossi, por toda a ajuda.

Aos estagiários Érika e Pedro, pela ajuda prestada.

À amiga e estagiária Tatiana, por toda ajuda prestada, pela companhia, incentivo e amizade.

Às colegas da pós-graduação Beatriz Parzewski, Carolina Rezende, Clarice Muniz, Hariany Seabra, Mayara Brito, Natália Sollecito.

À Escola de Veterinária da UFMG, pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores do setor de Reprodução Animal, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Alan Maia Borges, Antônio de Pinho Marques Júnior, Marc Henry, Monique Lagares e Vicente Ribeiro do Vale Filho pelos ensinamentos transmitidos durante o curso

Aos funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, especialmente ao Fábio, Jefferson, Tião, Dário e Lili, por toda ajuda.

Aos funcionários e a coordenação do Colegiado de Pós-graduação em Ciência Animal pelo apoio.

Aos membros da banca examinadora.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos animais utilizados durante o período experimental.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, expresso meus sinceros agradecimentos.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>3.1. Fatores inerentes aos reprodutores equídeos, com ênfase no jumento</b> .....	17
3.1.1. Individualidade do reprodutor.....	18
3.1.2. Características físicas e morfológicas do sêmen asinino: efeito da sazonalidade, raça, idade e peso sobre as mesmas.....	19
3.1.2.1. Características do plasma seminal dos asininos.....	22
3.1.3. Centrifugação do sêmen.....	23
3.1.4. Diluidores de sêmen.....	25
3.1.4.1. Diluidores utilizados para a centrifugação do sêmen.....	26
3.1.4.2. Diluidores utilizados para o resfriamento do sêmen.....	27
3.1.4.3. Diluidores utilizados para o congelamento do sêmen.....	29
3.1.4.4. Componentes dos diluidores de sêmen.....	30
3.1.4.4.1. Água.....	30
3.1.4.4.2. Açúcares.....	31
3.1.4.4.3. Eletrólitos.....	32
3.1.4.4.4. Macromoléculas.....	33
3.1.4.4.5. Estabilizantes de membrana.....	36
3.1.4.4.6. Tampões.....	37
3.1.4.4.7. Quelantes.....	37
3.1.4.4.8. Antioxidantes.....	38
3.1.4.4.9. Detergentes.....	40
3.1.4.4.10. Crioprotetores.....	40
3.1.4.4.11. Antibióticos.....	42
3.1.4.5. Concentração espermática por mL de sêmen diluído e dose inseminante.....	44
3.1.4.6. Resfriamento e congelamento do sêmen asinino.....	47
3.1.4.7. Sistema de envasamento e armazenamento do sêmen congelado.....	49
3.1.4.8. Descongelamento do sêmen asinino.....	50
3.1.4.9. Fertilidade de éguas e/ou jumentas inseminadas com sêmen fresco, resfriado ou congelado de asininos.....	51
<b>3.2. Fatores inerentes as fêmeas equinas</b> .....	68
3.2.1. Idade da égua.....	68
3.2.2. Categoria reprodutiva.....	70
3.2.3. Momento de deposição do sêmen no sistema genital da fêmea equídea em relação à ovulação.....	73
3.2.4. Efeito do local de deposição do sêmen no sistema genital da égua e da concentração espermática/dose inseminante sobre a fertilidade de éguas e jumentas.....	76
3.2.5. Número de inseminações artificiais por ciclo estral sobre a fertilidade de éguas ou jumentas inseminadas.....	78
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	81
<b>4.1. Localização e condições climáticas</b> .....	81
<b>4.2. Delineamento experimental</b> .....	81
4.2.1. Efeito de dois diluidores de sêmen sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga.....	81
4.2.2. Manejo reprodutivo e nutricional das éguas.....	84
4.2.3. Manejo reprodutivo e nutricional dos reprodutores.....	85

4.2.4. Diluidores utilizados .....	86
4.2.5. Coleta de sêmen.....	87
4.2.6. Avaliação física, pré-diluição, resfriamento e diluição final.....	88
4.2.7. Envasamento do sêmen em palhetas .....	90
4.2.8. Congelamento, descongelamento e avaliação do sêmen .....	90
4.2.9. Sincronização, indução e controle da ovulação, inseminação artificial e controle da gestação .....	91
4.2.9.1. Controle reprodutivo das éguas.....	91
4.2.9.2. Controle da ovulação.....	91
4.2.9.3. Inseminação artificial .....	91
<b>4.3. Análises estatísticas.....</b>	<b>92</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>5.1. Características físicas do sêmen asinino diluído, centrifugado, rediluído, resfriado, envasado em palhetas de 0,55mL e congelado .....</b>	<b>107</b>
5.1.1. Comportamento sexual, características do sêmen fresco, da centrifugação e do sêmen centrifugado .....	107
5.1.2. Intervalos de tempo avaliados no transcorrer do congelamento do sêmen, da coleta à inseminação artificial.....	109
5.1.3. Efeito do jumento e do diluidor sobre a motilidade e vigor do sêmen centrifugado e descongelado.....	112
<b>5.2. Efeito do diluidor e do jumento sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado .....</b>	<b>114</b>
5.2.1. Efeito do diluidor sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado.....	114
5.2.1.1 Características biométricas e fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga.....	114
5.2.1.2 Análise crítica do diluidor proposto .....	116
5.2.1.3 Número de ciclos estrais submetidos à tratamentos (antibióticos, PGF <sub>2</sub> α, oxitocina), considerando-se o diluidor, independentemente do jumento.....	124
5.2.2. Efeito do jumento sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado.....	124
5.2.2.1 Características biométricas e fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga.....	125
5.2.2.2 Número de ciclos estrais submetidos à tratamentos (antibióticos, PGF <sub>2</sub> α, oxitocina), considerando-se o jumento, independentemente do diluidor.....	126
5.2.2.3. Características do sêmen após o descongelamento, no momento da inseminação, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor.....	126
<b>5.3. Características do estro e da indução da ovulação de éguas inseminadas.....</b>	<b>127</b>
5.3.1. Características do estro e da indução da ovulação de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento.....	127
5.3.2. Características do cio e da indução da ovulação de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor.....	128
5.3.3 Momento da indução da ovulação.....	128
5.3.4 Distribuição das ovulações das éguas a diferentes intervalos de tempo (horas) após à aplicação da hCG.....	129
5.3.5 Distribuição das ovulações ao longo do dia.....	131
5.3.6. Distribuição das éguas segundo o edema uterino no momento da aplicação da hCG.....	132
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>135</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>136</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>150</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 4.1. Organograma para o controle reprodutivo das éguas .....	84
Figura 4.2. A: vesícula embrionária com 12dias, B: corpo lúteo (cl) à esquerda e a direita vesícula embrionária com 15 dias; C: vesícula embrionária com 18 dias; D: corpo lúteo à esquerda e a direita, vesícula embrionária com 30 dias de gestação; E: corpo lúteo à direita e a esquerda, feto com 68 dias de gestação; F: à esquerda corpo lúteo e a direita, feto com 81 dias de gestação.....	100
Figura 4.3. A,B, C, D: Preparação dos diluidores, ovos lavados e desinfetados com álcool, separação da gema pela passagem em papel filtro, transferência da gema de ovo para o Becker .	101
Figura 4.4. A, B: Tronco de coleta com rampa; C, D: Vagina artificial modelo Hannover .....	102
Figura 4.5. A: Sêmen em mamadeira plástica descartável com capacidade para 250mL; B:Sêmen diluído sendo dividido em tubos Falcon; C: Centrífuga programada à 23°C, 1700rpm (592xg); D: aspiração do sobrenadante; E: câmara hemocitométrica (Neubauer) utilizada para o cálculo da concentração espermática; F: balcão refrigerador .....	103
Figura 4.6. Protocolo para o congelamento de sêmen.....	89
Figura 4.7. A: bandeja com tela metálica; B: bandeja inferior e superior; C:caixa de congelamento; D e E: armazenamento das palhetas; F e G: descongelamento das palhetas; H, I: corte das extremidades das palhetas; J: higienização da vulva; K: Inseminação Artificial .....	104
Figura 4.8. Ficha de controle de fêmeas .....	105
Figura 4.9. Ficha da Coleta .....	106
Figura 4.10. Controle da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo, em éguas submetidas à aplicação da hCG, quando de um folículo $\geq 3,5$ cm em um dos ovários. ....	107
Figura 8.1: Imagens ultrassonográficas de todas as gestações obtidas.....	150

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 3.1 Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen asinino congelado.....	64
Tabela 3.2: Fertilidade de jumentas inseminadas com sêmen congelado de asininos .....	66
Tabela 4.1. Dados meteorológicos médios do período experimental.....	81
Tabela 4.2. Distribuição das fêmeas equinas por reprodutor e diluidor .....	82
Tabela 4.3. Distribuição percentual dos ciclos estrais por jumento de acordo com a categoria reprodutiva das fêmeas equinas, independentemente do diluidor.....	82
Tabela 4.4. Distribuição percentual dos ciclos estrais por jumento, de acordo com a idade das fêmeas equinas, independentemente do diluidor .....	82
Tabela 4.5. Distribuição percentual dos ciclos estrais por diluidor, de acordo com a categoria reprodutiva das fêmeas equinas, independentemente do jumento .....	83
Tabela 4.6. Distribuição percentual dos ciclos estrais por diluidor, de acordo com a idade das fêmeas equinas, independentemente do jumento.....	83
Tabela 4.7. Distribuição percentual dos ciclos estrais por diluidor e jumento, de acordo com a categoria reprodutiva das fêmeas equinas .....	83
Tabela 4.8. Distribuição percentual dos ciclos estrais por diluidor e jumento, de acordo com a idade das fêmeas equinas .....	84
Tabela 4.9. Composição da ração fornecida aos reprodutores.....	86
Tabela 4.10. Composição dos diluidores utilizados no experimento .....	87
Tabela 4.11. Teste de normalidade das variáveis brutas sem transformação, considerando-se o efeito do jumento.....	93
Tabela 4.12. Análises estatísticas envolvendo as variáveis não paramétricas, considerando-se o efeito do jumento.....	93

Tabela 4.13. Análises estatísticas envolvendo as variáveis com distribuição normal, considerando-se o efeito do jumento .....	94
Tabela 4.14. Teste de normalidade das variáveis brutas sem transformação, considerando-se o efeito do jumento.....	95
Tabela 4.15. Análises estatísticas envolvendo as variáveis não paramétricas, considerando-se o efeito do jumento.....	95
Tabela 4.16. Análises estatísticas envolvendo as variáveis com distribuição normal, considerando-se o efeito do jumento .....	96
Tabela 4.17. Análises estatísticas de características físicas do sêmen de jumentos da raça Pêga, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento, após a centrifugação e o descongelamento ...	96
Tabela 4.18. Teste de normalidade das variáveis brutas sem transformação e após transformação, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento .....	97
Tabela 4.19. Análises estatísticas envolvendo as variáveis com distribuição normal, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento, bem como as interações .....	97
Tabela 4.20. Análises estatísticas envolvendo as variáveis não paramétricas, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento .....	98
Tabela 4.21. Análises estatísticas envolvendo as variáveis dicotômicas, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento .....	98
Tabela 4.22. Análises estatísticas considerando-se o efeito do diluidor, independentemente do jumento.....	98
Tabela 4.23. Características seminais e fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o efeito do diluidor, independentemente do jumento.	99
Tabela 4.24. Análises estatísticas considerando-se o efeito do jumento, independentemente do diluidor .....	99
Tabela 4.25. Características seminais e fertilidade de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o efeito do jumento, independentemente do diluidor.....	99
Tabela 5.1. Comportamento sexual, características físicas do sêmen fresco e do centrifugado de jumentos da raça Pêga .....	108
Tabela 5.2. Características do protocolo de congelamento utilizado para o sêmen de jumentos da raça Pêga, da coleta do sêmen à inseminação artificial das éguas.....	110
Tabela 5.3. Características físicas do sêmen após a centrifugação e o descongelamento do sêmen, considerando-se o efeito do jumento (J1, J2) e do diluidor (D1, D2), bem como as suas interações (Jumento x diluidor). .....	112
Tabela 5.4. Distribuição das fêmeas equinas por categoria reprodutiva, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento.....	114
Tabela 5.5. Características biométricas de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento.....	115
Tabela 5.6. Número de éguas submetidas à tratamentos (antibióticos, $PGF_2\alpha$ , oxitocina), considerando-se o diluidor, independentemente do jumento.....	124
Tabela 5.7. Distribuição dos ciclos estrais por categoria reprodutiva, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor.....	125
Tabela 5.8. Características biométricas e fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor .....	125
Tabela 5.9. Número de ciclos estrais submetidos à tratamentos (antibióticos, $PGF_2\alpha$ , oxitocina) considerando-se o jumento, independentemente do diluidor.....	126
Tabela 5.10. Características do sêmen após o descongelamento, no momento da inseminação, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor.....	127
Tabela 5.11. Características do cio e da indução da ovulação de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento.....	127

Tabela 5.12. Características do cio e da indução da ovulação de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor .....	128
Tabela 5.13. Distribuição das ovulações à diferentes intervalos de tempo (horas), após à aplicação da hCG .....	131
Tabela 5.14. Distribuição das ovulações ao longo do dia por diluidor e jumento .....	132
Tabela 5.15. Distribuição das ovulações ao longo do dia considerando-se o diluidor, independentemente do jumento.....	132
Tabela 5.16. Distribuição das ovulações ao longo do dia, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor .....	132
Tabela 5.17. Distribuição do escore de edema uterino quando da indução da ovulação por diluidor e jumento .....	133
Tabela 5.18. Distribuição do escore de edema uterino quando da indução da ovulação, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento.....	133
Tabela 5.19. Distribuição do escore de edema uterino quando da indução da ovulação, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor.....	133
Tabela 5.20. Distribuição do escore de edema uterino quando do último controle folicular por diluidor e jumento .....	134
Tabela 5.21. Distribuição do escore de edema uterino quando do último controle folicular, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento.....	134
Tabela 5.22. Distribuição do escore de edema uterino quando do último controle folicular, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor.....	134
Tabela 8.1. Distribuição das fêmeas equinas por categoria reprodutiva, diluidor e jumento.....	154
Tabela 8.2. Característicaxtaxa de gestação/ciclo de fêmeas equinas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga .....	154
Tabela 8.3. Características do cio e da indução da ovulação de fêmeas equinas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento .	154

## RESUMO

O presente estudo foi conduzido no município de Lagoa Dourada, Estado de Minas Gerais, entre os meses de Dezembro de 2013 à Março de 2014. Pretendeu-se com este estudo propor, produzir e utilizar um novo diluidor para o congelamento do sêmen de jumentos, como um dos componentes de um novo protocolo de congelamento. Avaliou-se ainda, as taxas de gestação de éguas inseminadas após a detecção de uma ovulação induzida pela hCG, submetidas à controles foliculares a cada 8 horas a partir da aplicação da droga, na presença de um folículo acima de 30-35mm e edema uterino  $\geq 2$ . Foram utilizados dois jumentos da raça Pêga como doadores de sêmen. Após a coleta, o sêmen foi submetido a um protocolo de congelamento, utilizando dois diluidores, sendo eles: o diluidor de leite em pó desnatado-glicose (LPDG)- gema de ovo-etilenoglicol (Jepsen, 2010) e o diluidor PIVO-2013. As éguas foram inseminadas após a detecção da ovulação, com uma concentração de  $1 \times 10^9$  espermatozoides móveis pré - congelamento/dose inseminante de 5mL, sendo o sêmen depositado no corpo do útero, por via intravaginal profunda. Em virtude das variações observadas após o descongelamento do sêmen, quanto à motilidade ( $30,00 \pm 0,00 - 33,89 \pm 0,73\%$ ) e vigor ( $3,71 \pm 0,07 - 4,17 \pm 0,14$ ), utilizou-se concentrações de  $300,00 \times 10^6$  a  $338,89 \pm 10^6$  espermatozoides móveis/ dose inseminante, no momento das inseminações. As taxas de gestação obtidas foram de 23,81% (5/21) e 55,56% (10/18), respectivamente, para os diluidores LPDG e PIVO-2013 ( $p < 0,05$ ). As características seminais diferiram entre os jumentos, evidenciando a presença de variação individual. Assim, as taxas de gestação por jumento foram de 28,57% (6/21) e 50% (9/18), respectivamente, para os jumentos 1 e 2. A administração de 1666 UI da hCG foi eficiente para promover a indução da ovulação, sendo que a sua maioria ocorreu dentro de 32 a 40 horas, após a indução.

Palavras-chave: jumento, diluidor, congelamento, taxa de gestação.

## ABSTRACT

This study was carried out in Lagoa Dourada county, Minas Gerais State, from December 2013 to March 2014, with the aim of propose, produce and utilize a new extender for freezing donkey semen, as part of a new protocol. Also, the pregnant rates of mares inseminated after detection of ovulation, induced by hCG, were evaluated. Those animals were submitted to a follicular control at every 8-hour interval after drug administration, when a follicle higher than 30-35mm diameter and uterine edema  $\geq 2$  were recorded. Two Pêga breed donkeys were used as semen donors. After collection, semen was frozen using two extenders: (1) glucose-skimmed milk powder (GSMP) – egg yolk – ethylene glycol (Jepsen, 2010) and (2) PIVO-2013. Mares were inseminated post-ovulation with frozen-thawed semen, from both extenders with an insemination dose of 5mL ( $300.00 \times 10^6 - 338.89 \pm 7,35 \times 10^6$  mobile spermatozoa / insemination dose), with deposition of semen inside the uterus body. The pregnant rates were 23.81% (5/21) and 55.56% (10/18), respectively, for extenders 1 and 2 ( $p < 0,05$ ), respectively. Seminal characteristics differed between donkeys, showing individual variation. The pregnant rates per donkey were 28.57% (6/21) and 50% (9/18), respectively, for donkeys 1 and 2. The administration of 1,666 IU of hCG was efficient to induce ovulation, being the majority of the ovulations observed within 30 to 40h after induction.

Keywords: donkey, extender, freezing, pregnant rate

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial de equídeos está estimada em 113.473.522 de cabeças, sendo 58.770.171 de equinos, 43.496.677 de asininos e 11.206.674 de muares (FAO, 2008), sendo o rebanho brasileiro estimado em 7.986.023 de animais (IBGE, 2008). Os equinos contribuem com 5,514 milhões de cabeças, os asininos com 1,002 milhões e os muares com 1,277 milhões de cabeças (IBGE, 2010). De acordo com a FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations), o Brasil em 2010, possuía a terceira maior população de muares do mundo, constituída por 1.277.420 animais (11,84% da população mundial). Diante dos dados apresentados anteriormente pode-se afirmar que a equideocultura, no Brasil, ainda exerce um importante papel sócio-econômico. Devido a esta importância, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas envolvendo diferentes aspectos da equideocultura, notadamente as biotecnologias da reprodução. No que diz respeito à espécie asinina, estas biotecnologias se destinam, principalmente, à produção de muares, envolvendo a inseminação de éguas com sêmen fresco diluído, resfriado ou congelado de asininos (Silva, 1988; Ferreira, 1993; Leite, 1994; Rossi, 2008; Carvalho, 2011; Sales, 2011; Rocha, 2012).

A tecnologia da inseminação artificial teve sua origem há muito, havendo citação na literatura envolvendo o roubo do sêmen de um garanhão de uma tribo rival para inseminar uma égua de um chefe árabe. Por sua vez, o desenvolvimento da inseminação artificial moderna começou na Rússia e na China no início do século 20 com os equinos, embora a primeira gestação equina a partir de sêmen congelado e descongelado tenha se dado em 1957; após 10 anos, relatou-se a primeira gestação bem sucedida de uma égua gestando um embrião muar, associado ao sêmen congelado e descongelado (Jepsen, 2007). Atualmente no Brasil, o reprodutor asinino tem sido mais frequentemente utilizado como doador de sêmen para a produção de muares, animais bastante desejáveis no meio rural, dotados de grande força e resistência física, além de sua alta rusticidade. Além disto, em muitos países tem ocorrido o aumento do número de pesquisas envolvendo a reprodução de asininos, seja para a preservação de raças em extinção (Serres *et al.*, 2002), ou pelo reaquecimento da economia, com aumento da valorização de asininos e muares de marcha. Além disso, a espécie asinina (*Equus asinus*) tem desempenhado um papel importante junto à humanidade, servindo para tração e transporte, principalmente em áreas áridas e semiáridas do planeta (Peña-alfaro *et al.*, 2012). Segundo Legha, Yash Pal e Singh (2012), os muares têm sido muito utilizados na Índia, para fins civis e militares, principalmente para o transporte de carga e de armamentos em regiões montanhosas e terrenos de difícil acesso. Entretanto, a escassez de bons jumentos tem sido um obstáculo para a produção de muares de qualidade. Segundo estes autores, a utilização do sêmen congelado poderia, em tese, resolver este problema, ou seja, o desenvolvimento de técnicas adequadas para a preservação e o armazenamento do sêmen possibilitaria um melhor aproveitamento de animais de alto valor zootécnico. Além disso, possibilitaria a utilização de animais que não possam temporária ou permanentemente serem utilizados na reprodução e o transporte do sêmen a longas distâncias (Terraciano *et al.*, 2008).

Os jumentos pertencem ao mesmo grupo taxonômico dos garanhões, de forma que as tecnologias utilizadas para garanhões têm sido adaptadas para os jumentos. Entretanto, embora o sêmen dos garanhões e dos jumentos apresentem características similares, existem peculiaridades de cada espécie (Nishikawa, 1959). É importante ressaltar a individualidade de cada reprodutor, dentro de uma mesma espécie, o que vale também para a espécie asinina (Ferreira, 1993; Rossi, 2008; Carvalho, 2011), notadamente no que se refere à resistência das

células espermáticas às baixas temperaturas de armazenamento e à sua fertilidade, quando da utilização do sêmen fresco, resfriado e principalmente do congelado. Assim, nem todos os reprodutores equídeos produzem células espermáticas que suportam os processos de resfriamento e armazenamento para transporte, bem como ao congelamento, em virtude da grande variabilidade existente entre indivíduos. Alguns garanhões apresentam sêmen de boa qualidade após a coleta; no entanto, esse vai perdendo a sua qualidade durante o resfriamento com poucos espermatozoides sobrevivendo ao processo (Brinsko *et al.*, 2000).

Apesar do reduzido número de pesquisas nesta área, a demanda por novas tecnologias envolvendo a criopreservação do sêmen asinino vem aumentando nos últimos anos. No entanto, ainda é grande a diversidade de informações sobre as técnicas de criopreservação, incluindo os diluidores de sêmen e as curvas de resfriamento e congelamento ideais. O mesmo pode ser dito quanto ao melhor momento para a inseminação artificial, considerando-se a viabilidade do oócito da égua e da jumenta após a ovulação, e a manutenção da habilidade fecundante dos espermatozoides após a sua deposição no sistema genital das fêmeas equídeas. Há que se salientar, ainda, a determinação da concentração ideal por dose inseminante, considerando-se os diferentes tipos de sêmen utilizados, a saber: fresco, resfriado ou congelado.

O processo de centrifugação do sêmen varia de acordo com cada autor, entretanto, o tempo de centrifugação mais comumente utilizado, está entre 10-15 minutos à uma velocidade de 400-600 x g (Brugué, 2010). O efeito deletério do plasma seminal quando do armazenamento do sêmen equídeo “in vitro” é reconhecido e descrito por vários autores (Morais *et al.*, 1994; Brinsko *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2000; Len *et al.*, 2010). Deste modo, para o congelamento de sêmen, tem sido preconizada a retirada do plasma seminal, substituindo-o por um diluidor compatível com as células espermáticas e, ao mesmo tempo, livre de efeitos tóxicos (Morais *et al.*, 1994).

Os diluidores mais utilizados para a diluição, resfriamento e congelamento do sêmen de equinos e asininos possuem, em sua constituição, macromoléculas oriundas da gema de ovo e do leite capazes de fornecer proteção aos espermatozoides contra os danos causados pelo resfriamento (Mello *et al.*, 2000). Além disso, os crioprotetores devem ser adicionados aos diluidores de sêmen para que haja uma proteção das células espermáticas, durante os processos de criopreservação e descongelamento (Squires *et al.*, 1999; Arruda, 2000). Entretanto, o glicerol, o crioprotetor mais comumente utilizado na criopreservação do sêmen de garanhões, tem demonstrado ser tóxico para o sêmen dos jumentos (Vidament *et al.*, 2009; Rota *et al.*, 2012).

Um dos pontos mais críticos para o sucesso do congelamento é a velocidade de resfriamento do sêmen (Snoeck *et al.*, 2001). O resfriamento lento pode causar danos às células devido às altas concentrações de soluto intracelular, resultantes do processo. Por outro lado, o resfriamento rápido (60°C/min) pode provocar a recristalização após o descongelamento, com formação de grandes cristais de gelo, que podem causar danos físicos às células (Graham, 1996). A fase mais crítica no transcorrer do processo de resfriamento se deu entre as temperaturas de 19 à 8°C (Moran *et al.*, 1992), embora no congelamento, ocorresse entre as temperaturas de -15 e -60°C (Parks e Graham, 1992).

Além dos cuidados no processamento do sêmen, é de grande importância saber o momento certo para a deposição do sêmen no útero da fêmea (Silva Filho *et al.*, 1998), principalmente, quando se utiliza sêmen congelado/descongelado. A fertilização requer um oócito maduro e espermatozoides capazes de alcançá-lo e penetrá-lo (Stone, 1994). A viabilidade da célula espermática é reduzida após o processo de congelamento e descongelamento, assim, sua longevidade e capacidade de fecundação são diminuídas. Por este motivo, a inseminação

artificial deve ser realizada imediatamente após o descongelamento do sêmen, bem próximo ao momento da ovulação. O ideal é que se faça controle folicular com acompanhamento ultrasonográfico, a fim de se prever o momento da ovulação e decidir o melhor momento para a inseminação (Brinsko e Varner, 1993). Vale salientar que após 8-10 horas da ovulação, maior será a taxa de perda embrionária (Woods *et al.*, 1990), em virtude das alterações degenerativas que acontecem no oócito.

Quando se utiliza a inseminação com sêmen congelado, é comum induzir a ovulação das éguas. As ovulações induzidas com hCG, na presença de grande edema uterino e de um folículo entre 35 a 40mm de diâmetro ocorrem de 36 a 48 horas pós indução, com 95% de eficácia nos dois primeiros ciclos, na maioria das éguas (Samper, 1997). Uma única dose da hCG tem sido utilizada para induzir a ovulação. Aparentemente, não existe uma dose padrão a ser utilizada, que tem variado, desta forma, de 1000 UI a 6000 UI ou mais, sendo que na maioria das vezes, utilizam-se doses entre 2000 e 3000 UI (Bergefelt, 2000).

Poucos são os estudos envolvendo o congelamento do sêmen de jumentos que realizaram avaliação das taxas de gestação das éguas, bem como do percentual de perdas gestacionais (Gama Ker, 2009). Entretanto, alguns pesquisadores do mundo, tem estudado a fertilidade de éguas (Krause e Grove, 1967; Oliveira, 2005; Canisso, 2008; Vidament *et al.*, 2009 e Jepsen *et al.*, 2010) ou jumentas (Trimeche *et al.*, 1998; Oliveira, 2005; Rozas, 2005; Rota *et al.*, 2012) cobertas ou inseminadas com sêmen asinino a fresco, resfriado ou congelado. Dentre os trabalhos mais recentes, vale salientar o conduzido na Índia, por Legha, Yash Pal e Singh (2012), no qual obteve-se uma taxa de gestação média de 43,5% (67/154), ao inseminarem éguas. Por outro lado, Rota e colaboradores (2012) na Universidade de Pisa, Itália, obtiveram uma taxa de gestação de 61,54% (8/13) em jumentas, quando associaram ao sêmen, após o descongelamento, o plasma seminal, antes das inseminações.

Os protocolos utilizados para a criopreservação do sêmen asinino, não tem ainda uma padronização, sendo várias as metodologias utilizadas, o que torna a sua comparação bem difícil, notadamente no que se refere as taxas de gestação obtidas. Existem poucas publicações envolvendo a mensuração da capacidade fecundante do sêmen asinino congelado, como citado anteriormente.

## **2. OBJETIVOS**

Pretendeu-se com este estudo:

- 1- propor, produzir e utilizar um novo diluidor para o congelamento do sêmen de jumentos, como um dos componentes de um novo protocolo de congelamento;
- 2- estudar as características do cio e da indução da ovulação de éguas submetidas a aplicação da hCG e a controles foliculares a cada 8 horas, a partir da aplicação da droga;
- 3- avaliar os efeitos do diluidor, do jumento e das suas interações sobre as taxas de gestação de éguas inseminadas após a detecção da ovulação.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Fatores inerentes aos reprodutores equídeos, com ênfase no jumento**

### 3.1.1 Individualidade do reprodutor

Nem todos os reprodutores equídeos produzem células espermáticas que suportam os processos de resfriamento e armazenamento para transporte, em virtude da grande variabilidade existente entre indivíduos. Assim, um dos principais fatores capazes de afetar a longevidade do sêmen equino durante o armazenamento e o transporte, é o próprio reprodutor. A motilidade espermática varia de acordo com cada reprodutor, que são assim classificados como bons ou ruins, de acordo com a manutenção da viabilidade espermática durante o armazenamento do sêmen. Alguns garanhões apresentam sêmen de boa qualidade após a coleta; no entanto, o sêmen vai perdendo a sua qualidade durante o resfriamento com poucos espermatozoides sobrevivendo ao processo (Brinsko *et al.*, 2000). Estima-se que apenas 30-40% dos garanhões produzam sêmen adequado para a criopreservação (Alvarenga *et al.*, 2003).

A espécie equina possui os índices mais baixos de fertilidade quando comparada com as demais espécies domésticas. Parte dessas observações estão relacionadas ao fato de que nesta espécie, não houve seleção para a fertilidade. Além disso, há uma tendência de se atribuir à fêmea os problemas de infertilidade, o que impede uma avaliação mais criteriosa do reprodutor (Fernandes e Pimentel, 2002). Quando se tem a fertilidade como meta, deve-se levar em conta à fêmea, o macho e o meio ambiente (Hammes *et al.*, 1996).

Segundo Amann *et al.* (1987) a motilidade e a fertilidade do sêmen descongelado difere muito entre os garanhões. Uma das causas desta variação é relativa às diferenças do próprio plasma seminal. A susceptibilidade das células ao estresse oxidativo varia entre espécies, indivíduos e entre ejaculados, conseqüentemente, a incidência e a severidade do dano oxidativo também variam (Maia e Bicudo, 2009). As alterações da morfologia espermática, que apresenta grande variação entre os indivíduos durante o período reprodutivo, também influenciam a eficiência reprodutiva do garanhão (Hammes *et al.*, 1996).

Além das variações entre reprodutores, também existem variações entre ejaculados de um mesmo reprodutor. Em asininos, essas variações foram observadas por diferentes autores (Mann *et al.*, 1963; Miró *et al.*, 2005; Rossi, 2008; Legha *et al.*, 2013). Segundo Mann *et al.* (1963) tais variações envolvendo o sêmen de diferentes animais ou mesmo ejaculados de um mesmo animal, podem estar associadas às variações sazonais, bem como à faixa etária.

Miró *et al.* (2005) ao avaliarem o sêmen de quatro jumentos da raça Catalã, observaram diferenças quanto à composição do sêmen e motilidade espermática entre os jumentos, bem como entre os ejaculados de um mesmo jumento. Amann *et al.* (1987) observaram variações significativas nas concentrações de sódio, cálcio e cloro presentes no plasma seminal de sete garanhões.

Legha *et al.* (2013) avaliaram dez jumentos indianos, sendo os reprodutores divididos em grupos, de acordo com a idade (jovens: 4,5- 5,0 ou adultos: 5,5-8,0 anos) e peso corporal (leves:  $98,20 \pm 1,81$  kg e pesados:  $130,80 \pm 5,60$  kg). Neste trabalho, não observou-se efeito de idade nem do peso nos valores de pH, volume total, volume de gel, concentração espermática e motilidades total e progressiva. O sêmen dos jumentos jovens apresentou maior percentual de espermatozoides vivos do que o de adultos. O grupo de jumentos leves apresentou maior percentual de espermatozoides vivos do que o grupo de jumentos pesados.

Ao avaliarem o sêmen resfriado de jumentos da raça Amiata, Rota *et al.* (2008) observaram variações envolvendo características espermáticas, tais como motilidades total e progressiva, entre reprodutores. Até 72 horas de armazenamento à 5°C, encontrou-se variações entre os jumentos, quanto ao percentual de redução da motilidade espermática.

Em um estudo envolvendo o sêmen de cinco jumentos da raça Pêga, Rossi (2008) observou diferenças significativas no que diz respeito às características seminais, entre os jumentos, quanto ao volume de sêmen, número de espermatozoides/mL, vigor e motilidade espermáticas, bem como quanto ao número de montas por ejaculado. O número potencial de éguas a serem inseminadas por ejaculado variou entre os reprodutores, assim como a taxa de gestação por ciclo estral de éguas inseminadas que também diferiu entre jumentos. Assim, quando utilizou o sêmen a fresco diluído de quatro jumentos, a autora obteve taxas de gestação variando de 35,71 a 71,43% ao inseminar éguas. O sêmen resfriado dos mesmos jumentos foi utilizado para inseminar fêmeas equinas, quando obteve-se taxas de gestação variando de 36,21 a 74,47% ( $p < 0,05$ ).

Os três primeiros jatos que compõem a fração rica do ejaculado de cinco jumentos da raça Pêga foram caracterizados por Carvalho (2011). Observou-se diferenças significativas entre os machos quanto ao número de montas por ejaculado, motilidade e vigor espermáticos do sêmen *in natura* e após diluição, concentração de espermatozoides totais e móveis por mL. Não houve diferença entre os volumes dos jatos dentro de cada jumento, embora houvesse uma tendência de redução da motilidade do primeiro para o terceiro jato, para todos os jumentos. Entretanto, não observou-se diferenças estatísticas para esta característica entre jatos nem entre jumentos. Da mesma forma, o vigor espermático não diferiu entre os jatos, para um mesmo jumento.

### 3.1.2 Características físicas e morfológicas do sêmen asinino: efeito da sazonalidade, raça, idade e peso sobre as mesmas

O sêmen de garanhões e jumentos possuem várias características em comum, tais como nas concentrações de ergotioneína e ácido cítrico, oriundos respectivamente das ampolas e das glândulas vesiculares, que também apresentam elevada concentração de ácido lático. Tanto o sêmen dos garanhões quanto o dos jumentos, é praticamente isento de frutose, embora os espermatozoides sejam capazes de metabolizar a frutose adicionada, anaerobicamente ou aerobicamente. Na ausência de oxigênio, a taxa de conversão de frutose em ácido lático, assim como a motilidade dos espermatozoides são muito baixas. Em sua presença, por outro lado, a taxa de degradação da frutose, assim como a motilidade, são muito mais elevadas. Nestes e em outros aspectos, os espermatozoides de garanhões e de jumentos apresentam características similares às dos javalis, embora difiram das observadas nos espermatozoides humanos, de carneiros e dos touros. Uma substância facilmente oxidável ocorre no plasma seminal, tanto de jumentos, quanto de garanhões e javalis, sendo a mesma responsável pelo próprio consumo de oxigênio do plasma (Mann *et al.*, 1963).

Tanto os ejaculados de garanhões quanto de jumentos são compostos por três frações, a saber: a) pré-espermática, b) fração espermática-rica em espermatozoides e a c) pós-espermática, de origem da glândula bulbo-uretral, das ampolas dos ductos deferentes e das glândulas vesiculares (Mann *et al.*, 1963).

A caracterização das frações do ejaculado asinino foi realizada por Mann *et al.* (1963). A fração pré-espermática, consistia de um líquido transparente, com volume médio de 2,8mL,

apresentando concentrações consideráveis de ácido láctico (12mg/dl) e altas concentrações de cloreto de sódio (850mg NaCl/dl), embora a concentração espermática, de ergotioneína e ácido cítrico sejam baixas.

A fração rica em espermatozóides, por sua vez, apresentou três porções, com as mesmas características: aspecto leitoso, alta concentração espermática e de ergotioneína. As concentrações de ácido láctico foram similares à da fração pré-espermática, porém com menores valores de cloreto de sódio (744mg NaCl/dl). A baixa concentração de ácido cítrico, oriundo das glândulas vesiculares, sugere a reduzida participação desta glândula na composição desta fração. As três porções que compõem a fração rica apresentaram volumes de 9, 17 e 9mL, respectivamente, com concentrações espermáticas variando de 20 a mais de  $40 \times 10^9$  espermatozoides/dl (Mann *et al.*, 1963).

Finalmente, a fração pós-espermática apresentou baixa concentração espermática, altas concentrações dos ácidos láctico (89mg/mL) e cítrico (21,5mg/dl) com uma aparência gelatinosa transparente, características da secreção vesicular (Mann *et al.*, 1963).

As características físicas e morfológicas do sêmen de asininos diferem em alguns parâmetros daquelas encontradas no sêmen de garanhões. Assim, os espermatozoides de asininos apresentaram menor resistência em baixas (-16°C) e altas (57°C) temperaturas, assim como foram mais sensíveis às mudanças osmóticas, quando comparados aos de garanhões. Além disso, uma queda brusca de temperatura causou danos mais severos ao sêmen de asininos que ao de equinos. Diante disto, a sua utilização requer atenção especial, notadamente quando do seu armazenamento (Sales, 2011).

Mann *et al.* (1963) observaram que o sêmen de jumentos, diluído em diluidor contendo gema de ovo e armazenado à 5° C, sobreviveu mais tempo que o sêmen de garanhões. Além disso, observou-se uma redução mais rápida da motilidade e atividade respiratória, no sêmen de garanhões, durante o armazenamento, do que no sêmen de jumentos. Miró *et al.* (2005) observaram que o sêmen de jumentos foi mais sensível a um meio hiposmótico. Quanto à morfologia espermática, Mann *et al.* (1963) descreveram que as cabeças dos espermatozoides de jumentos são maiores e mais arredondadas que as dos garanhões. El Wishy (1975) avaliou os espermatozoides armazenados no epidídimo de 16 garanhões e 11 jumentos, quando observou-se maior incidência de inserção abaxial da peça intermediária nos espermatozoides de jumentos em relação aos espermatozoides de garanhões.

Em 2009, Yash e colaboradores na Índia, compararam o sêmen de garanhões com o de asininos, quando verificaram ter o sêmen de jumentos uma aparência mais cremosa. Além disso, observaram que o volume de sêmen variou de 30 a 225mL e de 5 a 150mL, sendo os volumes médios de gel de 23,21 e 19,0mL para garanhões e jumentos, respectivamente. O pH observado foi de  $7,2 \pm 0,02$  e  $7,17 \pm 0,02$  para o sêmen de garanhões e jumentos, respectivamente. A concentração espermática do ejaculado de garanhões e de jumentos foi de  $192,0 \pm 9,3$  e  $305,0 \pm 10,1 \times 10^6$ mL, respectivamente, enquanto a motilidade inicial, foi maior no sêmen de jumentos, de 82,60%, enquanto no sêmen de garanhões foi de 79,76%. A média da motilidade progressiva observada em jumentos e garanhões foi de  $77,80 \pm 1,0$  e  $73,33 \pm 0,94\%$ , respectivamente. Mello *et al.* (2000) relataram que a quantidade de gel presente no ejaculado de jumentos foi menor do que no de garanhões.

Gastal (1991) avaliou o ejaculado de cinco jumentos, submetendo-os à duas colheitas de sêmen semanalmente, com intervalo de aproximadamente 4 horas, durante 12 meses. As médias encontradas para o volume seminal, sem a presença de gel, foram de  $29,25 \pm 2,22$  e  $31,72 \pm 2,22$  mL para o primeiro e segundo ejaculados, respectivamente, sem que houvesse diferenças estatísticas entre eles. Entretanto, os jumentos diferiram quanto à essas características. A motilidade progressiva média foi de  $71,03 \pm 1,62$  e  $72,92 \pm 1,62$  %, sendo o vigor médio de  $3,84 \pm 0,13$  e  $4,06 \pm 0,13$  para o primeiro e segundo ejaculados, respectivamente, sem que houvesse efeito do ejaculado sobre as características espermáticas avaliadas. Estudando o efeito sazonal, Gastal *et al.* (1997) observaram redução do pH seminal durante o verão.

Carluccio *et al.* (2013) investigaram os possíveis efeitos da sazonalidade sobre as características do sêmen de jumentos da raça Martina Franca. O volume total do sêmen foi significativamente maior no inverno em comparação às outras estações do ano, sendo o volume sem gel maior no inverno em relação ao verão e outono. A concentração espermática média foi menor no inverno em comparação às observadas na primavera e verão. Entretanto, as motilidades total e progressiva, bem como a integridade da membrana não sofreram influência da estação. A velocidade espermática média foi mais baixa no outono do que na primavera e verão, sendo que no verão observou-se maior velocidade linear em relação aos valores da primavera e do outono. O pH seminal não foi influenciado pela estação, assim como a morfologia espermática. Os autores concluíram que a ausência de diferenças entre estas variáveis analisadas, durante o ano, pode estar relacionada às características da raça Martina Franca.

Miró *et al.* (2005) observaram que o sêmen de jumentos da raça Catalã mostrou características similares às de outras raças, podendo a motilidade e o número de espermatozoides variarem de acordo com o jumento. Neste estudo, analisaram a produção de L-lactato no sêmen de jumentos, uma vez que a sua presença indica o estado metabólico dos espermatozoides, sendo considerado, dessa forma, um excelente indicador global da qualidade do sêmen.

A atividade média da transaminase glutâmica oxalacética (GOT), e da lactato desidrogenase (LDH), localizadas na cabeça dos espermatozoides, na região acrossomal, ou na peça intermediária, podem ser utilizadas para a mensuração da viabilidade espermática, uma vez que concentrações elevadas destas enzimas poderão ser indicativo de danos aos espermatozoides (Yash *et al.* 2009; Legha *et al.* 2013). Além disso, a atividade das enzimas GOT e LDH foi mais elevada no sêmen de jumentos que no de garanhões. As concentrações de proteínas, neste estudo, foram comparativamente mais baixos em jumentos do que em garanhões, podendo diferir entre raças/espécies e serem influenciadas pelo estado nutricional dos animais. As proteínas são consideradas responsáveis pelo fornecimento de um revestimento protetor para os espermatozoides e, conseqüentemente, por aumentar o seu tempo de sobrevivência dentro do sistema genital feminino, podendo ser este revestimento um pré-requisito para a capacitação espermática (Yash *et al.*, 2009).

Legha *et al.* (2013) avaliaram o sêmen de jumentos na Índia pertencentes à diferentes raças e com idades e pesos diferentes. Para tal, os animais foram divididos em grupos de acordo com a idade, considerando-se animais jovens, os de 4,5 – 5,0 anos e os adultos, os apresentando entre 5,5 – 8 anos, bem como em grupos de acordo com o peso: grupo 1: 92-101 kg e grupo 2: 114-143 kg. O pH, volumes de sêmen e gel, concentração espermática e motilidades inicial e progressiva, não foram influenciados pela idade ou pelo grupo, sendo os resultados similares aos obtidos com a raça Poitou. Entretanto, o percentual de espermatozoides vivos foi maior no grupo de animais jovens e mais leves, em relação aos animais adultos e mais pesados. Além

disso, os jumentos indianos apresentaram maior percentual de espermatozoides vivos que os da raça Poitou. Como não observaram diferenças entre os animais jovens e leves, parece que o percentual de espermatozoides vivos foi mais influenciado pela idade que pelo peso. As concentrações das enzimas transaminase glutâmica oxalacética (GOT), glutamina piruvato transaminase (GPT) e lactato desidrogenase (LDH) não diferiram entre os grupos, assim como as concentrações de glicose não diferiram entre os grupos de idades. Entretanto, a glicose foi mais alta no grupo de animais mais leves.

#### 3.1.2.1. Características do plasma seminal dos asininos

O efeito do plasma seminal sobre as células espermáticas e a fertilidade tem sido estudado por vários autores (Bergeron e Manjunath, 2006; Brugué, 2010; Morrel *et al.*, 2012; Neto *et al.*, 2013). No que diz respeito aos equinos, muitos deles concordam ser o plasma seminal prejudicial à preservação *in vitro* das células espermáticas (Mello *et al.*, 2000). O plasma seminal constitui uma mistura de secreções a partir dos testículos, epidídimos e glândulas acessórias. Este possui a função de transportar os espermatozoides ao longo do sistema genital feminino, embora o seu efeito venha sendo descrito como benéfico ou prejudicial para os espermatozoides (Bergeron e Manjunath, 2006; Brugué, 2010), devido à sua composição, variável entre indivíduos. Assim, algumas vezes torna-se necessária a remoção do plasma seminal para aumentar o tempo de viabilidade das células espermáticas (Neto *et al.*, 2013).

Segundo Bergeron e Manjunath, (2006) uma das funções do plasma seminal é facilitar a capacitação espermática, embora possa ser prejudicial durante o armazenamento ou criopreservação do sêmen do touro ou do garranhão. Infelizmente, os fatores responsáveis por esse efeito negativo sobre a estocagem dos espermatozoides têm sido mal caracterizados.

A composição bioquímica do plasma seminal é similar em quase todos os mamíferos, embora haja diferenças na proporção de alguns de seus componentes. Neste sentido, tem sido relatadas diferenças entre o plasma seminal equino e asinino, quando observou-se menor quantidade de magnésio e maior conteúdo de frutose, nessa última espécie (Morais *et al.*, 1994). O plasma seminal raramente contém altas concentrações de ácido cítrico, ergotioneína, frutose, glicerilfosforilcolina e sorbitol. Entretanto, quantidades apreciáveis de ácido ascórbico, aminoácidos, peptídeos, proteínas, lipídeos, ácidos graxos e numerosas enzimas estão presentes. Constituintes antimicrobianos, incluindo imunoglobulinas da classe IgA, fazem parte do plasma seminal. Há que se salientar, ainda, a presença de uma variedade de substâncias hormonais incluindo andrógenos, estrógenos, prostaglandinas, FSH, LH, material similar à gonadotrofina coriônica, hormônio do crescimento, insulina, glucagon, prolactina, relaxina, hormônio liberador dos hormônios tireoidianos e encefalinas no plasma seminal (Hafez, 2004).

O plasma seminal dos equinos possui oito proteínas (HSP-1 a HSP- 8) com baixo peso molecular (14-30 kDa), sendo que as principais, representando 70-80 % da proteína total, são a HSP -1 e HSP -2, também conhecidas como SP -1 e SP -2 (Kareskoski e Katila, 2008). Estas proteínas pertencem ao grupo das proteínas Fn-2, caracterizadas pela habilidade de ligação à heparina. Grande parte das proteínas do plasma seminal são originárias do epidídimo e estão envolvidas na remodelação da membrana espermática que ocorre durante o trânsito epididimário e após a ejaculação. A secreção de proteínas no epidídimo é altamente regionalizada, sendo a cabeça e o corpo as regiões mais ativas. O segundo grupo de proteínas importantes em equinos é representado pelas CRISP, caracterizadas por apresentarem 16 resíduos de cisteína em sua estrutura molecular, divididas em CRISP1, CRISP2 e CRISP3. A

CRISP 1 é expressa ao longo do epidídimo, enquanto a CRISP 2 é expressa no testículo, epidídimo e glândulas vesiculares. As CRISPs são expressas sob controle androgênico e ligam-se na região equatorial, pós-acrossomal e na peça intermediária dos espermatozoides, estando intimamente relacionadas com a fusão espermatozoide - oócito (Guasti *et al.*, 2012).

A célula espermática é capaz de gerar e degradar espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS), as quais, em pequenas quantidades, são necessárias para o funcionamento normal da célula. Entretanto, a produção excessiva de ROS no sêmen leva à disfunção espermática e à redução da capacidade fertilizante dos espermatozoides (Maia e Bicudo, 2009). As membranas dos espermatozoides são ricas em ácidos graxos poliinsaturados e podem facilmente sofrer a peroxidação lipídica, na presença de ROS, com consequentes mudanças na fluidez da membrana e redução subsequente da capacidade de fertilização (Kankofer *et al.*, 2005). Contudo, o plasma seminal, rico em antioxidantes, oferece proteção aos espermatozoides, compensando a sua baixa disponibilidade de tais enzimas. Como redutores de ROS, presentes no plasma seminal, citam-se: o ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas tais como, a catalase, superóxido dismutase (SOD), glutatona e outros tiois, tais como taurina, hipotaurina e vitamina E (Zini *et al.*, 2000). As ROS mais comumente geradas pelos espermatozoides são o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Como a capacidade biosintética dos espermatozoides é limitada, o plasma seminal é particularmente importante na proteção dos espermatozoides contra os danos causados pelas ROS geradas pelos próprios espermatozoides e pelos fagócitos presentes no ejaculado (Maia e Bicudo, 2009).

A atividade da enzima superóxido dismutase no plasma seminal de jumentos e garanhões é maior que a observada em várias espécies de mamíferos, devido, provavelmente, à sua origem, das ampolas dos ductos deferentes, que apresentam-se grandes e bem desenvolvidas nessas espécies. Observa-se ainda, que a atividade desta enzima é de três a cinco vezes maior, no plasma seminal de jumentos, do que a observada no plasma seminal de equinos (Rocha, 2012).

Kankofer *et al.* (2005) preservaram o sêmen equino por 24 horas à 5°C para avaliar a atividade antioxidante enzimática, bem como os produtos da peroxidação lipídica no sêmen de garanhões. Neste estudo, observaram que a peroxidação lipídica não aumentou substancialmente durante o armazenamento do sêmen, sugerindo que a atividade antioxidante enzimática no sêmen, inibe a peroxidação dos lipídios da membrana pelas ROS.

Rota *et al.* (2012) demonstraram que a adição de plasma seminal ao sêmen de jumentos, após o descongelamento, melhorou a taxa de gestação (61,54% - 8/13), após a inseminação de jumentas. Embora não existam estudos sobre as propriedades do plasma seminal em jumentos, é provável que a maior taxa de fertilidade obtida, após a adição de plasma seminal, deveu-se a uma combinação de fatores, tanto das células espermáticas quanto do ambiente uterino.

### 3.1.3. Centrifugação do sêmen

A centrifugação do sêmen tem sido uma das alternativas utilizadas para reduzir ou eliminar o plasma seminal (Brinsko *et al.*, 2000; Brugué, 2010), de forma a aumentar a concentração espermática de animais que apresentam baixa concentração (Amann e Pickett, 1987; Brugué, 2010). Entretanto, a centrifugação pode reduzir a motilidade espermática, dependendo da temperatura em que é realizada. Além disso, existem controvérsias quanto ao seu efeito, e a eliminação do plasma seminal, sobre as células espermáticas de asininos submetidas ao armazenamento (Serres *et al.*, 2002).

Os efeitos provocados pela centrifugação podem ser minimizados ao reduzir-se a força gravitacional ou pela adição de diluidores ao sêmen, antes da centrifugação (Serres *et al.*, 2002). Normalmente, as centrifugações são feitas por 10-15 minutos variando de 400 - 600 x g (Brugué, 2010). Entretanto, a utilização dessas forças g, quando do processamento do sêmen fresco, resulta na perda de 20 a 30% dos espermatozoides no sobrenadante (Cochran *et al.*, 1984). Apesar disto, a centrifugação é utilizada rotineiramente nos protocolos envolvendo a criopreservação do sêmen (Brugué, 2010).

Serres *et al.* (2002) compararam as motilidades total e progressiva do sêmen centrifugado (400 x g / 7 minutos) e do não centrifugado, quando observou-se serem as motilidades total e progressiva, maiores no sêmen centrifugado. Ao compararem as motilidades total e progressiva do sêmen centrifugado e não centrifugado, armazenado à diferentes temperaturas (20°C, 15°C e 4°C), não observou-se diferenças entre as temperaturas de 4 e 15°C, embora na temperatura de 20°C tenham sido observados os menores valores de motilidade. Quando avaliou-se a integridade das membranas, observou-se superioridade das alíquotas conservadas à 15°C, em relação às mantidas à temperaturas de 4 ou 20°C. Neste estudo, foi possível observar que a centrifugação melhorou a motilidade e a integridade da membrana plasmática, podendo o sêmen de jumento ser efetivamente armazenado, nestas condições, por até 96 horas.

Len *et al.* (2010) compararam três diferentes velocidades de centrifugação do sêmen equino (400g, 900g e 4500g / 10 minutos), quando observou-se que a centrifugação do sêmen até 900 g não danificou a membrana plasmática pós centrifugação, nem prejudicou a refrigeração por até 24 horas. Porém, salientam que as diferenças foram associadas à retirada do plasma seminal após a centrifugação. Tais observações parecem sustentar que a remoção das espécies reativas de oxigênio do plasma seminal (ROS), após centrifugação, podem ter reduzido os danos na membrana plasmática, causados pelo processo de capacitação, induzido pelas ROS.

Serres *et al.* (2014) compararam a fertilidade e as motilidades total e progressiva do sêmen fresco centrifugado ou filtrado em membrana sintética (spermFilter), na presença de três diferentes protocolos, sendo que no primeiro o sêmen fresco não foi processado (grupo controle); no segundo, acrescentou-se diluidor contendo lactose-EDTA + Dimetilformamida (diluidor de congelamento) ao sêmen, avaliando-se o mesmo 10 minutos após a diluição e, no terceiro protocolo, utilizou-se a centrifugação ou a filtração do sêmen contendo o diluidor. Ao final do trabalho, observou-se que as médias das motilidades total e progressiva, para o grupo controle, foram de 79,7% e 70%, respectivamente. Para o sêmen mantido por 10 minutos, no diluidor de congelamento, foram de 77% e 67%, respectivamente. Finalmente, foram de 80 e 70% para o sêmen centrifugado e de 84 e 74% para o sêmen filtrado. As taxas de gestação foram de 80% (4/5 e 4/5), para o sêmen centrifugado e filtrado, não havendo diferenças entre eles.

Raphael (2007) observou que as motilidades total e progressiva foram superiores no sêmen centrifugado de garanhões, em relação ao não centrifugado. Assim, observou-se decréscimo das motilidades durante a estocagem do sêmen, mais acentuado a partir de 48h. Tais alterações se deram, provavelmente, devido a perda da capacidade de manutenção da temperatura interna no dispositivo utilizado (5°C), fato observado em todas as análises às 72h. A maior parte do plasma seminal foi retirada juntamente com o diluidor, no sobrenadante, após a centrifugação, permanecendo apenas uma quantidade mínima de plasma e diluidor junto ao sedimento.

Concluiu-se que o sêmen com a menor quantidade de plasma seminal, apresentou a melhor motilidade.

Contri *et al* (2012) não observaram diferenças ao compararem a viabilidade e a integridade acrossômica entre o sêmen fresco centrifugado e não centrifugado.

Brinsko *et al.*, (2000) concluíram que a centrifugação e a remoção parcial do plasma seminal, antes do resfriamento, foi benéfica para garanhões cujos espermatozoides apresentavam uma forte redução da motilidade progressiva quando processado de modo convencional, especialmente, quando o sêmen foi resfriado e armazenado por mais de 24 h. No entanto, tais procedimentos podem não ser procedentes rotineiramente na preparação do sêmen de garanhões, que toleram bem o resfriamento e armazenamento quando da utilização de procedimento padrão.

Miró *et al.* (2009) diluíram o sêmen de jumentos utilizando três taxas de diluição: 1:1, 1:5 e 1:10, sendo essas amostras não centrifugadas. Uma quarta amostra foi centrifugada e ressuspensa no mesmo diluidor, utilizado nas amostras anteriores. Após 24, 48 e 72 horas de armazenamento, à uma temperatura de 5°C, todas as amostras foram avaliadas. Após 24 horas de armazenamento, as amostras submetidas a maior taxa de diluição e a centrifugada apresentaram maior percentual de espermatozoides vivos (1:1 – 48,71%; 1:5 – 56,58%; 1:10 – 62,65%; centrifugado – 72,40%), o mesmo acontecendo após 48 horas de armazenamento (1:1 – 34,31%; 1:5 – 40,56%; 1:10 – 48,52%; centrifugado – 66,30%). Entretanto, após 72 horas, somente as amostras centrifugadas apresentaram mais de 25% dos espermatozoides vivos. Assim, concluiu-se que os efeitos nocivos do plasma seminal podem ser minimizados com a centrifugação e remoção parcial do plasma ou pela diluição do sêmen, utilizando-se taxas adequadas de diluição (sêmen:diluidor).

Nem sempre a literatura é unânime quanto ao tema. Assim, ao compararem o efeito de três diluidores INRA-96, INRA-82 e INRA82 + gema de ovo centrifugada, os resultados de motilidade espermática após 24, 48 e 72 horas de resfriamento foram superiores nas amostras diluídas em INRA82 + gema de ovo. Em um segundo estudo, utilizou-se o diluidor INRA82 + gema de ovo centrifugada para avaliar os efeitos da centrifugação e da remoção do plasma seminal de jumentos, sendo o sêmen armazenado por até 72 horas. A motilidade total, avaliada após 72 horas de armazenamento, foi superior nas amostras não centrifugadas em relação às submetidas à retirada do plasma seminal (Rota *et al.*, 2008).

Assim, mais estudos são necessários visando melhor entender as mudanças nos padrões de motilidade espermática de jumentos, associadas a eliminação do plasma seminal e utilização de diferentes diluidores de sêmen, bem como a sua relação com a fertilidade.

#### 3.1.4. Diluidores de sêmen

A adição de diluidores ao sêmen tem como objetivos proteger os espermatozoides de condições ambientais desfavoráveis e prolongar a sua sobrevivência (Pickett e Amann, 1987). A diluição do sêmen visa aumentar a longevidade das células espermáticas ao garantir manutenção da integridade da membrana plasmática, reduzir os efeitos prejudiciais do plasma, controlar o pH e a osmolaridade, nutrir os espermatozoides e controlar o crescimento de microorganismos durante o resfriamento do sêmen (Brugué, 2010). No entanto, para a definição de um diluidor ideal torna-se necessário o conhecimento das características fisiológicas do plasma seminal,

visando-se a conservação de seus fatores benéficos. Neste aspecto, incluem-se muitas variáveis, dentre as quais algumas determinantes como o pH, a osmolaridade e as concentrações de eletrólitos (Morais *et al.*, 1994).

O efeito deletério do plasma seminal quando do armazenamento do sêmen equino “in vitro” é reconhecido e descrito por vários autores (Morais *et al.*, 1994; Brinsko *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2000; Len *et al.*, 2010). Deste modo, para o congelamento de sêmen, tem sido preconizada a retirada do plasma seminal, substituindo-o por um diluidor compatível com as células espermáticas e, ao mesmo tempo, livre de efeitos tóxicos (Morais *et al.*, 1994).

Um dos fatores que mais interferem na motilidade, viabilidade e metabolismo dos espermatozoides são os íons de hidrogênio (pH). O pH ácido inibe o metabolismo, enquanto o alcalino o estimula. A faixa de variação de pH mais comumente encontrada no sêmen de garanhões está entre 6,2 e 7,8. Com base nesse conhecimento, o pH dos diluidores utilizados para a conservação do sêmen equino deve ser ajustado, através de diferentes substâncias tampão, para a faixa entre 6,9 e 7,2. Para o sêmen asinino tem prevalecido, basicamente, os mesmos valores preconizados para o sêmen de garanhões, sendo também uma característica seminal bastante constante. Outro fator de grande importância para os diluidores é a osmolaridade do plasma seminal, uma vez que os espermatozoides sobrevivem melhor quando diluídos em soluções com osmolaridade próxima à do sêmen (Morais *et al.*, 1994).

Uma grande variedade de diluidores tem sido desenvolvida para proteger os espermatozoides dos equinos no processo de resfriamento e congelamento. Entretanto, as macromoléculas do leite e da gema de ovo tem sido as mais utilizadas na grande maioria destes diluidores (Mello *et al.*, 2000).

A utilização do antibiótico nos diluidores é recomendada, tanto para o sêmen fresco quanto para o resfriado, visando controlar o crescimento de microrganismos, manter a qualidade seminal e evitar o desenvolvimento de infecções no sistema genital da fêmea (Pickett *et al.*, 1999). Os açúcares também são ingredientes necessários nos diluidores, pois fornecem energia aos espermatozoides (Storey, 2008). Resumindo-se, os diluidores utilizados para o sêmen de equídeos são constituídos por água, tampões e substâncias não iônicas, açúcares e diferentes tipos de macromoléculas e antibióticos (Amann e Pickett, 1987).

Para Amann e Pickett (1987), um bom diluidor para o sêmen de equídeos é aquele que possui capacidade de estabilizar as membranas e sistemas enzimáticos, proporcionar pressão osmótica compatível com a célula espermática de acordo com a modalidade de processamento do sêmen, apresentar combinação adequada de nutrientes, apropriado equilíbrio mineral e capacidade de neutralizar catabólitos espermáticos. Além disso, devem possuir substâncias protetoras contra as variações de temperatura, principalmente contra o frio, serem livres de microrganismos patogênicos, serem de baixo custo e de fácil aquisição, e apresentarem baixa irritabilidade ao sistema genital e não oferecerem toxicidade aos espermatozoides.

#### 3.1.4.1. Diluidores utilizados para a centrifugação do sêmen

A maioria dos diluidores utilizados para a centrifugação do sêmen são os mesmos utilizados comercialmente para o resfriamento do sêmen de equídeos, principalmente, aqueles contendo

leite em pó desnatado, em sua formulação (Miró *et al.*, 2005; Rota *et al.*, 2008). A centrifugação tem sido uma alternativa encontrada para reduzir o plasma seminal (Brinsko *et al.*, 2000). De acordo com Squires *et al.* (1999), a diluição mais adequada para a centrifugação é a de 1:1, uma parte de diluidor para uma de sêmen.

Os diluidores mais utilizados para a centrifugação do sêmen de equídeos são o INRA 96, o INRA 82, o leite desnatado ultrapasteurizado (UHT) (Vidament, 2005; Rota *et al.*, 2008) e o diluidor de mínima contaminação (Boeta e Quintero, 2000).

O diluidor INRA 96 é composto por solução de HGLL contendo sais de Hank, glicose, lactose, tamponada por 4,76g/L de tampão Hepes e suplementada com uma fração purificada de caseína (fosfocaseinato nativo), sendo o pH ajustado para 7,1. Além disso, contém 50.000 UI de penicilina, 50mg de gentamicina e 0,25 mg de anfotericina B por litro. Já o diluidor INRA 82 é composto por 0,5 L de solução glicose-salina (25g/L de glicose, 1,5g/L de lactose, 1,5g/L de rafinose, 0,25g/L de citrato de sódio, 0,41g/L de citrato de potássio e 4,76g/L de tampão Hepes) e 0,5L de leite desnatado ultrapasteurizado (UHT), com pH ajustado para 6,8. Além disso, contém 50.000 UI de penicilina e 50mg de gentamicina/L (Pillet *et al.*, 2008). O diluidor de mínima contaminação tem em sua formulação leite em pó desnatado, glicose e antibiótico (Tischner, 1992).

Autores como Rota *et al.* (2012) utilizaram o diluidor INRA 96 acrescido de gema de ovo para centrifugação do sêmen asinino. Vidament *et al.* (2000 e 2009) utilizaram o diluidor INRA 82 acrescido de gema de ovo. Já Mello (2005) utilizou apenas o diluidor INRA 82 para centrifugar o sêmen de garanhões, porém, acrescentou 2% de gema de ovo no INRA 82, quando da ressuspensão do sêmen. Miró *et al.* (2009) centrifugaram o sêmen asinino diluído no diluidor de mínima contaminação, proposto por Kenney *et al.* (1975). Já Serres *et al.* (2002) utilizaram leite desnatado para a centrifugação de sêmen asinino, ressuspendendo-o no diluidor INRA-82.

#### 3.1.4.2. Diluidores utilizados para o resfriamento do sêmen

Vários tipos de diluidores tem sido utilizados para a preservação do sêmen equino refrigerado, sendo a maioria à base de leite e outros ingredientes visando controlar o pH e a osmolaridade, acrescidos de antibióticos para inibirem o crescimento bacteriano (Boeta e Quintero, 2000). Embora existam vários tipos de diluidores, o diluidor de Kenney *et al.* (1975), à base de leite em pó e glicose, tem sido o mais utilizado para o sêmen de equinos (Tischner, 1992). O tempo de armazenagem, ou seja, o tempo em que o sêmen pode ser armazenado e ainda manter a sua capacidade fecundante pode ser influenciado pelo diluidor, pela temperatura de armazenamento e pela variabilidade individual do animal (Pickett *et al.*, 1987).

Ao avaliarem o sêmen de jumentos e equinos diluído em diluidor contendo gema de ovo e armazenado à 5°C, Mann *et al.* (1963) verificaram que a motilidade e a atividade respiratória dos espermatozoides equinos diminuíram mais rapidamente, durante o armazenamento, do que nas células espermáticas dos asininos.

Boeta e Quintero (2000) compararam a eficiência de dois diluidores, sendo um diluidor de leite em pó desnatado - glicose e outro de leite desnatado ultra pasteurizado (UHT). O sêmen de um jumento foi coletado, diluído e armazenado à 5°C durante 48 horas. Após o armazenamento, as éguas foram inseminadas, quando obteve-se uma taxa de gestação de 54,5%, associada ao sêmen diluído em diluidor de leite em pó desnatado – glicose (Kenney *et al.*, 1975). A taxa de

gestação foi de 76,5%, para as éguas inseminadas com sêmen diluído no diluidor de leite desnatado UHT. Os resultados apontam o diluidor de leite desnatado UHT, como uma boa opção para o resfriamento do sêmen de jumentos.

Rocha (2012) utilizou dois diluidores para o resfriamento do sêmen asinino à 5°C, ambos à base de leite desnatado UHT, glicose, penicilina G potássica e gema de ovo (2,5%), com diferentes concentrações de glicose (1 ou 2g). As taxas de gestação/ciclo foram de 67,9% e de 55,56% para os dois diluidores, contendo as duas concentrações de glicose, respectivamente.

Em 2008, Rossi comparou dois diluidores, sendo um à base de leite em pó desnatado – glicose (Kenney *et al.*, 1975) e o outro, à base de gema de ovo – glicina (Foote, 2002), para o resfriamento do sêmen de asininos. Neste experimento, não observou-se diferenças quanto às taxas de gestação por ciclo, de éguas inseminadas, que foram de 52,69% e 47,06%, respectivamente. Entretanto, Carvalho (2011), ao utilizar o mesmo diluidor à base de leite em pó desnatado – glicose (Kenney *et al.*, 1975), comparou-o com um diluidor à base de lactose-gema de ovo (Nagase e Niwa, 1964). Apenas os três primeiros jatos da coleta de sêmen fracionada foram utilizados. A taxa de gestação/ciclo, obtida quando da utilização do sêmen diluído no diluidor à base de leite em pó desnatado (56,52%) superou àquela do diluidor lactose-gema de ovo (4,76%). Segundo a autora, a remoção do plasma seminal, pela coleta fracionada, acompanhada pela utilização de um diluidor com alta concentração de gema de ovo, pode ter sido a causa da baixa fertilidade, por impedir a capacitação espermática.

Trimeche *et al.* (1996) avaliaram o efeito da incorporação da glutamina à um diluidor para o resfriamento do sêmen asinino, a saber, o diluidor INRA 82 modificado com 4% de glicerol e 2% de gema de ovo. Ao utilizarem diferentes concentrações de glutamina, observaram que a mesma não protegeu os espermatozoides no processo de resfriamento.

A membrana espermática de espécies resistentes à criopreservação possui alta relação colesterol:fosfolipídios. Em garanhões a taxa molar de colesterol:fosfolipídios na membrana é de 0,36 em média (Hartwig *et al.*, 2012). O colesterol desempenha papel importante na resistência dos espermatozoides ao choque pelo frio (Mocé *et al.* 2014), reduzindo os danos celulares decorrentes da criopreservação (Hartwig *et al.*, 2012). É possível que os espermatozoides tratados com ciclodextrina (CLC) possam resistir aos danos do resfriamento, mesmo quando não são resfriados lentamente até 5 °C, antes do congelamento (Mocé *et al.* 2014).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos de glicose que contêm um centro hidrofóbico capaz de incorporar lipídios (Oliveira *et al.*, 2010). Existem três tipos de ciclodextrina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), porém as que apresentam a estrutura mais adequada para englobar componentes lipídicos são as  $\beta$ -ciclodextrinas (Hartwig *et al.*, 2012). A metil- $\beta$ -ciclodextrina possui elevada afinidade para os esteroides *in vitro*, principalmente, para o colesterol (Oliveira *et al.*, 2010). Devido à essa alta afinidade por esteroides, as ciclodextrinas tem sido utilizadas para modificar as concentrações de colesterol das membranas. A aptidão da  $\beta$ -ciclodextrina e seu complexo de inclusão de alterar o conteúdo lipídico da membrana plasmática se deve à sua capacidade de estabelecer um equilíbrio entre as concentrações de colesterol ligados à ciclodextrina com os contidos na membrana (Hartwig *et al.*, 2012).

Em bovinos, Mocé *et al.* (2014) observaram que os espermatozoides, tratados com CLC, apresentaram maior percentual de membranas plasmáticas intactas, em relação aqueles criopreservados utilizando protocolos convencionais. No entanto, o tratamento não impediu totalmente os danos aos espermatozoides, quando submetidos a um resfriamento rápido, seguido pelo congelamento. Vários autores estudaram o uso da ciclodextrina (CLC) em diluidores para o resfriamento do sêmen asinino (Alvarez *et al.*, 2006; Jepsen *et al.*, 2012) e equino (Moore *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2006; Jepsen *et al.*, 2012), com resultados conflitantes. Considerações adicionais sobre o assunto estão apresentadas no tópico 3.1.4.4.5 (Estabilizantes de membrana).

### 3.1.4.3. Diluidores utilizados para o congelamento do sêmen

Vários diluidores tem sido propostos para o congelamento do sêmen asinino. Neste sentido, Trimeche *et al.*, (1998) utilizaram o diluidor T2-94 (Glutamina + gema de ovo de codorna + glicerol) e obtiveram bons resultados, quanto ao congelamento do sêmen asinino. Em seu estudo, o sêmen foi diluído no diluidor T2-94 e processado de duas maneiras após o descongelamento, incluindo a retirada ou não do glicerol. Ao inseminarem jumentas obtiveram taxa de gestação de 62%, quando o glicerol foi removido após o descongelamento, antes das inseminações e, de 0%, na presença do glicerol. Em um estudo conduzido por Papa *et al.* (1999), utilizou-se o diluidor M9H, tendo como base o diluidor Merk-gema proposto por Martin *et al.* (1979), ao qual adicionou-se um outro diluidor à base de leite desnatado e glicose (Kenney *et al.*, 1975) e o “Basal Medium Eagle”. Neste estudo, obteve-se duas gestações de três éguas inseminadas (2/3 – 66%).

Krause e Grove (1967) utilizaram diluidores à base de glicose, lactose ou rafinose, gema de ovo e glicerol para o congelamento do sêmen de jumentos e garanhões, sendo o envasamento do sêmen realizado em pellets. Ao descongelamento, obteve-se motilidades de 50 a 70%. Na inseminação de éguas, uma de duas ficou gestante com o sêmen de jumento e duas de quatro conceberam com o sêmen de garanhão.

Existe uma variedade de microrganismos conhecidos por acumular aminoácidos em resposta ao frio. Tais aminoácidos possuem papel importante na prevenção de danos à estrutura celular durante o congelamento. Neste sentido, Trimeche *et al.* (1996) utilizaram diferentes concentrações de Glutamina (80, 120 ou 24mM) em diluidor INRA 82 modificado (2% gema de ovo e 4% de glicerol), para o congelamento de sêmen asinino. Neste estudo, observou-se que as concentrações de 120 e 240mM de glutamina foram prejudiciais à motilidade espermática.

Entretanto, a incorporação de 80mM de glutamina ao diluidor ofereceu proteção aos espermatozoides, no processo de congelamento-descongelamento. No mesmo trabalho, comparou-se os efeitos do glicerol e da glutamina aditivamente ou isoladamente, quando demonstrou-se que 80mM de glutamina proporcionou proteção real às células espermáticas, independentemente do crioprotetor glicerol.

Sabe-se que o glicerol é o crioprotetor mais comumente utilizado na criopreservação do sêmen de garanhões, entretanto, postula-se que este, possa ser tóxico para os espermatozoides de jumentos, ou exercer um efeito negativo na fertilidade de jumentas. Neste sentido, Rota *et al.* (2012) utilizaram dois crioprotetores, o glicerol e o etilenoglicol, para a criopreservação do sêmen asinino. Neste estudo, foram utilizados 2,2% de glicerol ou 1,4% de etilenoglicol + INRA 96 + 2% de gema de ovo. Não se observou diferenças nas motilidade, velocidade espermática e fertilidade entre os dois crioprotetores. Entretanto, quando foi utilizada a mesma

concentração de 5% de glicerol ou etilenoglicol, a motilidade foi significativamente mais baixa com o uso do etilenoglicol. Entretanto, Vidament *et al.* (2009), observaram que a presença do glicerol no diluidor de sêmen resfriado reduziu a fertilidade em jumentas, quando comparado com outros crioprotetores (etilenoglicol e dimetilformamida). Quando utilizaram o sêmen congelado com glicerol nenhuma das dezesseis jumentas ficaram gestantes (0% - 0/16). Entretanto, quando utilizaram a dimetilformamida, três das vinte e oito jumentas inseminadas, tornaram-se gestantes (10,71% - 3/28). Segundo os autores, o efeito tóxico do crioprotetor começa antes da fase de congelamento. Esta hipótese, também foi confirmada por Serres *et al.* (2014), quando diluíram o sêmen asinino em diluidor contendo lactose-EDTA-dimetilformamida para inseminar jumentas. O sêmen foi processado de três formas, a) grupo controle - sêmen diluído e não processado; b) sêmen diluído e centrifugado e c) sêmen diluído e filtrado em membrana sintética. Após os tratamentos b e c, o sêmen era ressuscitado em diluidor INRA96. As taxas de gestação obtidas foram de 40% (2/5), 80% (4/5) e 80% (4/5), respectivamente. Os resultados apresentados por esses autores, confirmam que o crioprotetor pode exercer efeito tóxico sobre o sêmen de jumentos.

A adição de maiores concentrações de colesterol ao diluidor de congelamento pode resultar em uma maior eficiência do sêmen asinino congelado-descongelado. Neste contexto, Jepsen *et al.* (2010) utilizaram três diferentes diluidores visando o congelamento do sêmen asinino, aos quais incorporou-se 2% de etilenoglicol: a) 20% de gema de ovo, b) 5% de gema de ovo e c) 20% de gema de ovo + 60mM de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Os diluidores de congelamento contendo 2% de etilenoglicol + 5% de gema de ovo ou 2% de etilenoglicol + 20% de gema de ovo + 60mM de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina resultaram em taxas de gestação comercialmente aceitáveis.

#### 3.1.4.4. Componentes dos diluidores de sêmen

##### 3.1.4.4.1. Água

A água é componente essencial e tem grande importância na preservação do sêmen, uma vez que mais de 80% do diluidor é por ela composto (Braga, 2007; Silva, 2011).

O controle da contaminação da água é crucial, uma vez que esta tem grande capacidade de agregar compostos diversos e, também, de se contaminar novamente após a purificação. Os contaminantes da água são representados por dois grandes grupos: químico e microbiológico (Farmacopeia..., 2010).

Os contaminantes químicos orgânicos e inorgânicos têm origens diversas: da fonte de alimentação; da extração de materiais com os quais ela entra em contato; da absorção de gases da atmosfera; de resíduos poluentes, ou resíduos de produtos utilizados na limpeza e sanitização de equipamentos, dentre muitos outros. Entretanto, a maioria dos compostos orgânicos pode ser removida por osmose reversa, porém, aqueles com baixo peso molecular demandam técnicas adicionais, como a resina de troca iônica, carvão ativado ou oxidação por ultravioleta ou ozônio, para serem removidos. Já os contaminantes microbiológicos são representados principalmente por bactérias e apresentam um grande desafio à qualidade da água. São originários da própria microbiota da fonte de água e, também, de alguns equipamentos de purificação. Podem surgir, também, devido a procedimentos de limpeza e sanitização inadequados, que levam à formação de biofilmes e, por consequência, instalam um ciclo contínuo de crescimento a partir de

compostos orgânicos que, em última análise, são os próprios nutrientes para os microorganismos (Farmacopeia..., 2010).

Existem vários processos de purificação da água (destilação, osmose reversa, filtração através do carvão ativado, ultrafiltração), os quais estão disponíveis para utilização no laboratório. Esta purificação consiste na eliminação de todas as substâncias dissolvidas e suspensas na água. A destilação da água consiste no processo de vaporização e condensação de um líquido para purificar ou concentrar uma substância ou para separar uma substância volátil de outras substâncias menos voláteis, sendo o método mais antigo de purificação da água. No transcórrer da deionização, a água passa por um sistema contendo resinas insolúveis, aniônicas e catiônicas, de forma que os íons presentes na água são trocados por íons presentes nessas resinas. A osmose reversa é um processo pelo qual a água é forçada a passar por uma membrana semipermeável que age como um filtro molecular. A membrana remove 90 a 99% das impurezas da água. A osmose reversa possui capacidade de remoção de bactérias e pirogênios. O processo de filtração através do carvão ativado envolve a remoção do cloro por quimio absorção e as substâncias orgânicas dissolvidas por adsorção. Geralmente, o filtro de carvão ativado é colocado nos sistemas de purificação da água, previamente à osmose reversa e antes da deionização. Finalmente, a ultrafiltração utiliza uma membrana com poros ligeiramente maiores que os da membrana da osmose reversa, sendo utilizado para remover pirogênios da água purificada (Basques, 2010).

Quando da sua utilização para a produção de diluidores de sêmen, é importante que a água não apresente agentes contaminantes e possua baixa condutividade elétrica, ou seja, mínima ou nenhuma presença de minerais (Bortolozzo *et al*, 2005). Para que a água torne-se de qualidade visando a produção de diluidores de sêmen, Marchetti (2008) sugere que esta passe pelos processos de filtração, deionização, osmose reversa e esterilização por luz ultra-violeta ou pela filtração, deionização e destilação, respectivamente.

#### 3.1.4.4.2. Açúcares

Os espermatozoides são capazes de produzir energia necessária para o seu metabolismo celular e para o movimento flagelar, pela via glicolítica. Este processo ocorre nas mitocôndrias, localizadas na peça intermediária dos espermatozoides (Gadea, 2003). A energia é utilizada pelos espermatozoides para iniciar processos catabólicos como a glicólise, visando manter a motilidade e o balanço iônico adequado, dentre outras funções (Rocha, 2012).

Os espermatozoides dos mamíferos e das aves desenvolveram a capacidade de utilizar substratos extracelulares para garantir a motilidade, tanto pela via aeróbica quanto anaeróbica (Nevo *et al.*, 1970). Os principais substratos extracelulares são derivados dos carboidratos (Storey, 2008). Entretanto, a célula espermática não é capaz de metabolizar todos os açúcares ou carboidratos mais complexos. Assim, as substâncias metabolizáveis, como frutose, lactose, rafinose, sacarose, piruvato e, mais comumente, glicose são substratos adequados para a produção de ATPs pelos espermatozoides (Katila, 1997). Similarmente ao que ocorre em outras células, as mitocôndrias espermáticas produzem ATP via respiração aeróbica. Entretanto, existem variações entre espécies quanto à capacidade metabólica das mitocôndrias espermáticas, o que nos leva a entender, as variações na habilidade dos espermatozoides de diferentes espécies em metabolizar diferentes substratos (Turner, 2005).

Nos diluidores de sêmen, os açúcares possuem diversas funções, incluindo o fornecimento de substrato energético para os espermatozoides, manutenção da pressão osmótica do meio, além de atuarem como crioprotetores (Berlinguer *et al.*, 2007). Os açúcares protegem as membranas dos espermatozoides contra danos causados nos processos de congelamento-descongelamento (De Leew *et al.*, 1993). Sugere-se que esses açúcares, possuam interação com os fosfolipídios da membrana plasmática, reorganizando a membrana espermática e aumentando a sua fluidez (Bakás e Disalvo, 1991). Suas propriedades coligativas exercem efeitos por meio de interações diretas com a membrana, protegendo-a dos danos causados pela desidratação. Os açúcares atuam também na desidratação celular, através da pressão osmótica, reduzindo a quantidade de água que pode vir a se congelar, no interior da célula, e assim, na proteção contra as injúrias causadas pela formação dos cristais de gelo (De Leew *et al.*, 1993). Além disso, os açúcares fornecem energia aos espermatozoides (Storey, 2008). Por estes motivos, são adicionados aos diluidores como substratos exógenos de energia, além de componentes osmóticos. No entanto, a concentração de determinados açúcares, presentes nos diluidores de congelamento de sêmen equino, podem influenciar negativamente a viabilidade espermática (Snoek *et al.*, 2007).

Diferentes fontes de energia têm sido utilizadas em diluidores visando o resfriamento e/ou congelamento do sêmen asinino. Dentre elas, a glicose foi utilizada nos trabalhos de Krause e Grove (1967), Rozas, (2005), Miró *et al.*, (2009), Legha e Yash Pal (2012) e Legha *et al.*, (2012). Por outro lado, Cochran *et al* (1984) utilizaram a lactose para o congelamento de sêmen equino, enquanto Krause e Grove (1967), Castejón (2005) e Rozas, (2005), utilizaram a lactose nos diluidores de sêmen asinino. Krause e Grove (1967) também utilizaram a rafinose para o congelamento de sêmen asinino.

#### 3.1.4.4.3. Eletrólitos

Os eletrólitos, quando em uma solução aquosa, comportam-se como íons. Os íons são a menor porção de um elemento químico que conserva as suas propriedades. Os cátions são os íons que tem carga elétrica positiva, como o sódio ( $\text{Na}^+$ ) e o potássio ( $\text{K}^+$ ). Os ânions são os íons que tem carga elétrica negativa, como o cloro ( $\text{Cl}^-$ ) ou o bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). O equilíbrio químico de uma solução significa a existência de igual número de cátions e ânions (Souza e Elias, 2006).

Os principais eletrólitos celulares são o potássio, magnésio, fosfato, sulfato, bicarbonato e quantidades menores de sódio, cloreto e cálcio (Souza e Elias, 2006). De modo geral, os cátions mais abundantes no sêmen das espécies domésticas são o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{K}^+$ , com menores concentrações de cálcio (Ca) e magnésio (Mg). A função desses íons está relacionada basicamente à manutenção do equilíbrio osmótico e motilidade espermática. O Na e o K são os íons mais importantes para a manutenção da pressão osmótica e, apresentam, normalmente, uma correlação negativa entre si, sendo difícil estabelecer-se a função de um, independentemente do outro (Morais *et al*, 1994). A presença de concentrações anormais de Ca, Mg, e, em particular de zinco (Zn) e cobre (Cu), pode afetar a espermatogênese no que diz respeito à produção espermática, maturação, motilidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides (Wong *et al.*, 2001).

O Ca é um elemento essencial, sendo um regulador crucial para muitos processos fisiológicos em todas as células vivas, incluindo os espermatozoides. Os íons de Ca desempenham papel importante na reação acrossômica. O Mg modifica substratos enzimáticos específicos e apresenta papel fundamental como co-fator em mais de 300 reações enzimáticas envolvidas no

metabolismo energético (ATP) e na síntese de ácido nucléico. Além disso, o Mg pode desempenhar um papel na espermatogênese, em particular na motilidade espermática. Esse íon tem sido considerado, além disso, um marcador das secreções das vesículas seminais, atuando como antagonista do Ca intracelular. O Cu tem sido identificado como elemento altamente tóxico para os espermatozoides (Wong *et al.*, 2001). O Na<sup>+</sup> e o K<sup>+</sup> são os principais eletrólitos que influenciam a viabilidade espermática. A estimativa destes constituintes pode ser usada para prever a qualidade seminal, a congelabilidade e a fertilidade de touros, ajudando a selecionar reprodutores para a inseminação artificial (Dhami e Kodagali, 1987).

Morais *et al.* (1994) avaliaram as concentrações de Na, K, Ca e Mg do sêmen e do plasma seminal de seis jumentos da raça Pêga. As concentrações medias de Na, K, Ca e Mg foram, respectivamente, de 238,26± 67,92, 105,20 ± 32,14, 13,24 ± 1,62 e 1,54 ± 0,10 mg para cada 100mL de plasma seminal. Os resultados obtidos naquele estudo foram confrontados com dados publicados na literatura, relativos a jumentos e garanhões, sendo em geral muito próximos. Como exceção, foram citados as concentrações de Mg que se mostraram relativamente baixas. Em virtude da similaridade existente entre as características seminais de asininos e equinos, acredita-se que os métodos utilizados para o congelamento do sêmen equino possam, em princípio, serem utilizados para o sêmen de jumentos. Confirmação desta hipótese depende de estudos complementares.

#### 3.1.4.4.4. Macromoléculas

Tem sido preconizada a adição de macromoléculas aos diluidores visando minimizar os efeitos deletérios do choque pelo frio sobre as células espermáticas durante o resfriamento e/ou congelamento. Devido à sua composição protéica e capacidade de proteção, os diluidores à base de leite tem sido muito utilizados para proteger os espermatozoides contra o choque térmico, assim como a gema de ovo, ou a combinação de ambos (Mello, 2005).

A gema de ovo exerce efeitos benéficos sobre as células espermáticas de várias espécies, sendo por isso incorporada aos diluidores utilizados para a conservação do sêmen. Ela oferece grande proteção às membranas espermáticas durante o procedimento de criopreservação, e protege os espermatozoides do choque pelo frio (Lusignan *et al.*, 2011b). A gema de ovo vem sendo estudada por mais de 60 anos, tendo sido utilizada tanto em diluidores visando o resfriamento quanto o congelamento do sêmen. No entanto, o mecanismo pelo qual a gema de ovo protege os espermatozoides durante o armazenamento não era conhecido até recentemente (Manjunath *et al.*, 2002).

O primeiro a utilizar a gema de ovo em diluidores para o sêmen de asininos e de garanhões foi Berliner (1942), em uma central de reprodução equídea nos Estados Unidos. A partir daí, vários autores vêm utilizando a gema de ovo em diluidores de sêmen asinino e equino (Krause e Grove, 1967; Trimeche *et al.*, 1998; Vidament, 2005; Flores *et al.*, 2008; Vidament *et al.*, 2009; Jepsen *et al.*, 2010; Legha *et al.*, 2012; Rota *et al.*, 2012). A gema de ovo de galinha é a mais utilizada nos diluidores de sêmen de equídeos. Porém, autores como Trimeche *et al.* (1998) utilizaram a gema de ovo de codorna, concluindo que esta exerce maior efeito protetor aos espermatozoides asininos durante o processo de congelamento e descongelamento, em comparação à de galinha.

Manjunath *et al.* (2002) demonstraram que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo, se ligam à proteínas presentes no plasma seminal (BSPs), que são prejudiciais aos

espermatóides. A ligação das BSPs com as LDLs é rápida, específica e saturável, sendo os complexos formados (LDL-BSP) estáveis. As LDLs tem capacidade de se ligarem a um grande número de BSPs, sendo que cada LDL pode se ligar a 240 – 555 BSPs, formando complexos estáveis mesmo após o descongelamento. O efluxo de colesterol provocado pelas BSPs resulta na desestabilização da membrana plasmática, diminuindo a resistência espermática ao choque pelo frio e ao congelamento. Quando o sêmen é diluído em diluidores contendo gema de ovo, dentro de minutos após a coleta, as lipoproteínas (LDLs) sequestram a maior parte das proteínas BSPs, presentes no plasma seminal, resultando em uma modificação mínima da membrana plasmática dos espermatozoides. Assim, as lipoproteínas da gema de ovo (LDLs) podem oferecer proteção aos espermatozoides, pela redução do efeito deletério das proteínas BSP sobre a membrana plasmática, resultando em melhor qualidade do sêmen resfriado e /ou congelado.

Segundo Lusignan *et al.* (2011b), as BSPs são adicionadas aos espermatozoides durante a ejaculação, ligando-se à membrana espermática e mobilizando lipídios da mesma, sendo este um fenômeno essencial para a fertilização. Posteriormente, os espermatozoides migram através da mucosa cervical durante 15-20 minutos. Neste caso, as proteínas BSPs participam da capacitação espermática que ocorre no sistema genital feminino. No entanto, quando o sêmen é coletado visando o seu armazenamento *in vitro*, os espermatozoides ficam mais tempo em contato com as proteínas BSPs. Este contato prolongado induz uma vasta remoção dos lipídios da membrana espermática, tornando-a mais sensível ao choque pelo frio, durante o congelamento. Curiosamente, as proteínas BSPs interagem com as lipo-proteínas de baixa densidade, um dos principais constituintes dos diluidores à base de gema de ovo. Assim, o efeito benéfico da mesma, durante a diluição do sêmen, se deve, provavelmente, à uma rápida interação entre as LDLs e as proteínas BSPs, que impediria os efeitos prejudiciais do contato prolongado entre as proteínas BSPs e a membrana dos espermatozoides. Assim, Lusignan *et al.* (2011a), postulam que o sequestro das proteínas BSPs pelas LDLs da gema de ovo poderia ser o principal mecanismo de proteção espermática, quando de sua utilização.

Entretanto, tem sido demonstrado que altas concentrações de gema de ovo nos diluidores de sêmen de asininos podem ser prejudiciais aos espermatozoides. Neste sentido, Jepsen *et al.* (2010) observaram que 20% de gema de ovo em diluidores de sêmen, foi prejudicial aos espermatozoides de asininos, enquanto o percentual de 5% foi benéfico. Da mesma forma, Carvalho (2011) também não obteve boas taxas de gestação em éguas quando utilizou o sêmen asinino diluído em diluidor contendo 20% de gema de ovo, antes do resfriamento, sendo os jumentos submetidos à coleta fracionada. A autora comparou a diluição do sêmen asinino em diluidor LPDG (leite em pó desnatado – glicose – Kenney *et al.*, 1975) ou em LGO (lactose – 20% gema de ovo – Nagase e Niwa, 1964), quando observou que as células espermáticas diluídas no diluidor LPDG, mantiveram valores de vigor espermático mais regulares que as diluídas em LGO, notadamente no que se refere às quedas progressivas destes valores, após 24 horas de armazenamento à 5°C. Sales (2011) também coletou o sêmen de jumentos de forma fracionada, diluindo-o em diluidores contendo 18,57% ou 20% de gema de ovo. Neste estudo, ao inseminar éguas com o sêmen congelado-descongelado, obteve-se baixa taxa de fertilidade. Assim, nos três estudos mencionados anteriormente, propôs-se a existência de uma interação negativa entre a retirada do plasma seminal e a presença de alta concentração de gema de ovo, respondendo pela contraceptividade do sêmen resfriado ou congelado de jumentos, subsequentemente a centrifugação (Jepsen *et al.*, 2010) ou a uma coleta fracionada (Sales, 2011). Assim, preconiza-se que ao se utilizar o sêmen armazenado resfriado ou congelado de asininos, deve-se diluí-lo em diluidores contendo menores concentrações de gema de ovo. Esses resultados encontram respaldo na hipótese de Manjunath *et al.* (2002), que ao trabalharem com

sêmen de touros, sugeriram que as LDL presentes na gema de ovo, poderiam interagir com as proteínas presentes no plasma seminal, as BSP's, inibindo sua ligação aos fosfolipídeos da membrana plasmática, com conseqüente inibição do efluxo de colesterol e fosfolipídeos e assim, da capacitação espermática. Dentro deste contexto, pode ser que a alta concentração de gema de ovo utilizada pelas três autoras citadas anteriormente (Jepsen *et al.*, 2010; Carvalho, 2011; Sales, 2011), para diluir o sêmen asinino, cujo, plasma seminal havia sido removido durante a centrifugação ou coleta fracionada, forneceram LDL's em grande quantidade, na presença de uma pequena quantidade de BSP's para se ligarem, removidas quando da retirada do plasma seminal, ocasionando um excesso de LDLs livres. O excesso de LDLs livres pode, desta forma, ter produzido um bloqueio à capacitação espermática, resultando em taxa de gestação inaceitável (0%).

Durante a monta natural também existe um mecanismo para eliminar o efeito prejudicial das proteínas BSPs sobre as células espermáticas. Assim, após serem ejaculados na vagina, os espermatozoides nadam através do muco cervical e entram no útero em poucos minutos, sendo que o muco cervical funciona como uma barreira para o plasma seminal (Manjunath *et al.*, 2002).

Diluidores à base de leite são conhecidos por serem práticos e eficazes na proteção dos espermatozoides equinos durante o armazenamento. Entretanto, devido à complexa composição do leite, seus componentes benéficos ou prejudiciais para os espermatozoides eram desconhecidos até um período relativamente recente (Batellier *et al.*, 1997).

Tanto o leite desnatado quanto o integral aquecidos são utilizados como diluidores visando a preservação do sêmen. O sêmen pode ser diluído diretamente nesses diluidores e armazenado à 4°C ou congelado na presença de crioprotetores. Os lipídios do leite não parecem ser os constituintes responsáveis pela proteção conferida por este às células espermáticas. A lactose é o açúcar mais abundante no leite (4,8%) e parece melhorar a eficiência dos diluidores, mas não é capaz de proteger os espermatozoides isoladamente (Lusignan *et al.*, 2011a). Assim, as micelas de caseína (fosfocaseinatos), as principais proteínas do leite, parecem responder pela proteção espermática, durante a sua preservação *in vitro*. Tem sido demonstrado que as micelas de caseína isoladas a partir do leite podem proteger os espermatozoides dos garanhões, dos caprinos, dos ovinos e os dos touros, durante o armazenamento à 4-5°C (Bergeron e Manjunath, 2006). A ação protetora conferida pelo leite às células espermáticas, é análoga à da gema de ovo, largamente utilizada como um componente dos diluidores utilizados para o armazenamento do sêmen de touros. Como no caso da gema de ovo, o leite impede a ligação das proteínas BSPs aos espermatozoides de forma a reduzir a perda de lipídios da membrana, enquanto mantém a motilidade dos espermatozoides, bem como a sua viabilidade, durante o armazenamento. Curiosamente, enquanto a proteção dos espermatozoides pela gema de ovo envolve o sequestro de proteínas BSPs pelas LDLs, presentes na gema do ovo (interação proteína-lipoproteína), a proteção do leite desnatado não envolve a participação de lipídios e lipoproteínas. Aqui, são as micelas de caseína, presentes no leite desnatado, que sequestram as proteínas BSPs (proteína-proteína) (Bergeron *et al.*, 2007).

Batellier *et al.* (1997) avaliaram o efeito das várias frações do leite sobre a motilidade dos espermatozoides de garanhões armazenados em duas diferentes temperaturas, à 4° ou 15°C. O sêmen era diluído em três diluidores: 1) HGLL-BSA - solução de sais de Hanks, glicose, lactose, tamponado por HEPES e suplementado com 1% BSA, armazenado à 15°C; 2) INRA 82 - armazenado à 4°C e 3) leite UHT desnatado - armazenado à 4°C. As frações testadas foram o

fosfocaseinato natural, a  $\beta$ -caseína, o concentrado de proteína de soro de leite, a  $\alpha$ -lactalbumina, a  $\beta$ -lactoglobulina, um microfiltrado, e um ultrafiltrado. Após 24 horas de armazenamento, observaram que alguns componentes agiram melhor no armazenamento à 4°C e outros à 15°C. Neste estudo, demonstrou-se que o fosfocaseinato de leite possui efeito positivo sobre a sobrevivência dos espermatozoides, assim como a  $\beta$ -lactoglobulina. O sêmen diluído no diluidor 1 ou no diluidor 2, armazenado por 24 horas à 15°C ou à 4°C, respectivamente, apresentou similaridade no que diz respeito à motilidade espermática. Entretanto, a fertilidade do sêmen armazenado no diluidor 1, acrescido de fosfocaseinato, foi maior que a do sêmen diluído no diluidor 2, de 60% e 36%, respectivamente. Entretanto, o mecanismo de ação pelo qual estes componentes exercem sua função crioprotetora ainda não está claro.

Boeta e Quintero (2000) compararam a utilização do leite desnatado UHT e do diluidor de Kenney *et al.* (1975), que contém leite em pó desnatado-glicose-bicarbonato de sódio e antibióticos (LPDG), para diluição do sêmen asinino, seguida por resfriamento à 5°C. Foram inseminadas onze éguas com o diluidor LPDG e dezessete com o diluidor de leite desnatado UHT, obtendo-se taxas de gestação de 54,5% (6/11) e 76,5% (13/17), respectivamente. Os resultados deste estudo sugerem que o uso do leite comercial oferece vantagens consideráveis, pois, apresenta baixo preço, encontra-se amplamente disponível, permanece estéril até ser aberto, e está pronto para ser utilizado, sem qualquer outra preparação. Diaz *et al.* (2009) também avaliaram o leite desnatado, acrescido de glicose e lactose para diluir o sêmen de asinino, sendo no grupo controle utilizada a monta natural. As taxas de gestação foram de 53,8% e 32,08% para as éguas inseminadas e cobertas por monta natural, respectivamente.

#### 3.1.4.4.5. Estabilizantes de membrana

O processo de criopreservação induz danos parcialmente irreversíveis aos espermatozoides, acompanhados pela redução da fertilidade. Durante a fase de transição, os fosfolipídios são removidos da membrana plasmática levando ao aumento da sua permeabilidade e morte celular. A relação de colesterol:fosfolipídios da membrana plasmática é determinante da sua fluidez e estabilidade durante o congelamento (Romualdo *et al.*, 2009).

O colesterol reduz a temperatura de transição das membranas, mantendo-as fluídas, reduzindo seus danos e o rearranjo de fosfolipídios à baixas temperaturas, durante o processo de resfriamento e/ou congelamento. O colesterol pode ser incorporado à membrana plasmática de vários tipos celulares, inclusive dos espermatozoides, sendo facilmente incorporado ou extraído das mesmas, quando da utilização das ciclodextrinas (Romualdo *et al.*, 2009). As ciclodextrinas são oligossacarídeos macrocíclicos, solúveis em água, que contém um centro hidrofóbico capaz de acomodar substâncias apolares, tais como o colesterol (Jepsen *et al.*, 2012), ou seja, o centro hidrofóbico permite o transporte do colesterol para dentro ou fora da membrana espermática (Romualdo *et al.*, 2009).

A capacidade da  $\beta$ -ciclodextrina e de seu complexo de inclusão de alterar o conteúdo lipídico da membrana plasmática se deve à sua capacidade de estabelecer um equilíbrio entre as concentrações de colesterol ligados à ciclodextrina com os presentes na membrana. Em contrapartida, o colesterol causa um decréscimo da permeabilidade da membrana aos cátions, tais como o Ca, sabidamente envolvido no processo de desencadeamento da capacitação espermática. Esta característica do colesterol, reduz as chances de ocorrência da reação acrossômica antes da chegada dos espermatozoides ao ponto de fertilização (Hartwig *et al.*, 2012). Neste contexto, Jepsen *et al.* (2012) citam, que a adição da ciclodextrina a um diluidor

pode interferir no efluxo de colesterol da membrana plasmática, com indução da capacitação e reação acrossômica em espermatozoides humanos, equinos, bovinos e camundongos. Além disso, em um trabalho conduzido pelos mesmos autores, observou-se que a  $\beta$ -ciclodextrina induziu a reação acrossômica nos espermatozoides asininos descongelados.

Alvarez *et al.* (2006) utilizaram a ciclodextrina em sêmen asinino e concluíram que o colesterol, incorporado pelo complexo metil- $\beta$ -ciclodextrina, antes da criopreservação, melhorou significativamente a motilidade e viabilidade espermáticas pós descongelamento. No mesmo estudo, observaram maior percentual de espermatozoides vivos com acrossomas intactos nos grupos tratados com 2 e 2,5 mg de ciclodextrina, em relação ao grupo controle.

Jepsen *et al.* (2010) avaliaram o efeito de diluidores contendo diferentes concentrações de gema de ovo, associadas ou não à presença de  $\beta$  metil-ciclodextrina, sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de asininos. Foram utilizados três diluidores: a) 20% de gema de ovo; b) 5% de gema de ovo; e c) 20% de gema de ovo + 60mM de  $\beta$  metil-ciclodextrina, com taxas de gestação de 6,25% (1/15), 46,5% (20/43) e de 58,3% (14/24), respectivamente. Os autores sugeriram que a ligação da  $\beta$  metil-ciclodextrina ao colesterol, no diluidor com 20% de gema de ovo, sequestrou quantidade suficiente de colesterol, de forma a neutralizar o efeito inibitório causado pelo excesso de gema de ovo, resultando em uma fertilidade comercialmente aceitável. Em um estudo conduzido por Rozas (2005), observou-se que a incubação do sêmen asinino com 1,5 ou 2,0 mg de ciclodextrina para cada  $120 \times 10^6$  de espermatozoides, antes do resfriamento, resultou em aumento das motilidades total e progressiva, bem como da integridade da membrana plasmática.

Já Torres *et al.* (2006) avaliaram o efeito da ciclodextrina no resfriamento do sêmen de garanhões, e observaram que a sua incorporação melhorou a motilidade e integridade da membrana. De acordo com Romualdo *et al.* (2009) houve melhora na sobrevivência das células espermáticas bovinas criopreservadas quando da adição da ciclodextrina, antes da criopreservação.

#### 3.1.4.4.6. Tampões

Os sistemas tampões devem ser um dos constituintes dos diluidores, para que os íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo dos espermatozoides sejam neutralizados, de forma que o pH da solução seja mantido próximo à neutralidade (6,8 a 7,1), valores considerados ótimos para os espermatozoides. Os tampões mais utilizados nos diluidores para o sêmen de bovinos são o citrato e o Tris (Tris-hidroximetil aminometano) (Borges, 2008), embora para os equinos tenham sido utilizados o bicarbonato de sódio, o citrato de sódio e o HEPES (Aurich, 2011).

#### 3.1.4.4.7. Quelantes

A criopreservação do sêmen promove a elevação das concentrações de Ca intracelular, o que resulta em disfunção e morte celular (Amann e Pickett, 1987). Assim, visando minimizar o efeito deletério do Ca durante o processo de congelamento, o etileno-diamino-tetra-acetato-dissódico (EDTA) é adicionado aos diluidores para o congelamento de sêmen (Aisen *et al.* 2000). Sua principal função é quelar o Ca no meio extracelular, visando reduzir o seu influxo para o meio intracelular, o que minimizaria o efeito deletério do Ca sobre os espermatozoides (Amann e Pickett, 1987). Assim, parece que o EDTA limita o movimento dos íons de  $\text{Ca}^{+2}$

através da membrana plasmática, retardando o início do processo de capacitação e de reação acrossômica (Jonhson *et al.*, 2000).

#### 3.1.4.4.8. Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, por um ou mais mecanismos, tais como pela inibição dos radicais livres e complexação de metais. Assim, podem agir diretamente neutralizando a ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos que tenham essa função. O sistema antioxidante representa a defesa dos organismos contra as espécies reativas ao oxigênio (ROS), sendo constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ . Existem também as defesas secundárias que impedem a propagação da lipoperoxidação, e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (Barros, 2010).

Os espermatozoides possuem a capacidade inerente de produzir espécies reativas ao oxigênio (ROS), responsáveis por alterações espermáticas indispensáveis ao processo de fertilização (Silva *et al.*, 2008). Entretanto, a produção excessiva de ROS determina estresse oxidativo que prejudica a sobrevivência e a manutenção da capacidade fertilizante desses gametas (Silva *et al.*, 2008; Cocchia *et al.*, 2011). Alguns procedimentos utilizados em laboratório, para o congelamento celular, aumentam a produção de ROS (Silva *et al.*, 2008), ou seja, acarretam estresse oxidativo às células espermáticas. Assim, a adição de antioxidantes aos diluidores de congelamento e resfriamento do sêmen proporcionam proteção aos espermatozoides contra os danos induzidos pelos radicais livres sobre a sua motilidade, viabilidade, produção de energia e integridade do DNA. Além disso, interrompem a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas, em diversas espécies de animais (Maia e Bicudo, 2009). Neste contexto, ainda, Ball *et al.* (2011) observaram que espermatozoides anormais geram maiores quantidades de ROS, que podem contribuir para a baixa fertilidade ou problemas relacionados com a preservação do sêmen.

Visando manter a integridade da membrana e aumentar a viabilidade espermática, experimentos utilizando antioxidantes, como componentes do diluidor, tem sido realizados em várias espécies. Nestes experimentos, tem sido observado que os antioxidantes inibem ou diminuem a produção de radicais livres, entretanto, podem não interferir nos parâmetros de viabilidade espermática (Borges, 2008). Destacam-se entre eles a catalase, a glutathione redutase, a glutathione peroxidase e a vitamina E. Tem sido utilizada, ainda, a cisteína, capaz de penetrar através das membranas celulares e atuar como antioxidante, seja diretamente ou participando da biossíntese intracelular de glutathione redutase. A glutathione redutase atua como co-fator para a glutathione peroxidase durante processos catalíticos de redução de hidroperóxidos, protegendo a célula contra o estresse oxidativo (Reghini *et al.*, 2010).

A glutathione reduzida está presente na maioria das células, podendo ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante, protegendo-as contra a lesão resultante da exposição à agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta (Ferreira e Matsubara, 1997).

A Glutathiona-peroxidase (GSH-Px) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoois, convertendo glutathiona reduzida em glutathiona oxidada (Ferreira e Matsubara, 1997).

A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) é capaz de interagir diretamente com radicais oxidantes interrompendo a reação em cadeia da peroxidação lipídica em biomembranas e lipoproteínas, protegendo as células do estresse oxidativo e de danos às membranas plasmática e acrossomal, bem como ao DNA. O trolox é um análogo do  $\alpha$ -tocoferol hidrossolúvel e, em virtude da sua solubilidade em água, apresenta potente propriedade antioxidante (Silva *et al.*, 2009).

A catalase é uma enzima, que atua na proteção dos espermatozoides contra os danos provocados pelos ROS. Ela degrada o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) para água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) (Asadpour *et al.*, 2011).

Reghini *et al.* (2010) realizaram um estudo envolvendo o balanço entre produção de radicais livres e a sua eliminação, pela adição do antioxidante N-acetilcisteína a um diluidor comercial de sêmen equino (Botu-sêmen®). Verificaram, neste estudo, os parâmetros de motilidade espermática e integridade da membrana de espermatozoides equinos diluídos e conservados à 5°C ou 15°C, com diferentes concentrações de N-acetilcisteína, de 0mm (controle), 1mM, 5mM, 10mM, 15mM e 20mM, à uma concentração de 50 milhões de espermatozoides. Os parâmetros espermáticos motilidade total, motilidade progressiva e integridade da membrana, tanto pré quanto pós refrigeração, não apresentaram diferenças estatísticas quando adicionou-se as diferentes concentrações de N-acetilcisteína, em relação ao grupo controle. Os resultados deste experimento demonstraram que esta substância pode ser adicionada aos diluidores utilizados para refrigeração de sêmen equino, sem causar danos aos espermatozoides. No entanto, estudos devem ser realizados de forma a analisar o seu efeito antioxidante através da dosagem de ROS nas amostras, notadamente no sêmen da espécie equina.

Silva *et al* (2008) avaliaram o efeito do piruvato e trolox (forma solúvel da vitamina E) sobre a qualidade espermática do sêmen equino pós-descongelamento. Foram utilizados diluidores contendo 2mM de piruvato ou 120mM de trolox. Neste trabalho, avaliou-se as motilidades total e progressiva, a integridade das membranas plasmática e acrossômica, a integridade do DNA, a estabilidade da membrana, bem como o potencial da membrana mitocondrial. A única diferença estatística significativa encontrada envolveu a motilidade espermática total, que foi maior no diluidor com piruvato. O piruvato é um substrato energético, tendo uma ação limitada como antioxidante e preserva a motilidade espermática total em garanhões férteis e subférteis. Entretanto, neste estudo, os antioxidantes piruvato e trolox, utilizados nas doses de 2mM e 120mM, respectivamente, não preservaram os parâmetros seminais de equinos submetidos ao congelamento/descongelamento. Provavelmente, outros fatores tenham interferido de forma negativa na qualidade seminal pós-descongelamento, que não apenas a ação das ROS.

Cocchia *et al.* (2011) avaliaram a qualidade do sêmen refrigerado de garanhões, processado com diluidores contendo superóxido dismutase, em diferentes concentrações, como aditivo antioxidante. Além de avaliar as motilidades total e progressiva, viabilidade espermática e integridade do acrossoma, avaliou-se o seu efeito sobre a fosforilação da proteína quinase, regulada por sinais extracelulares (ERK), sendo o sêmen diluído em diluidor de leite desnatado – glicose e resfriado à 5°C. Os autores concluíram que a adição de superóxido dismutase aos diluidores de sêmen, melhorou a qualidade do sêmen equino refrigerado e reduziu a ativação da ERK.

#### 3.1.4.4.9. Detergentes

Os detergentes, provavelmente, alteram as interações entre as lipoproteínas da gema de ovo e da membrana plasmática dos espermatozoides (Pickett e Amann, 1993). Eles aumentam a solubilidade dos fosfolipídios da gema de ovo, melhorando a sua disponibilidade e, assim, a sua capacidade de proteção à membrana plasmática dos espermatozoides contra o choque térmico e as alterações promovidas pelo processo de criopreservação (Rota *et al.*, 1997).

Em alguns trabalhos têm sido proposto a introdução de substâncias detergentes ao diluidor de congelamento, como a Pasta Equex STM (Nova Chemical Sales, Scituate, MA, EUA) cujo princípio ativo é o dodecil-sulfato de sódio (SDS), visando melhorar a sobrevivência, a longevidade e a fertilidade dos espermatozoides, após o descongelamento (Peña e Linde Forsberg, 2000; Peña *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2005). O dodecil sulfato de sódio é um detergente aniônico do grupo alquil, cujo efeito protetor sobre as células espermáticas não está ainda totalmente compreendido. Sua função é solubilizar as lipoproteínas da gema de ovo e aumentar seu potencial de proteção às células espermáticas. Entretanto, uma exposição prolongada dos espermatozoides ao dodecil-sulfato de sódio poderia conferir um excesso de fluidez à sua membrana plasmática, ocasionando um prejuízo à qualidade espermática (Peña e Linde-Forsberg, 2000).

Maia *et al.* (2005) avaliaram o efeito da adição do detergente Equex-STM ao diluidor, sobre a motilidade espermática, após o descongelamento do sêmen de carneiros. O sêmen foi diluído em diluidor Tris-gema (3,028g de Tris-hidroximetil-amino metano, 1,675g de ácido cítrico monohidratado, 0,2g de glicose, 20mL de gema de ovo em 100mL de água bi-destilada, a uma concentração final de 7% de glicerol), contendo três diferentes concentrações de Equex-STM, a saber, de 0, 0,5 ou 1,0%. A adição de 0,5 e 1% de Equex-STM, ao diluidor Tris-gema, aumentou significativamente as motilidades total e progressiva dos espermatozoides, em relação ao diluidor sem detergente. Assim, concluiu-se que tais diluidores podem ser utilizados para a criopreservação do sêmen de ovinos, em virtude do incremento quanti-qualitativamente da motilidade espermática.

Peña *et al.* (2003) compararam os efeitos de duas preparações comerciais ( Pasta Equex STM ou Pasta Equex), ao sêmen canino. Cada ejaculado foi centrifugado, sendo o plasma seminal descartado e o sedimento rediluído em diluidor à base de Tris-glicose-gema de ovo, contendo 3% de glicerol (D1-1), à uma concentração espermática de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O sêmen diluído foi dividido em três alíquotas com volumes iguais e submetidas a um tempo de equilíbrio de 1 hora à 4°C. Após este período, foram adicionadas, respectivamente, a cada uma das três amostras: (A) D- 2A (mesma composição que D-1, porém com 7% de glicerol e 1% Pasta Equex STM), (B) D-2B (mesma composição que D-1, porém com 7% de glicerol e 1% Pasta Equex), e (C) D-2 (Controle: mesma composição de D-1, porém com 7% de glicerol). Ao avaliarem o sêmen após o descongelamento observaram que a qualidade do movimento e o tempo de sobrevivência espermática foram superiores na presença do D-2A (Pasta Equex STM), embora não houvesse diferenças entre D-2B (contendo Pasta Equex) e D-2 (controle).

#### 3.1.4.4.10. Crioprotetores

Os crioprotetores devem ser adicionados aos diluidores de sêmen para que haja uma proteção das células espermáticas, durante os processos de criopreservação e descongelamento (Squires

*et al.*, 1999; Arruda, 2000). Eles são importantes para evitar a formação de gelo intracelular (Medeiros *et al.*, 2002). O mecanismo de ação dos crioprotetores ainda não está bem compreendido, podendo estas substâncias atuarem via propriedade coligativa da água, causando uma redução do ponto de congelamento de uma solução. Tais compostos diminuem a formação de cristais de gelo, atuam como solventes e reduzem a concentração de solutos no meio externo, evitando a lesão da membrana plasmática (Watson, 1981).

Existem duas classes de crioprotetores, os penetrantes e os não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes recebem este nome, pois, conseguem atravessar a membrana plasmática do espermatozoide e atuam no meio intra e extracelular. Neste grupo, incluem-se as pequenas moléculas como o etilenoglicol, glicerol, propilenoglicol, acetamida e outras amidas, 1,2 propanodiol e o dimetilsulfoxido (DMSO). A maioria dos crioprotetores penetrantes agem como solvente e como soluto. Já os não penetrantes, são grandes moléculas que não atravessam a membrana plasmática e podem ser proteínas como as presentes no leite e na gema de ovo, açúcares como a lactose, frutose, manose, rafinose e trehalose e os polímeros sintéticos como o polivinilpirrolidona e a metilcelulose (McKinnon, 1996).

Os crioprotetores mais utilizados para o armazenamento do sêmen de bovinos são a gema de ovo, o leite e o glicerol, sendo estes componentes indispensáveis. No entanto, representam um risco de contaminação do sêmen, além de sua composição não ser uniforme. Em virtude disto, há um crescente interesse no desenvolvimento de novos diluidores livres de produtos de origem animal. No entanto, é difícil encontrar componentes que substituam a gema de ovo e o leite, porque seus mecanismos de proteção dos espermatozoides, quando do armazenamento, refrigeração e congelamento, permanecem obscuros (Bergeron e Manjunath, 2006).

Para alguns animais, tais como os coelhos, galinhas e peixes, o glicerol possui efeito contraceptivo, embora as amidas pareçam ser uma boa alternativa de crioproteção para o congelamento do sêmen destas espécies (Alvarenga *et al.*, 2003). A utilização do glicerol causa lesões nas células durante o processo de congelamento, aditivamente aos danos provocados pelas baixas temperaturas de congelamento aos espermatozoides. Vários estudos têm demonstrado resultados encorajadores associados ao uso de amidas como crioprotetores para o sêmen de garanhões, sendo mais notáveis para garanhões cujo sêmen tem baixa congelabilidade na presença do glicerol. Tem sido sugerido que o crioprotetor ideal deve ter baixo peso molecular, grande solubilidade em água e mínima toxicidade. Assim, observa-se que a maioria das amidas possui peso molecular mais baixo que o glicerol, ou seja, podem induzir menores danos osmóticos aos espermatozoides (Alvarenga *et al.*, 2005).

Segundo Rota *et al.* (2012), a inseminação artificial com sêmen criopreservado de jumentos tem apresentado resultados decepcionantes. Postula-se que o glicerol, o crioprotetor mais comumente utilizado na criopreservação do sêmen de garanhões (*Equus caballus*), seja tóxico para os espermatozoides dos jumentos ou possa exercer um forte efeito contraceptivo, notadamente quando utilizado para a inseminação de jumentas (Vidament *et al.*, 2009; Rota *et al.*, 2012). Segundo Vidament *et al.* (2009), a dose tóxica de glicerol para os espermatozoides de jumentos é quase a metade da dose tóxica para o sêmen de garanhões. Assim, além da dimetilformamida, o etilenoglicol, tem sido utilizado visando substituir o glicerol, como crioprotetor, para o congelamento do sêmen do garanhão, com sucesso variável, quanto às taxas de gestação obtidas.

Neste contexto, Rota *et al.* (2012) compararam a utilização do glicerol ou etilenoglicol como crioprotetores para o congelamento do sêmen asinino, quando utilizou-se o diluidor INRA-96 com 2% de gema de ovo + glicerol ou etilenoglicol. Os resultados foram similares para os dois crioprotetores utilizados. Vidament *et al.* (1997) também compararam os dois crioprotetores, sendo que o etilenoglicol apresentou melhores resultados no que se refere à fertilização de jumentas.

Para avaliar o efeito de diferentes crioprotetores, Oliveira *et al.* (2006) utilizaram trinta ejaculados diluídos na proporção 1:1, centrifugados e ressuspensos em várias combinações de dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DF), dimetilacetamida (DA) e glicerol. As combinações foram as seguintes: a) 2%DMSO +2%DF; b) 3% DF; c)2% DA + 2% de glicerol; d)3% DA; e) 3% de glicerol + 2% DF e f) 3% DMSO + 2% de glicerol. As amostras foram congeladas em palhetas de 0,5mL. Após o descongelamento, não houve diferenças nos parâmetros espermáticos, entre as seis combinações. Este estudo demonstrou que todos os crioprotetores foram eficientes para a proteção dos espermatozoides, durante o processo de criopreservação. Entretanto, a taxa de gestação de jumentas foi de 0% (0/53), sendo em éguas de 40% (4/10).

Vidament *et al.* (2009) avaliaram o efeito de crioprotetores sobre as taxas de gestação/ciclo em jumentas e éguas. Ao compararem os resultados das inseminações de jumentas e éguas utilizando o sêmen refrigerado ou congelado de jumentos e garanhões, analisaram os possíveis efeitos tóxicos do crioprotetor glicerol nas duas espécies e estudaram soluções alternativas. O procedimento pré-congelamento incluiu a diluição do sêmen, centrifugação, ressuspensão em leite ou em INRA 82 + 2% de gema de ovo + diferentes concentrações de crioprotetor. Em seguida, o sêmen foi resfriado à 4°C. A taxa de gestação foi similar em éguas e jumentas inseminadas com o sêmen de jumentos resfriado à 4°C em leite. Entretanto, a taxa de gestação foi significativamente maior em éguas do que em jumentas quando o sêmen de jumentos foi congelado com 2,2% de glicerol (36%, n= 50 ciclos; 11%, n = 38 ciclos, respectivamente). Quando as concentrações de glicerol foram aumentadas (0; 2,2; 3,5; 4,8%) antes do resfriamento do sêmen de garanhões, observou-se redução progressiva das taxas de gestação das éguas (87, 53, 53 e 13%, sendo utilizados 15 ciclos para cada tratamento). A adição de 2,2% de glicerol, antes do resfriamento do sêmen de jumentos, diminuiu a taxa de gestação para zero, quando inseminou-se jumentas. A substituição do glicerol por dimetilformamida (2%) aumentou a fertilidade de jumentas inseminadas com sêmen refrigerado de jumentos (67% gestantes, sendo 12 ciclos utilizados). Entretanto, não houve aumento da fertilidade quando utilizou-se o sêmen congelado-descongelado de jumentos (11% gestantes, sendo 28 ciclos utilizados com dimetilformamida e 16 ciclos com glicerol). Ao final dos experimentos, concluíram que a capacidade de jumentas tornarem-se gestantes, após a inseminação artificial com sêmen congelado de jumentos, foi menor que a das éguas. Verificaram, ainda, que o glicerol é tóxico tanto para o sêmen de garanhões quanto de jumentos. Assim, o percentual de glicerol a ser utilizado no processo de congelamento do sêmen de garanhões deve ser baixo, para que se obtenham boas taxas de fertilidade. Enfatizam, ainda, que a sensibilidade dos espermatozoides dos jumentos ao glicerol, não parece ser a única responsável pelo insucesso do sêmen de asininos, pois, a sua substituição pela dimetilformamida não melhorou os resultados de fertilidade.

#### 3.1.4.4.11. Antibióticos

As bactérias são originárias principalmente das criptas do pênis e das pregas do prepúcio, estando presentes, comumente, no ejaculado de garanhões. Desta forma, tem sido responsáveis pela contaminação bacteriana do útero das fêmeas (Vieira *et al.*, 2002). A forma mais eficaz para controlar as bactérias presentes no sêmen é a utilização de antibióticos nos diluidores de sêmen (Jasko *et al.*, 1993). Esta redução poderia ser útil, especialmente, nos casos de éguas susceptíveis à endometrite, quando o risco de infecção uterina seria minimizado, com consequente aumento das chances de gestação. Entretanto, alguns agentes antimicrobianos causam efeitos negativos na motilidade e sobrevivência espermática, efeitos que podem ser acentuados pela exposição prolongada dos espermatozoides aos mesmos quando o sêmen é resfriado (Vieira *et al.*, 2002).

Os antibióticos mais comumente utilizados nos diluidores de sêmen são o sulfato de amicacina, o sulfato de gentamicina, o sulfato de estreptomicina, a penicilina g potássica, a Kanamicina e a polimixina B (Jasko *et al.*, 1993).

O armazenamento prolongado do sêmen diluído, mesmo em temperaturas reduzidas, pode favorecer o crescimento bacteriano na ausência de antibiótico. No entanto, o efeito prejudicial dos antibióticos sobre a motilidade espermática pode ser maior no sêmen resfriado, devido à exposição prolongada ao antibiótico ou à uma interação dos efeitos prejudiciais do resfriamento, aditivamente ao antibiótico (Jasko *et al.* 1993).

Aurich e Spersger (2007) investigaram os efeitos das bactérias presentes no sistema genital de garanhões e da gentamicina em diluidores de sêmen, bem como a sua função quando do resfriamento-armazenamento do sêmen destes reprodutores. Para tal, o sêmen foi coletado e processado em diluidores à base de leite contendo 1g de gentamicina por litro de diluidor. Neste estudo, foram adicionadas várias bactérias ao sêmen diluído. Imediatamente após a adição das bactérias, o sêmen foi armazenado à 5°C e avaliado após 24, 48 e 72 horas, quanto à motilidade, velocidade e integridade da membrana. Após 24 horas, as amostras inoculadas com *Ps. aeruginosa* e *Sc. equisimilis* apresentaram motilidade e velocidade inferiores às de todos os outros grupos, similarmente ao que observou-se decorridas 72 horas de armazenamento do sêmen resfriado. Além disso, observou-se menor percentual de espermatozoides com a membrana intacta, após 24 horas de estocagem, no sêmen incubado com *Sc. equisimilis* e após 72 horas, no sêmen incubado com *Sc. equisimilis* e *Ps. Aeruginosa*. Mesmo sem a inoculação de bactérias, a adição da gentamicina aos diluidores reduziu a motilidade e velocidade espermáticas. Entretanto, também não houve incremento nos parâmetros de motilidade, quando as bactérias foram adicionadas. Concluindo, algumas bactérias prejudicam a qualidade do sêmen durante o armazenamento, mesmo quando resfriado, não sendo os efeitos reduzidos nem mesmo com a adição de gentamicina. A gentamicina pode afetar negativamente a função espermática no sêmen diluído e resfriado-armazenado. Desta forma, a quantidade ideal de antibióticos, presentes nos diluidores, deve ser sempre avaliada.

Visando determinar o efeito dos antibióticos sobre as características de motilidade do sêmen fresco e resfriado de garanhões, Jasko *et al.* (1993) utilizaram os seguintes antibióticos: sulfato de amicacina, ticarcilina dissódica, sulfato de gentamicina e polimixina B, nas concentrações de 1000 ou 2000 UI/mL. Neste experimento, utilizou-se o sêmen de oito garanhões, diluído em diluidor de leite em pó desnatado – glicose, incubado por uma hora à 23°C e resfriado à 5°C por 48 horas. Não houve influência dos antibióticos sobre o percentual de espermatozoides móveis, após uma hora de incubação à 23°C. Entretanto, nas amostras contendo sulfato de gentamicina, houve uma redução das motilidades total e progressiva. Além disso, as amostras sem antibiótico

apresentaram maior velocidade espermática que as contendo sulfato de amicacina ou sulfato de gentamicina. Após 24 horas de armazenamento à 5°C, não observou-se diferenças entre os antibióticos quanto ao percentual de velocidades linear e curvilínea. Entretanto, na concentração de 2000 UI/mL de sulfato de gentamicina e nas duas concentrações de polimixina B, houve redução nos percentuais das motilidades total e progressiva. O mesmo foi observado às 48 horas de resfriamento, quando as amostras diluídas em diluidor contendo sulfato de amicacina apresentaram, similarmente uma redução da motilidade total.

Vieira *et al.* (2002) estudaram o efeito da adição de antimicrobianos à diluidor de sêmen através da avaliação das motilidades progressiva e total, do percentual de integridade da membrana plasmática e da fertilidade de éguas inseminadas. Neste experimento, foram utilizados cinquenta e nove ejaculados de seis garanhões. As amostras foram diluídas em a) leite desnatado, b) leite desnatado + 50 µg/mL de sulfato de gentamicina + 50UI/mL de penicilina e c) leite desnatado + 1000 µg/mL de sulfato amicacina + 1000UI/mL de penicilina. O sêmen foi diluído, resfriado à 4 °C, armazenado e avaliado após 24, 48 e 72 horas de estocagem, quanto à motilidade e integridade da membrana. Os ejaculados diluídos em leite desnatado e leite desnatado + 50 µg/mL de sulfato de gentamicina + 50UI/mL de penicilina, apresentaram as melhores características espermáticas, diferindo significativamente das amostras diluídas em leite desnatado + 1000 µg/mL de sulfato amicacina + 1000UI/mL de penicilina. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os diluidores, quanto às taxas de gestação obtidas. Assim, observou-se que a adição de concentrações elevadas de antimicrobianos afetou a motilidade e a integridade da membrana acrossômica, quando o sêmen foi preservado à 4°C, por até 72 horas. Entretanto, doses inseminantes com no máximo  $500 \times 10^6$  espermatozoides/mL e contendo antimicrobianos responderam por boas taxas de gestação, quando utilizadas dentro de até uma hora após a coleta.

#### 3.1.4.5. Concentração espermática por mL de sêmen diluído e dose inseminante

A utilização do sêmen congelado equino representa desafios, considerando-se que as taxas de prenhez por ciclo são invariavelmente menores que as obtidas com sêmen fresco ou resfriado dos mesmos garanhões (Vanderwall, 1997), mesmo quando as doses inseminantes contêm um número adequado de espermatozoides com motilidade progressiva (Amann e Pickett, 1987).

A concentração espermática por mL de sêmen diluído ideal, quando os espermatozoides são congelados em palhetas de 0,5mL, visando uma sobrevivência espermática adequada tem sido estudada por vários autores.

Há que se salientar que ao longo do processo de congelamento-descongelamento as células espermáticas sofrem danos. Assim, recomendam-se concentrações mais altas de espermatozoides/mL, para que se mantenha um número razoável de células viáveis pós-descongelamento.

Avaliações *in vitro* têm sido feitas visando estabelecer se altas concentrações espermáticas por mL do sêmen diluído podem interferir em sua qualidade. Assim, Arruda (2000) recomenda uma concentração espermática de 200 (duzentos) milhões de espermatozoides/mL.

Crockett *et al.* (2001) estudaram o congelamento de sêmen equino com concentrações de 50, 250 e  $500 \times 10^6$  espermatozoides/mL, sendo o sêmen resfriado por 12 horas à 5 °C, pré-

congelamento. Após o descongelamento, observou-se que a concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL apresentou o melhor percentual de motilidade progressiva, (25%), seguido pelo observado nas amostras contendo  $250 \times 10^6$  espermatozoides/mL, de 23%. Resultados inferiores foram observados nas amostras contendo  $500 \times 10^6$  espermatozoides/mL, de 17%.

Osorio (2006) optou por uma concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL de sêmen diluído pré-congelamento, ao congelar o sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. Neste trabalho, a motilidade progressiva pós-descongelamento variou de  $33,33\% \pm 4,08$  a  $40,83\% \pm 6,45$ , dependendo do tempo de adição do crioprotetor e das curvas de resfriamento e congelamento utilizadas.

Finalmente, Contri *et al.* (2012) coletaram o sêmen de sete jumentos da raça Martina Franca para avaliar se a concentração espermática por mL, interfere na qualidade espermática pós descongelamento. Neste estudo, avaliaram diferentes concentrações, a saber: 100, 250, 500, 750 e  $1000 \times 10^6$  de espermatozoides por mL de sêmen diluído. As palhetas que continham menores concentrações apresentaram os melhores resultados de motilidade, viabilidade e integridade da membrana, após o descongelamento. Assim, os melhores resultados foram associados às concentrações de 100 e  $250 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Recomendações sobre a concentração espermática ideal por dose inseminante em equídeos, associada à taxa de gestação satisfatória, têm variado entre os autores. Assim, para o sêmen fresco, Pickett *et al.* (1975) recomendaram uma concentração de  $500 \times 10^6$  espermatozoides móveis para cada dose inseminante utilizada dentro do haras. Para o sêmen resfriado e transportado, tem sido preconizadas doses inseminantes com  $1000 \times 10^6$  espermatozoides móveis e até mais concentradas ( $2000 \times 10^6$ ), dependendo do tempo de estocagem do sêmen. Para o sêmen congelado, tem sido recomendadas concentrações de  $800 \times 10^6$  espermatozoides, por dose inseminante, com pelo menos 30% de motilidade progressiva após o descongelamento. Assim como Pickett *et al.* (1975), outros autores à procura de melhores taxas de gestação com sêmen congelado, tem utilizado a motilidade progressiva como critério para o controle da qualidade seminal. Assim, Loomis *et al.* (1983) e Volkmann e Van Zyl (1987), aprovaram para a inseminação apenas as doses apresentando mais do que 30% de espermatozoides progressivamente móveis, após o descongelamento. No entanto, Cristanelli *et al.* (1984) descartaram doses com motilidade inferior à 40%.

Não existem muitos estudos envolvendo a comparação do efeito de diferentes concentrações espermáticas por dose inseminante de asininos sobre a fertilidade de éguas. Neste sentido, Leite (1994) utilizou sêmen asinino fresco diluído em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose (Kenney *et al.*, 1975), para inseminar 154 ciclos de 35 éguas. As doses utilizadas nos tratamentos continham 50, 100, 200, 400 ou  $600 \times 10^6$  espermatozoides com motilidade progressiva. Taxas de gestação proporcionadas pelas inseminações com 50 ou  $100 \times 10^6$  espermatozoides por dose, foram de 3,44% (1/29) e 20,68% (6/29), respectivamente, diferindo ( $p < 0,05$ ) das obtidas com as doses de 200, 400 ou  $600 \times 10^6$  espermatozoides, de 53,12% (17/32), 70% (21/30) e 67,64% (23/34), respectivamente. No entanto, não observou-se diferenças, quanto às taxas de gestação, entre as doses contendo 200, 400 ou  $600 \times 10^6$  espermatozoides. Neste estudo, observou-se que uma dose inseminante contendo 200 milhões de espermatozoides, com motilidade progressiva, pode proporcionar uma taxa de gestação satisfatória, em éguas inseminadas com sêmen fresco.

Ferreira (1993) ao inseminar éguas com sêmen asinino fresco diluído ou resfriado à 5°C por 24 ou 48 horas, obteve taxas de gestação de 82,7% (23/29), 80% (24/30) e 75,9% (22/29), respectivamente, sendo utilizadas doses inseminantes contendo  $250 \times 10^6$  espermatozoides móveis.

Boeta e Quintero (2000) avaliaram a taxa de gestação de éguas inseminadas com sêmen asinino resfriado à 5°C por até 48 horas, sendo o sêmen diluído em diluidor de leite UHT ou em diluidor de leite desnatado-glicose, com doses inseminantes de 10mL contendo  $400 \times 10^6$  espermatozoides. As taxas de gestação obtidas foram de 76,5% (13/17) e 54,5% (6/11), respectivamente.

Em um trabalho utilizando sêmen asinino fresco ou resfriado, diluído em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose ou à base de glicina-gema de ovo, para inseminar éguas, com doses inseminantes de  $400 \times 10^6$  espermatozoides móveis, em um volume de 20mL, Rossi (2008) obteve taxas de gestação de 63,64% (21/33), com o primeiro diluidor, e de 55,55% (45/77) com o segundo diluidor, quando utilizou-se o sêmen fresco. Entretanto, quando o sêmen foi resfriado à 5°C por até 12 horas, as taxas de gestação obtidas foram de 52,69% (49/93) e 47,06% (48/102), respectivamente.

Dentro da mesma linha de pesquisa, Carvalho (2011), não observou diferenças quanto à fertilidade das éguas, ao inseminá-las com doses inseminantes contendo 400 ou  $800 \times 10^6$  espermatozoides móveis, com volume de 22mL. Neste trabalho, após a coleta fracionada, o sêmen asinino foi diluído em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose, resfriado à 5°C e, estocado entre 12 e 24 horas. Utilizou-se 79 ciclos de 59 éguas, quando obteve-se taxas de gestação de 41,46% (17/41) e 47,37% (18/38), para as éguas inseminadas com  $400 \times 10^6$  ou  $800 \times 10^6$  espermatozoides móveis, respectivamente.

Diante da literatura apresentada anteriormente, parece que doses inseminantes contendo de 200 a  $400 \times 10^6$  de espermatozoides móveis podem resultar em taxas de gestação aceitáveis quando se utiliza o sêmen diluído a fresco ou resfriado de asininos.

De acordo com Samper (2000), os critérios mínimos quanto à concentração espermática, para se obter taxas de gestação satisfatórias, quando se utiliza o sêmen congelado de garanhões, é uma dose inseminante com 600 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva mínima de 30 a 35%, após o descongelamento.

Entretanto, para o sêmen asinino, ainda não tem sido estabelecido o número de espermatozoides padrão por dose inseminante, quando se utiliza o sêmen congelado.

Trimeche *et al.* (1998) utilizaram 21 ciclos de jumentas da raça Poitou inseminadas com sêmen congelado de jumentos, com doses inseminantes contendo  $600 \times 10^6$  de espermatozoides (20 palhetas de 0,5mL), com motilidade progressiva mínima de 35% após o descongelamento. Neste estudo, obtiveram uma taxa de gestação de 38% (8/21).

Ao trabalharem com sêmen congelado de sete jumentas da raça Zamorano-Leonés para inseminar 18 ciclos de seis jumentas, da mesma raça, Castejón (2005), obteve apenas uma gestação (1/18 – 11,1%). Neste estudo, utilizou-se apenas uma dose inseminante com  $500 \times 10^6$  de espermatozoides móveis por ciclo, 24 horas após a indução da ovulação pela administração

da hCG. Neste trabalho, também foram utilizadas doses, inseminantes com uma motilidade progressiva mínima de 35%.

Autores como Jepsen *et al.* (2010), utilizaram dose inseminante de  $300 \times 10^6$  espermatozoides móveis, para inseminar 28 éguas com o sêmen congelado de jumento, durante cinco estações consecutivas, totalizando 82 ciclos. As inseminações foram realizadas de seis horas pré-ovulação às seis horas pós-ovulação. Neste estudo, observaram-se taxas de gestação de até 58,3%, dependendo do tratamento utilizado.

No Brasil, a portaria número 26, de 05 de setembro de 1996, do Ministério da Agricultura, recomenda que o sêmen congelado de equídeos, deve conter um percentual de espermatozoides com motilidade progressiva superior à 30% e vigor maior que 3 (0 - 5), após descongelamento à 35 - 37° C, por um tempo mínimo de 30 segundos. Além disso, o sêmen não pode conter uma quantidade de células espermáticas com motilidade progressiva, pós-descongelamento, inferior à  $200 \times 10^6$  por dose inseminante.

#### 3.1.4.6. Resfriamento e congelamento do sêmen asinino

Durante o processo de resfriamento, os espermatozoides podem ser expostos a uma rápida mudança de temperatura, que pode ocasionar alguns danos aos mesmos (Moran *et al.*, 1992). Neste sentido, quando o resfriamento é realizado de forma inadequada, caracteriza-se o choque pelo frio (Amann e Picketti, 1987). Tais danos ocorrem durante a fase de transição, quando os lipídeos da membrana plasmática sofrem mudanças estruturais (Moran *et al.*, 1992). Com a redução da temperatura, os lipídios da membrana passam de um estado fluido, no qual, as cadeias de ácidos graxos são relativamente desorganizadas, para um estado de gel, em que as cadeias de ácidos graxos são rígidas e paralelas (Amann e Graham, 1993).

O choque pelo frio pode causar prejuízos irreversíveis, caracterizados pela rápida perda da motilidade, danos à membrana plasmática, redução do metabolismo espermático e movimentos circulares (Amann e Picketti, 1987). Com a membrana plasmática danificada, podem ocorrer mudanças de permeabilidade associadas à alterações funcionais e metabólicas, que aditivamente prejudicam a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides (Amann e Graham, 1993).

A sensibilidade das células espermáticas aos danos associados ao choque pelo frio varia entre espécies. Essas diferenças estão associadas à composição da membrana plasmática, notadamente no que se refere à proporção colesterol:fosfolipídios, presentes na membrana plasmática dos espermatozoides, e a sua resistência aos efeitos do choque pelo frio. Assim, na presença de maior teor de colesterol, haverá melhor capacidade das células espermáticas resistirem ao choque pelo frio. Por esse motivo, a adição de substâncias protetoras (por exemplo, leite ou gema de ovo) ao sêmen, antes do resfriamento, pode minimizar os danos causados durante o processo de resfriamento (Varner *et al.*, 1988).

Um dos pontos mais críticos para o sucesso do congelamento é a velocidade de resfriamento do sêmen (Snoeck *et al.*, 2001). Em um estudo conduzido por Douglas-Hamilton *et al.* (1984), observou-se que tanto taxas iniciais de refrigeração rápidas, superiores à 1°C/min, como taxas de refrigeração muito lentas (<0,05°C/min) foram prejudiciais à motilidade e morfologia espermáticas. A fase mais crítica no transcorrer do processo de resfriamento se deu entre as

temperaturas de 19 à 8°C (Moran *et al.*, 1992), embora no congelamento, ocorresse entre as temperaturas de -15 e -60°C (Parks e Graham, 1992).

O resfriamento lento pode causar danos às células devido às altas concentrações de soluto intracelular, resultantes do processo. Por outro lado, o resfriamento rápido (60°C/min) pode provocar a recristalização após o descongelamento, com formação de grandes cristais de gelo, que pode causar danos físicos às células (Graham, 1996).

Além da curva de resfriamento, o tipo de curva utilizada no processo de congelamento também influencia diretamente a magnitude das lesões celulares (Terraciano *et al.*, 2008), devido aos processos de desidratação espermiática que provoca mudanças intracelulares, e a formação de cristais de gelo intra e extracelulares (Amann e Pickett, 1987; Terraciano *et al.*, 2008). Sendo assim, no processo de resfriamento, qualquer dano espermiático será exacerbado no descongelamento (Amann e Pickett, 1987). Neste contexto, a redução da temperatura torna-se uma das variáveis mais importantes a ser considerada durante o congelamento do sêmen.

Em um trabalho realizado por Ferreira (1993), foram utilizadas três curvas de resfriamento para o sêmen de jumentos. Neste estudo, os ejaculados foram diluídos a uma concentração de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose ou lactose-gema de ovo. Quando de avaliações *in vitro*, não observou-se diferenças quanto à longevidade espermiática, quando o sêmen foi diluído em diluidor à base de leite em pó e resfriado nas taxas de -0,2; -0,3 ou -0,6°C/minuto. No entanto, ao utilizar-se um diluidor à base de lactose-gema de ovo, a taxa de resfriamento de -0,6°C/minuto proporcionou maior longevidade espermiática, acompanhada pela manutenção do seu poder fecundante por até 48 horas, quando preservado à 5°C. Assim, observou-se neste estudo, um efeito aditivo do diluidor e da curva de resfriamento sobre a longevidade e fertilidade do sêmen resfriado de jumentos.

Para avaliar o efeito de três taxas de resfriamento (-0,3; -0,6 e -1,0°C/minuto), Santos (1994) trabalhou 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, à uma concentração de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Neste experimento, avaliou-se os efeitos dos tratamentos sobre os resultados de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermiático. Assim, na presença de taxas de resfriamento mais rápidas (0,6 ou 1,0°C/minuto), para a conservação do sêmen à 5°C, obteve-se resultados superiores, em relação aos encontrados quando utilizou-se uma taxa mais lenta (0,3°C/minuto)

Legha e Yash Pal (2012) compararam quatro métodos de congelamento, sendo o sêmen mantido à 5°C durante duas horas, previamente ao seu envasamento em palhetas de 0,5mL. Após o envasamento, as palhetas foram divididas em quatro grupos. No primeiro grupo, as palhetas foram congeladas em bio-congelador programável, à uma taxa de -0,3°C/min, na amplitude de 18°C até 5°C. De 5°C à -15°C, utilizou-se uma taxa de -10°C/min. Finalmente, de -15°C à -100°C, utilizou-se uma taxa de -19°C/minuto, sendo as palhetas mergulhadas, em seguida, em nitrogênio líquido. Nos outros três grupos, as palhetas foram colocadas em uma caixa de isopor, horizontalmente, à 3cm acima da superfície do nitrogênio, quando permaneceram por 8, 10 ou 12min, sendo, à seguir, mergulhadas no nitrogênio líquido. Os melhores resultados foram obtidos com as palhetas mantidas por 12 minutos no vapor de nitrogênio, com percentuais de motilidade, de 35 a 65%.

Em um estudo conduzido por Legha *et al.*, 2012, utilizou-se uma curva de resfriamento de -0,3°C/min, a partir de 18°C até 5°C. Quando o sêmen diluído atingiu 5°C, foi mantido por duas horas entre 5-8°C, para em seguida, ser congelado a uma taxa de -10°C/min de 5°C até -15°C. Entre as temperaturas de -15°C à -100°C, utilizou-se uma queda de -19°C/min. Quando o sêmen atingiu a temperatura de -100°C, foi imerso em nitrogênio líquido. O sêmen de quatro jumentos foi descongelado à 37°C por um minuto e utilizado para inseminar 154 ciclos estrais de éguas, quando obteve-se uma taxa de gestação de 43,5% (67/154).

Já Flores *et al* (2008) utilizaram uma redução da temperatura, de 20 para 5°C, à uma taxa de 0,26°C/min. A seguir, utilizou-se uma queda de -4,75°C/min, entre 5°C e -90°C. Finalmente, utilizou-se uma taxa de 11,11°C/min, entre -90°C e -120°C. Neste estudo, foram feitas apenas avaliações *in vitro* do sêmen descongelado.

#### 3.1.4.7. Sistema de envasamento e armazenamento do sêmen

Diferentes sistemas e materiais tem sido testados para o envasamento do sêmen, visando reduzir os danos causados na estrutura e função dos espermatozoides durante a criopreservação. Em 1967, Krause e Grove utilizaram pellets para armazenar o sêmen congelado de jumentos e garanhões. Ao descongelarem esses pellets, os autores obtiveram de 50 a 70% de motilidade e 50% de fertilidade.

Os pellets eram produzidos colocando-se pequenas gotas de sêmen já diluído, de 0,1 até 0,2mL, em pequenas depressões de um bloco de dióxido de carbono. Os pellets assim formados eram armazenados em contêineres que mantinham temperaturas de até -196°C (Osorio *et al.*, 2008). Entretanto, os pellets não tem sido mais utilizados, em virtude de problemas associados à identificação e contaminação do sêmen (Amann e Pickett, 1987).

Ampolas de vidro com capacidade de 1 a 10mL, também foram utilizadas para o envasamento do sêmen, assim como, tubos de alumínio com capacidade de 15mL (Amann e Pickett, 1987).

Macrotubos de 5mL tem sido utilizados para o envase e congelamento do sêmen suíno. Entretanto, o congelamento e descongelamento não ocorrem de forma uniforme, devido ao seu diâmetro interno de 5,4mm. 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). Nos anos 2000, propôs-se um novo método para o envasamento do sêmen suíno, pré-congelamento, o Flatpack, que permite um congelamento e descongelamento mais uniforme que o macrotubo. O Flatpack é uma embalagem plástica achatada, feita de polietileno, com espessura de 0,2mm, 30cm de comprimento e 22mm de largura e capacidade de 5mL. Neste tipo de envasamento, os processos de congelamento e descongelamento ocorrem de maneira mais rápida e mais uniforme, quando comparado às palhetas de maior diâmetro (Eriksson e Rodriguez-Martinez, 2000).

Diferentemente do que ocorre com os suínos, a forma mais utilizada para o envase do sêmen equino envolve as palhetas de 0,5mL (Vidament *et al.*, 1997; Saragusty *et al.*, 2007). As palhetas permitem uma taxa de resfriamento mais uniforme que os outros sistemas, por possuírem maior área de superfície em relação ao volume, permitindo que o resfriamento, congelamento e descongelamento sejam mais uniformes (Amann e Pickett, 1987).

Em um estudo envolvendo dois tipos de envasamento, flatpacks e palhetas de 0,55mL, para o semen asinino, observou-se que as amostras envasadas em palhetas de 0,55mL apresentaram melhor viabilidade espermática, quando comparadas às envasadas em flatpacks (Sales, 2011).

Heitland *et al.* (1996) ao trabalharem com sêmen equino congelado, encontraram melhores resultados quando utilizaram palhetas de 0,5mL, em relação aos obtidos com macrotubos de 2,5mL.

Papa e Dell' Aqua Júnior (2001) reportaram melhores resultados de motilidade e vigor espermáticos pós-descongelamento, nas amostras de sêmen equino envasadas em palhetas de 0,55mL ou mini palhetas de 0,25mL, em relação ao que observou-se nas amostras envasadas em macrotubos de 4mL.

Diferentemente dos últimos autores, Oliveira (2005) não observou diferenças significativas, no que diz respeito às características espermáticas, quando o sêmen foi envasado em palhetas francesas de 0,55mL ou em macrotubos de 2,5mL. Em trabalho conduzido anteriormente, Crockett *et al.* (2001), também não encontrou-se diferenças significativas, quanto à motilidade pós descongelamento, no sêmen equino armazenado em palhetas de 0,5mL ou em macrotubos de 2,5mL (21 e 28%, respectivamente).

Até o presente momento, não tem sido apresentado o método de envase ideal para o congelamento do sêmen de jumentos, capaz de proporcionar os melhores resultados de motilidade e vigor espermáticos pós-descongelamento. Entretanto, tem sido observado que a palheta de 0,55mL tem oferecido maior praticidade quando do armazenamento e do descongelamento do sêmen (Sales, 2011).

#### 3.1.4.8. Descongelamento do sêmen asinino

De todas as etapas envolvidas no congelamento do sêmen, o descongelamento tem sido considerado uma das mais importantes, pois diferentes fatores físico-químicos podem influenciar a sobrevivência dos espermatozoides durante o processo de congelamento e descongelamento (Pickett e Amann, 1993).

A curva de descongelamento depende do tipo de envasamento utilizado e do tempo de exposição das células espermáticas, à uma determinada temperatura (Pickett e Amann, 1993).

Quando se opta pela curva de congelamento rápida, não há tempo suficiente para que ocorra uma desidratação adequada, resultando na formação de cristais de gelo no meio intracelular. Neste caso, é necessário que o descongelamento também ocorra de forma rápida, para que não ocorra a recristalização (fusão de cristais de gelo) e lesão celular. Entretanto, quando se utiliza uma curva lenta para o congelamento, ocorre maior desidratação celular, em virtude do maior tempo de exposição dessas células a um meio extracelular, cada vez mais hipertônico, em virtude do precoce congelamento da água deste meio. Assim, o descongelamento também deve ser lento, de forma a permitir que ocorra uma re-hidratação lenta das células espermáticas, para que essas não percam sua viabilidade morfofuncional (Mazur, 1985).

Cochran *et al.* (1984) descongelaram o sêmen equino armazenado em palhetas de 0,5mL, quando observou-se que o descongelamento rápido (75°C/7segundos) proporcionou melhores

resultados que o descongelamento mais lento (37°C/30segundos). Entretanto, o descongelamento nesta temperatura (75°C) pode ser um procedimento bastante perigoso para ser utilizado rotineiramente no campo, sem um controle absoluto do tempo de submissão do sêmen à mesma (Vidament *et al.*, 2001).

Diante destes riscos, Borg *et al.* (1997), não encontrando diferenças entre os dois métodos de descongelamento, sugerem que o sêmen equino, armazenado em palhetas de 0,55mL, deveria ser descongelado à 37°C/30segundos, por ser um método mais seguro e prático no campo.

Autores como Legha *et al.* (2012) e Legha e Yash Pal (2012) preconizaram o descongelamento do sêmen, envasado em palhetas de 0,55mL, à uma temperatura de 37°C durante um minuto, enquanto autores como Flores *et al.* (2008), Jepsen *et al.* (2010), Trimeche *et al.* (1996) descongelaram as palhetas a uma temperatura de 37°C durante 30 segundos. Por outro lado, Oliveira *et al.* (2006) descongelaram as palhetas à uma temperatura de 46°C/20segundos.

#### 3.1.4.9. Fertilidade de éguas e/ou jumentas inseminadas com sêmen fresco, resfriado ou congelado de asininos

Vários pesquisadores de todo o mundo, tem estudado a fertilidade de éguas e/ou jumentas cobertas ou inseminadas com sêmen asinino a fresco, resfriado ou congelado, notadamente o sêmen congelado e a sua utilização em jumentas, onde está apresentado o maior desafio científico.

Em um experimento conduzido no Brasil por Palhares *et al.* (1986), inseminou-se 14 jumentas com sêmen a fresco diluído em diluidor lactose-gema de ovo sem glicerol (Nagase e Niwa, 1964), com doses inseminantes contendo  $2152,51 \pm 1013,59 \times 10^6$  espermatozoides viáveis, em um volume médio de  $24,8 \pm 10,5$ mL, sendo o sêmen depositado no corpo do útero, em dias alternados, até a ovulação (média de inseminações =  $2,1 \pm 1,6$ ), a partir de um folículo com 3,0-3,5cm de diâmetro em um dos ovários. Neste estudo, obteve-se uma taxa de gestação final de 57% (8/14 jumentas).

Em 1988, Silva inseminou 214 éguas com sêmen a fresco asinino. O sêmen foi diluído em diluidor lactose-gema de ovo sem glicerol (Nagase e Niwa, 1964) e as éguas inseminadas com doses inseminantes contendo um mínimo de  $200 \times 10^6$  espermatozoides viáveis, em volumes de 5 a 10mL. A técnica de inseminação foi a intra-vaginal profunda, sendo o sêmen depositado no corpo do útero. As inseminações foram realizadas quando o folículo dominante atingia 3,5cm, em um dos ovários, em dias alternados até a ovulação. Ao final de três estações de monta consecutivas obteve-se uma taxa de gestação total de 82,2% (176/214 éguas).

Em um estudo realizado por Ferreira (1993), foram utilizados 29 ciclos estrais de éguas, para inseminação artificial com sêmen asinino fresco, diluído em diluidor lactose-gema de ovo sem glicerol (Nagase e Niwa, 1964), mantido à temperatura ambiente por um período máximo de uma hora até a inseminação. As inseminações foram realizadas no corpo do útero, a cada dois dias, até a ovulação, a partir da detecção de um folículo ovariano com 35mm de diâmetro, em éguas manifestando sinais externos de cio. A dose inseminante foi de 250 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva, baseando-se no momento da inseminação. O volume inseminante foi de  $14,27 \pm 0,71$ mL, sendo realizadas em média,  $1,48 \pm 0,57$  inseminações por égua. Neste estudo, a taxa de gestação obtida, foi de 82,7% (24/29).

Leite (1994) também avaliou a fertilidade do sêmen asinino fresco, quando inseminou 154 ciclos de 35 éguas, distribuídas entre diferentes tratamentos. As inseminações foram realizadas a cada dois dias, a partir da detecção de um folículo  $\geq 3,5$ cm de diâmetro até a ocorrência da ovulação. Neste estudo, avaliou-se a influência de diferentes concentrações espermáticas, a saber, de 50, 100, 200, 400 ou 600 x 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis por dose inseminante sobre a fertilidade de éguas. Avaliou-se, também, as interações entre concentração espermática por dose inseminante, momento e frequência de realização das inseminações artificiais. Imediatamente após a colheita, o sêmen livre de gel, foi diluído inicialmente na proporção 1/1, no diluidor de mínima contaminação (Kenney *et al.*, 1975), pré aquecido, na temperatura de 37°C. O sêmen acondicionado em saquinhos plásticos, foi mantido em banho-maria, nesta temperatura, até a diluição final e inseminação artificial. Com base na determinação da concentração espermática e da motilidade progressiva, procedeu-se o calculo do numero de doses, previamente à diluição final. Após a diluição final, as concentrações espermáticas pretendidas, para cada tratamento, foram utilizadas na preparação de doses inseminantes com volumes de 10mL. As taxas de gestação obtidas foram de, 3,44% (1/29), 20,68% (6/29), 53,12% (17/32), 70,0% (21/30) e 67,64% (23/34), respectivamente, na mesma ordem das concentrações espermáticas descritas anteriormente, neste experimento.

Em um estudo realizado em 2008, Rossi avaliou a fertilidade do sêmen asinino a fresco diluído em dois diferentes diluidores. Neste estudo, utilizou-se, 77 ciclos de 67 fêmeas equinas, inseminadas por até três vezes por semana, a partir de um folículo com 3,0-3,5cm de diâmetro até a ovulação, com sêmen asinino a fresco, diluído em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose (Kenney *et al.*, 1983), ou em diluidor à base de glicina-gema de ovo (Foote, 2002), com doses inseminantes de 20mL e 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis, no corpo do útero. A taxa de concepção/ciclo obtida com o sêmen a fresco diluído, em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose, foi de 63,64% (21/33), sendo de 54,55% (24/44), quando utilizou-se o diluidor glicina-gema de ovo, sem que houvesse diferenças (p>0,05) entre os tratamentos.

Ainda utilizando o sêmen a fresco asinino, Diaz *et al.* (2009) inseminaram 26 éguas por via transvaginal, com doses inseminantes de 25mL e 250 x 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis. O sêmen foi diluído em diluidor contendo glicose, lactose, leite desnatado e citrato de sódio. Um total de 134 éguas foi utilizado como grupo controle, e cobertas por monta natural. Neste estudo, obteve-se taxas de gestação de 53,8% (14/26) para as éguas inseminadas e de 32,08%, para as cobertas com monta natural (43/134).

Em um estudo realizado por Vidament *et al.* (2009), utilizou-se sêmen a fresco de asininos para inseminar jumentas. Para tal, coletou-se o sêmen de dois jumentos da raça Baudet Du Poitou, diluindo-o em leite UHT à 35°C. As inseminações foram realizadas pré-ovulação, em dias alternados, a partir de um folículo com 33mm, até a ovulação, sendo o sêmen depositado no corpo do útero, com dose inseminante contendo 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides totais. Neste estudo, obteve-se uma taxa de gestação de 86,0% (6/7).

Assim como Palhares (1986) e Vidament *et al.* (2009), Dorado *et al.* (2013) utilizaram o sêmen asinino a fresco para inseminar 76 ciclos de 27 jumentas. As fêmeas foram inseminadas diariamente até a ovulação, a partir de um folículo pré ovulatório, com doses inseminantes de 800 x 10<sup>6</sup> espermatozoides totais, diluídos em diluidor de leite desnatado-glicose (Kenney *et al.*, 1975), em um volume total de 20mL. Neste estudo, obteve-se uma taxa de gestação de 44,73% (34/76).

Visando estudar a fertilidade do sêmen asinino resfriado, Ferreira (1993) utilizou 59 ciclos de fêmeas equinas, divididas em dois tratamentos, envolvendo a estocagem do sêmen por períodos de 24 ou 48 horas. As fêmeas foram inseminadas com sêmen diluído em diluidor lactose-gema de ovo sem glicerol (Nagase e Niwa, 1964), resfriado e armazenado em geladeira (4-6°C), sendo as inseminações realizadas no corpo do útero, a cada dois dias, até a ovulação, a partir da detecção de um folículo ovariano com 35mm de diâmetro em um dos ovários. A dose inseminante continha 250 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva, em um volume variável de  $18,34 \pm 2,75\text{mL}$  para o primeiro tratamento (24 horas) e de  $20,22 \pm 2,54\text{mL}$  para o segundo tratamento (48 horas). Foram realizadas, em média,  $1,27 \pm 0,45$  e  $1,38 \pm 0,49$  inseminações por ciclo, respectivamente, nos dois tratamentos, na mesma ordem anterior. As taxas de gestação para o sêmen estocado por 24 ou 48 horas foram de 80% (24/30) e 75,9% (22/29), respectivamente.

Em um trabalho realizado no México por Boeta e Quintero (2000), utilizou-se o sêmen de um jumento da raça Kentucky, para inseminar 28 éguas, clinicamente saudáveis. Após a coleta, o sêmen foi diluído em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose-bicarbonato de sódio-antibióticos (Kenney *et al.*, 1975) ou em diluidor à base de leite desnatado ultrapasteurizado (UHT). Em ambos os casos, o sêmen diluído foi armazenado à temperatura de 5°C por até 48 horas. Todas as fêmeas foram inseminadas na presença de um folículo com características pré-ovulatórias, sendo re-inseminadas se não ovulassem dentro de três dias após a primeira inseminação. As inseminações foram realizadas no corpo do útero, com doses inseminantes de 10mL contendo  $400 \times 10^6$  de espermatozoides, quando obteve-se taxas de gestação de 54,5% (6/11) e 76,5% (13/17), respectivamente, para o sêmen diluído no diluidor de leite em pó desnatado ou à base de leite UHT.

Rozas (2005) utilizou três tratamentos para avaliar a eficiência do sêmen asinino resfriado à 15°C, tendo como ponto final a fertilidade de jumentas. No primeiro tratamento, após a coleta, o sêmen foi diluído em leite desnatado (I); no segundo tratamento, o sêmen foi diluído em leite desnatado, centrifugado à 300g durante cinco minutos, sendo o “pellet” ressuspenso em leite desnatado (II). No terceiro tratamento, o sêmen foi diluído em diluidor INRA96 (III). As inseminações foram realizadas no corpo do útero, a cada 48 horas, até a ovulação, a partir da detecção de um folículo maior que 3cm de diâmetro, com doses inseminantes de  $1000 \times 10^6$  espermatozoides totais. As taxas de gestação obtidas, neste estudo, foram de 27% (23/85), 21% (6/28) e 66,66% (18/27), para os tratamentos I, II e III, respectivamente.

Em um amplo trabalho realizado no Brasil, envolvendo o sêmen resfriado de asininos, Rossi (2008) inseminou 195 ciclos de 141 éguas. As éguas foram inseminadas com sêmen diluído e resfriado de cinco reprodutores asininos, por até três vezes por semana, a partir de um folículo com 3,0-3,5cm de diâmetro, até a ovulação. O sêmen dos reprodutores foi diluído em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose (Kenney *et al.*, 1983) ou em diluidor à base de glicina-gema de ovo (Foote, 2002), com doses inseminantes de 20mL e  $400 \times 10^6$  espermatozoides moveis, previamente resfriados por 12 horas à 5°C, em contêiner especial, segundo Palhares (1997). Dos 93 ciclos inseminados com o sêmen diluído no diluidor à base de leite em pó desnatado, obteve-se uma taxa de gestação/ciclo de 52,69% (49/93), com média de 2,01 inseminações por ciclo. Quando utilizou-se o sêmen diluído em diluidor à base de glicina-gema de ovo, obteve-se uma taxa de gestação de 47,06% (48/102), com média de 1,97 inseminações por ciclo, não havendo diferenças ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos.

Vidament *et al.* (2009) utilizaram o sêmen resfriado de jumentos, submetido à diferentes tratamentos, para a inseminação de éguas e jumentas. Em um primeiro estudo, as fêmeas equinas (n=49) e asininas (n=13) foram inseminadas pré-ovulação, com doses inseminantes de  $400 \times 10^6$  espermatozoides totais, diluídos em leite UHT (volume total 10mL) e armazenados à 4°C, por até 8 horas, sendo o sêmen depositado no corpo do útero. As taxas de gestação por ciclo obtidas foram de 45% (33/73) e 45% (9/20), para as éguas e jumentas inseminadas, respectivamente. Em um segundo experimento, o sêmen de dois reprodutores asininos foi submetido à três tratamentos, a saber: a) diluído em leite UHT à 35°C, centrifugado, sendo o “pellet” ressuscitado em diluidor à base de leite UHT à 22°C e resfriado à 4°C (T1); b) sêmen diluído em diluidor de leite UHT-2% de gema de ovo à 35°C, centrifugado, sendo o “pellet” ressuscitado no mesmo diluidor e resfriado à 4°C (T2); e c) sêmen diluído em diluidor de leite UHT-2% de gema de ovo à 35°C, centrifugado, sendo o “pellet” ressuscitado em diluidor de leite UHT-2% de gema de ovo-glicerol e resfriado à 4°C (T3). As fêmeas asininas foram inseminadas pré-ovulação, sendo o sêmen depositado no corpo do útero, com dose inseminante de  $400 \times 10^6$  espermatozoides totais. As taxas de concepção obtidas para os tratamentos T1, T2 e T3 foram de 78% (7/9), 63% (5/8) e 0% (0/8), respectivamente. Observou-se, neste experimento, uma grande queda da fertilidade, quando utilizou-se 2,2% de glicerol no diluidor utilizado para o resfriamento do sêmen. Em um terceiro experimento, os autores analisaram a fertilidade de jumentas inseminadas com sêmen asinino refrigerado, preparado com diferentes crioprotetores ou isento dos mesmos. Para tal, utilizou-se o sêmen de três jumentos diluído em diluidores contendo leite UHT-2% de gema de ovo, centrifugado, sendo o “pellet” ressuscitado em diluidor contendo leite UHT-2% de gema de ovo + 0% de crioprotetor (T1) ou 1,9% de glicerol (T2) ou 2% de dimetilformamida (T3) ou 1,3% de etilenoglicol (T4). As fêmeas foram inseminadas a partir de um folículo de 35mm de diâmetro, diariamente até a ovulação, sendo o sêmen depositado no corpo do útero, com doses inseminantes contendo  $400 \times 10^6$  espermatozoides totais. As taxas de gestação por ciclo obtidas foram de 64% (7/11), 8% (1/12), 67% (8/12) e 45% (5/11), respectivamente, para os tratamentos T1, T2, T3 e T4.

Em um trabalho realizado por Carvalho (2011), utilizou-se o método de coleta fracionada do sêmen, sendo coletados apenas os três primeiros jatos do ejaculado de jumentos da raça Pêga. Em seguida, o sêmen foi diluído em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose (LPDG-Kenney *et al.*, 1983) ou à base de lactose-gema de ovo sem glicerol (LGO) (Nagase e Graham, 1964), modificado pela remoção do glicerol de sua formulação. Desta forma, de cada ejaculado foram preparadas doses inseminantes de 22mL, contendo  $400 \times 10^6$  espermatozoides móveis, diluídos nos diluidores LPDG ou LGO e submetidas ao resfriamento à 5°C, em contêiner proposto por Palhares (1997) e estocadas por um período de 12 a 24 horas. Quarenta e quatro ciclos de 44 éguas foram utilizados, sendo as éguas inseminadas por até três vezes por semana, a partir de um folículo de 3,0cm de diâmetro até a ovulação. A taxa de gestação obtida quando utilizou-se o sêmen diluído em LPDG, após uma média de  $1,57 \pm 0,20$  inseminações por ciclo, foi de 56,52% (13/23), superior ( $p < 0,05$ ) à obtida com o diluidor LGO, com  $1,43 \pm 0,21$  inseminações/ciclo, de 4,76% (1/21). Em relação ao diluidor LGO, sua associação à coleta fracionada inviabilizou a utilização deste protocolo para o resfriamento do sêmen asinino. Assim, pode ser que a presença de um alto percentual de gema de ovo no diluidor LGO (20%), tenha sido responsável por conferir uma maior estabilidade à membrana espermática que, associada a uma menor presença de proteínas do plasma seminal, decorrente da utilização da coleta fracionada, possa ter interferido no processo de capacitação espermática, com redução drástica da fertilidade das éguas inseminadas com este diluidor (LGO-4,76% - 1/21 éguas). Ainda neste estudo, avaliou-se o efeito da concentração espermática, por dose inseminante, sobre a taxa de gestação de éguas inseminadas com sêmen asinino diluído, resfriado e estocado

(Carvalho, 2011). Para tal, foram utilizados 79 ciclos de 59 éguas sem raça definida, e cinco reprodutores asininos. As éguas foram inseminadas até três vezes por semana, a partir de um folículo de 3,0cm de diâmetro, até a ovulação, com sêmen asinino diluído em diluidor de leite em pó desnatado - glicose (LPDG – Kenney *et al.*, 1983). Duas concentrações espermáticas foram utilizadas para a preparação das doses inseminantes, sendo que no tratamento 1, utilizou-se doses inseminantes de 22mL e  $400 \times 10^6$  espermatozoides móveis (n=41), e no tratamento 2, doses inseminantes de 22mL e  $800 \times 10^6$  espermatozoides móveis (n=38). O sêmen foi resfriado e estocado à 5°C, em contêiner proposto por Palhares (1997) por um período entre 12 e 24 horas. Neste estudo, obteve-se taxas de gestação de 41,46% (17/41) e 47,37% (18/38), respectivamente, para os tratamentos 1 e 2.

Tendo como ponto final as taxas de gestação de éguas inseminadas com sêmen resfriado de jumentos, Rocha (2012) utilizou dois diluidores à base de leite UHT desnatado-gema de ovo, com duas concentrações de glicose (1g ou 2g). Para tal, utilizou-se 171 ciclos de 122 éguas, as quais, foram inseminadas com sêmen diluído e resfriado de três reprodutores asininos da raça Pêga. As éguas foram inseminadas até três vezes por semana, a partir da detecção de um folículo de 3,0cm de diâmetro em um dos ovários, até a ovulação. Utilizou-se neste estudo, doses inseminantes de 20mL e  $400 \times 10^6$  espermatozoides móveis, sendo o sêmen resfriado à 5°C e estocado por um período de 12 a 18 horas, em contêiner proposto por Palhares (1997). As taxas de gestação totais, não diferiram ( $p>0,05$ ) entre os diluidores, sendo de 90,16% (55/61) para o diluidor contendo 1g de glicose e de 81,97% (55/61) para o diluidor contendo 2g de glicose, sem que houvesse diferenças entre eles. Neste experimento, observou-se que de 122 éguas inseminadas, 105 se tornaram gestantes.

Em um trabalho pioneiro, Krause e Grove (1967) congelaram o sêmen equino e o asinino, utilizando diluidores propostos por Nagase e Graham (1964). Após a coleta, o sêmen foi submetido à análises macro e microscópica, sendo, em seguida, diluído (10 a 15 minutos pós a coleta) adicionando-se 2,3 ou 5 partes dos diluidores glicose-gema de ovo-glicerol, lactose-gema de ovo-glicerol ou rafinose-gema de ovo-glicerol, respectivamente. Uma parte do sêmen foi envasado em “pellets”, imediatamente após a diluição, sendo as outras duas partes, submetidas ao mesmo procedimento, 2 e 3 horas após. Pequenas gotas do sêmen diluído (0,1mL) foram colocadas sobre gelo seco (-79°C), com o sêmen sendo resfriado por quatro minutos. Para o armazenamento, os “pellets” foram transferidos do gelo seco para o nitrogênio líquido (- 196°C) em contêiner próprio. Ao descongelamento dos “pellets”, o sêmen apresentou uma motilidade progressiva de 50-70%, que era de 70-80%, no sêmen a fresco. As inseminações foram realizadas utilizando-se o sêmen asinino e o equino, utilizando-se 100 pellets descongelados em 20 a 40mL de leite estéril à 40°C. As palpções ovarianas, através do reto, foram realizadas até o momento da inseminação, próxima da ovulação, sendo realizada de uma a quatro inseminações por ciclo. Apenas uma de duas (1/2 - 50%) éguas inseminadas com o sêmen asinino tornou-se gestante, enquanto duas de quatro (2/4 - 50%) éguas inseminadas com sêmen equino conceberam.

Na França, Trimeche *et al.* (1998) congelaram o sêmen de quatro asininos da raça Poitou, utilizando-o para inseminar fêmeas asininas. Após a coleta, filtrava-se o sêmen, e realizava-se a mensuração da concentração espermática. O sêmen foi diluído para uma concentração de  $60 \times 10^6$  espermatozoides/mL, utilizando-se para a diluição o diluidor T2-94, que continha glicose – rafinose – lactose - citrato de sódio -citrato de potássio - glicerol-gema de ovo de codorna – antibióticos -leite desnatado e água destilada. A seguir, o sêmen foi resfriado, a partir de 34°C, à uma taxa de 0,5 °C/minuto, até 4°C, em tubos de 30mL. Após o resfriamento, o sêmen foi

envasado em palhetas de 0,5mL, congeladas em vapor de nitrogênio por 10 minutos, sendo em seguida, mergulhadas em nitrogênio líquido (- 196°C), para o seu armazenamento. Para o descongelamento, as palhetas foram submersas em banho maria à 37°C por 30 segundos. A fertilidade do sêmen congelado foi avaliada através da inseminação de treze jumentas da raça Poitou, por até quatro ciclos, divididas em dois grupos, com ou sem desglicerolização do sêmen, após o descongelamento. As fêmeas foram inseminadas uma vez por dia, a partir da primeira exibição do estro, com um folículo  $\geq 30$ mm. O procedimento foi repetido por até quatro ciclos estrais. A dose inseminante continha  $600 \times 10^6$  espermatozoides (20 palhetas), com pelo menos, 35% de motilidade total pós descongelamento, em um volume de 10mL para as inseminações utilizando o sêmen sem remoção do glicerol. Quando da remoção do glicerol, as palhetas foram diluídas em 10mL do diluidor T2-94 sem glicerol compondo um volume inseminante de 20mL. Nenhuma das jumentas inseminadas com o sêmen, não submetido ao processo de desglicerolização, tornou-se gestante. Entretanto, quando o glicerol foi removido, obteve-se uma taxa de gestação de 62% (8/13). Neste estudo, observou-se que a diluição do sêmen asinino em T2-94, seguida pelo congelamento, descongelamento e remoção do glicerol pós-descongelamento, foi acompanhada por taxas de gestação comercialmente aceitáveis em jumentas.

Em um estudo conduzido por Rozas (2005), avaliou-se a fertilidade do sêmen asinino congelado da raça Zamorano-Leones, submetido a três protocolos de congelamento. No primeiro tratamento, o sêmen foi diluído na proporção 1:1 em glicose-EDTA, centrifugado a 300 g durante 5 minutos, e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em diluidor lactose-EDTA com 2,5% de dimetilformamida (DMF), a uma concentração de  $125 \times 10^6$  espermatozoides com motilidade progressiva por mL ( $500 \times 10^6$  espermatozoides com motilidade progressiva por dose). As doses foram envasadas em palhetas de 0,5mL, refrigeradas até 4°C e congeladas sobre o vapor de nitrogênio durante 20 minutos, sendo em seguida, submersas em nitrogênio líquido (T1). No segundo tratamento (T2), o sêmen foi diluído na proporção 1:1 em glicose-EDTA, ao qual adicionou-se ciclodextrina a uma concentração de 2 mg para cada  $120 \times 10^6$  células, incubadas durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o sêmen foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o “pellet” ressuspensado em lactose-EDTA ao qual adicionou-se 2,5% de glicerol, a uma concentração de  $125 \times 10^6$  espermatozoides com motilidade progressiva por mL ( $500 \times 10^6$  espermatozoides com motilidade progressiva por dose) e processado como no tratamento 1. No terceiro e último tratamento (T3), as doses foram congeladas em diluidor contendo ciclodextrina e 2,5% de DMF. Este tratamento foi similar ao de numero 2, descrito anteriormente, havendo apenas mudança do tipo de crioprotetor utilizado, neste caso, a DMF (2,5%). Foram utilizadas dez jumentas para a inseminação. Quando as fêmeas apresentavam um folículo de no mínimo 3,5cm, induzia-se a ovulação com 5000 UI da hCG por via intravenosa, sendo a inseminação realizada 24 horas após a indução e repetida a cada 12 horas, caso a fêmea não ovulasse. Neste estudo, obteve-se taxas de gestação de 0% (0/8), 0% (0/4) e 11% (1/9), respectivamente, para os tratamento T1, T2 e T3.

Em um trabalho realizado por Oliveira (2005), visando avaliar a fertilidade de fêmeas asininas e equinas inseminadas com sêmen asinino congelado, utilizou-se 51 fêmeas asininas e 10 éguas da raça Brasileiro de Hipismo. Para o congelamento do sêmen asinino utilizou-se seis relações percentuais de crioprotetores, em um mesmo diluidor (MP50), a saber: 1) 2% dimetil sulfóxido + 2% dimetil formamida; 2) 3% dimetil formamida; 3) 2% dimetil acetamida + 2% glicerol; 4) 3% de dimetil acetamida; 5) 3% glicerol + 2% dimetil formamida; 6) 3% dimetil sulfóxido + 2% glicerol, sendo o sêmen congelado em palhetas de 0,5mL. Para realização da inseminação

artificial, as jumentas foram rufiadas diariamente e, a partir da detecção do cio, examinadas através da palpação transretal e de ultra-som. Na presença de um folículo com 35mm de diâmetro, as fêmeas recebiam 2500 UI de hCG por via endovenosa, sendo inseminadas 36 horas após a aplicação da hCG e dentro de 6 horas após a ovulação. Para as inseminações artificiais descongelou-se 8 palhetas de 0,5mL de sêmen do tratamento escolhido, mergulhando-as em água aquecida à 46°C, por 20 segundos. Assim, a dose inseminante continha  $800 \times 10^6$  espermatozoides móveis em 4mL, sendo depositada no corpo do útero. Das 53 jumentas inseminadas neste estudo, 0% (0/53) tornou-se gestante. Diante desses resultados, desenvolveu-se outros estudos. Em um primeiro estudo, comparou-se doses inseminantes com diferentes concentrações espermáticas, de 800 ou  $1600 \times 10^6$  espermatozoides totais, congelados em diluidor contendo 3% de glicerol + 2% de dimetilformamida. Neste estudo, utilizou-se 18 jumentas submetidas aos procedimentos de rufiação, exames ginecológicos e aplicação da hCG, similarmente à metodologia descrita anteriormente. Após a aplicação do indutor da ovulação, as fêmeas foram monitorados a cada 6 horas, até a detecção da ovulação. Neste momento, foram inseminadas com o conteúdo de 8 palhetas ( $800 \times 10^6$  espermatozoides - T1) no corpo uterino ou 16 palhetas ( $1600 \times 10^6$  espermatozoides - T2) no corno ipsilateral à ovulação. As taxas de gestação obtidas foram de 0% (0/10) e 0% (0/10), para os T1 e T2, respectivamente. Em um segundo estudo, as inseminações foram realizadas pós-ovulação com doses inseminantes contendo  $800 \times 10^6$  espermatozoides diluídos em diluidor contendo 3% glicerol + 2% dimetil formamida, sendo o sêmen submetido à desglicerolização pós-descongelamento e as fêmeas inseminadas após a detecção da ovulação. Neste estudo, as dez fêmeas asininas utilizadas foram manejadas como descrito no estudo anterior. Quando do descongelamento, as palhetas eram mergulhadas em água aquecida a 46°C, por 20 segundos. A seguir, o conteúdo de 8 palhetas era colocado em um tubo à 37°C, ao qual acrescentava-se, lentamente 4mL do diluidor de Kenney *et al.* (1975), também pré-aquecido, quando alcançava-se um volume inseminante de 8mL. O sêmen foi depositado no ápice do corno, ipsilateral à ovulação, após a sua ocorrência. Com este procedimento, obteve-se uma taxa de gestação de 0% (0/10). Finalmente, inseminou-se dez éguas pós-ovulação com uma dose inseminante de  $800 \times 10^6$  espermatozoides, congelados em diluidor contendo 3% glicerol + 2% dimetil formamida, sendo o sêmen depositado no corpo do útero. Os animais foram rufiados em dias alternados e, após a detecção de cio, avaliados ginecológicamente através da palpação retal e ultra-sonografia diariamente. Os folículos foram monitorados e quando de um folículo com 35mm de diâmetro, as fêmeas receberam 2500 UI de hCG endovenosa, sendo em seguida, examinadas a cada 6 horas, até a ovulação. O sêmen foi descongelado à 46°C por 20 segundos, com o conteúdo de 8 palhetas sendo transferido para uma seringa de vidro esterilizada e pré-aquecida. Diferentemente dos outros resultados, neste caso, quando inseminou-se éguas, obteve-se uma taxa de gestação de 40% (4/10).

Ao avaliar a fertilidade do sêmen congelado de jumentos da raça Zamorano-Leonés, utilizado para a inseminação de jumentas da mesma raça, Castejón (2005) realizou uma única inseminação no corpo do útero, 24 horas após a indução da ovulação, pela administração de 5.000 UI da hCG. Neste estudo, o sêmen coletado foi diluído em diluidor HBS (glicose – citrato de sódio – lactose – rafinose – citrato de potássio – hepes – água destilada), sendo, a seguir, centrifugado a 300g por 5 minutos. Em seguida, o “pellet” foi ressuscitado em diluidor contendo lactose-EDTA-2,5% glicerol, envasado em palhetas de 0,5mL e congelado. As palhetas foram descongeladas à 37°C durante um minuto, quando dividiu-se o sêmen em duas partes, sendo a primeira rediluída e a segunda parte, submetida à eliminação do glicerol. As fêmeas foram inseminadas com doses contendo  $500 \times 10^6$  espermatozoides móveis. De 18 ciclos reprodutivos de seis jumentas submetidas à inseminações, obteve-se uma gestação no tratamento associado à remoção do glicerol (0% - 0/9 e 11,11% - 1/9, respectivamente).

Em um trabalho realizado no Brasil, Canisso (2008) estudou a fertilidade do sêmen congelado de três jumentos da raça Pêga, tendo como ponto final a taxa de gestação de fêmeas equinas. Neste estudo, o sêmen foi filtrado após a coleta, diluído na proporção 1:1 e dividido em tubos de 15mL, sendo, em seguida, centrifugado a 600 g por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuscitado em dois diluidores de congelamento de sêmen, a saber: 1- diluidor de glicose-lactose-gema de ovo-EDTA (Martin *et al.*, 1979) – T1 e diluidor de lactose- gema de ovo-glicerol (Nagase e Niwa, 1964 - modificado) – T2. Em seguida, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL, a uma concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. As palhetas foram resfriadas à 5°C e colocadas, na posição horizontal, sobre uma raque, à 4cm acima do nível de nitrogênio líquido, por 15 minutos, para o congelamento. Após esse período, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão de sêmen. Antes das inseminações, o semen foi descongelado à 37°C durante 30 segundos. Neste experimento, inseminou-se 50 éguas (60 ciclos), submetidas à rufiação e controle folicular através da palpação transretal e exames ultra-sonográficos, à intervalos de 48 a 72 horas, até a presença de um ou mais folículos de 25mm de diâmetro, quando o intervalo entre exames foi reduzido para 24 horas. Na presença de um folículo de 35mm em um dos ovários, realizou-se o controle do desenvolvimento folicular de seis em seis horas, até a detecção da ovulação. Detectada a ovulação, a égua era inseminada até seis horas pós-ovulação. De acordo com cada partida de sêmen um número mínimo de palhetas foi descongelado, capaz de fornecer uma dose inseminante padrão, com 300 milhões de espermatozoides com movimento progressivo e vigor espermático 3, para ambos os tratamentos. A deposição do sêmen foi intra-cornual profunda, ipsilateral à ovulação, sendo realizada uma única inseminação artificial a cada ciclo. Os ciclos das éguas foram divididos igualmente entre os diluidores e reprodutores, ou seja, 20 ciclos foram inseminados com o semen do mesmo reprodutor, sendo dez ciclos para cada diluidor. As taxas de gestação obtidas neste experimento, aos 13 dias, foram de 50% (15/30) para o diluidor 1 e de 53,33% (16/30) para o diluidor 2. Aos 25 dias de gestação, obteve-se taxas de gestação de 46,66% (14/30) e 43,33% (13/30), para os tratamentos T1 e T2, que foram drasticamente reduzidas, aos 35 dias, para 10% (3/30) e 16,6% (5/30), respectivamente, na mesma ordem anterior.

Em 2009, Vidament *et al.* avaliaram diferentes protocolos de congelamento do sêmen asinino utilizando, para tal, o sêmen de seis jumentos da raça Baudet du Poitou. Após a coleta, o sêmen foi diluído rapidamente no diluidor E1 (INRA 82 = leite UHT + açúcares e sais + 2% de gema de ovo). A seguir, foi resfriado à 22°C por 10 minutos, centrifugado à 600 x g por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo o “pellet” ressuscitado em diluidor E2 (E1+ 2,2% glicerol), à uma concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O sêmen foi resfriado à 4°C por 1 hora e 15 minutos, após o que foi envasado em palhetas de 0,5mL, congeladas a 60°C/minuto até – 140°C, antes de serem mergulhadas em nitrogênio líquido. Foram utilizados 50 ciclos de éguas pôneis e 38 ciclos de jumentas inseminadas com doses inseminantes de  $800 \times 10^6$  espermatozoides totais, em um volume de 8mL (16 palhetas) por inseminação, antes da ovulação, quando realizou-se, normalmente, duas inseminações, 48 e 24 horas antes da ovulação. As taxas de gestação obtidas foram de 36% (18/50) e 11% (4/38), para as éguas pônei e jumentas inseminadas, respectivamente. Neste mesmo estudo, procurou-se alternativas para melhorar a fertilidade de jumentas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos, através da remoção ou diluição do glicerol pós-descongelamento. Assim, o sêmen de cinco jumentos foi congelado em diluidor E2 contendo glicerol. Para as inseminações, descongelou-se oito palhetas ( $400 \times 10^6$  espermatozoides), em um tubo, ao qual acrescentou-se 10mL de leite perfazendo uma dose inseminante de 14mL. Neste estudo, foram inseminadas 11 jumentas por um ou dois ciclos estrais, quando obteve-se uma taxa de gestação de 0% (0/15). Em um outro estudo,

congelou-se o sêmen de dois jumentos em E2, contendo glicerol. Após o descongelamento, o sêmen foi utilizado para as inseminações seguindo dois protocolos, a saber: T1 - o grupo controle não foi submetido a qualquer tratamento. No segundo protocolo (T2), dividiu-se o sêmen descongelado em dois tubos de centrifuga aos quais acrescentou-se 11mL de leite, pré centrifugação. Após a sua realização, descartou-se o sobrenadante, sendo o “pellet” ressuspensionado com 1mL de leite. O conteúdo de ambos os tubos foi utilizado como uma dose inseminante (4mL), com uma concentração de  $400 \times 10^6$  espermatozoides para inseminar 6 jumentas, por dois ou três ciclos estrais. O sêmen foi depositado no corpo do útero, por até 24 horas antes da ovulação. Para as fêmeas do grupo controle (T1) obteve-se uma taxa de gestação de 0% (0/8). Mesmo quando o sêmen foi centrifugado para a retirada do glicerol (T2), a taxa de gestação obtida foi de 13% (1/13). Finalmente, como mais uma alternativa visando melhorar a fertilidade das jumentas, procurou-se mudar o crioprotetor do diluidor, quando retirou-se o glicerol, substituindo-o pela dimetilformamida. Para este estudo, utilizou-se o sêmen de dois jumentos, sendo cada ejaculado dividido em duas partes, congeladas com 2,1% de glicerol ou 2,2% de dimetilformamida (DMF), respectivamente. As jumentas foram inseminadas com doses inseminantes de  $400 \times 10^6$  espermatozoides depositados no corpo do útero por até 24 horas antes da ovulação, quando obteve-se taxas de gestação de 0% (0/16) e 11% (3/28), respectivamente, para os diluidores com glicerol ou DMF, em sua formulação.

Em um trabalho realizado por Gama Ker (2009), coletou-se o sêmen de um jumento da raça Pêga, diluindo-o na proporção 1:1 em diluidor de mínima contaminação (Kenney *et al.*, 1975), antes da centrifugação à 650 x g por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o “pellet” ressuspensionado em diluidor contendo lactose-EDTA-gema de ovo, proposto por Martin *et al.* (1979). O sêmen foi envasado em palhetas de polietileno de 0,5, à uma concentração total de 200 milhões de espermatozoides por mL. O resfriamento foi realizado segundo um protocolo proposto por Furst *et al.* (2005). Inicialmente, as palhetas eram colocadas em um tubo de ensaio com capacidade de 20mL, à temperatura ambiente. A seguir, o tubo de ensaio foi revestido por um saco plástico e inserido dentro de um recipiente de plástico, contendo 120mL de álcool absoluto. O recipiente foi colocado na posição horizontal dentro de uma geladeira de 280 litros, com temperatura interna de 4-5°C, de forma a produzir uma taxa média de resfriamento de -0,5°C por minuto, em um tempo de resfriamento de 35 minutos. O sêmen foi mantido, nesta temperatura, de 4-5°C por mais 25 minutos. Para o congelamento, utilizou-se uma caixa de isopor com 40cm de comprimento x 32cm de altura x 20cm de largura, na qual colocou-se as palhetas, na posição vertical, sobre um suporte de aço inoxidável, suspenso por isopor, a 4cm acima do nível de nitrogênio líquido. O tempo de congelamento foi de 15 minutos, em vapor de nitrogênio líquido. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio e armazenadas em botijão tradicional. Antes das inseminações, realizou-se o descongelamento do sêmen em banho-maria à 37°C, que aí permaneceu até o momento da inseminação. Neste estudo, utilizou-se 42 éguas (48 ciclos), submetidas a dois tratamentos. Assim, após a detecção de um folículo de 35-40mm, as éguas foram distribuídas em dois grupos, a saber: G1 (n=25): controle folicular realizado a intervalos de 6 em 6 horas, sendo a inseminação realizada após a ovulação; G2 (n=23): aplicação de 2000UI de hCG por via intramuscular e controle folicular a intervalos de 12 em 12 horas, sendo as inseminações realizadas 24 horas após a aplicação da hCG e repetidas 24 horas depois, na ausência de uma ovulação detectada dentro de 48 horas após a aplicação da hCG. Nos dois tratamentos, realizou-se as inseminações no ápice do corno uterino, ipsilateral à ovulação ou do folículo pré-ovulatório, com doses inseminantes contendo 300 milhões de espermatozoides viáveis. O cálculo do número de palhetas utilizadas foi feito em função da motilidade progressiva das partidas de sêmen utilizadas, avaliadas previamente, na fase de congelamento do sêmen. As taxas de gestação, aos 13 dias pós-inseminação, foram de 40%

(10/25), para as inseminações realizadas pós-ovulação (G1) e de 26% (6/23), para as inseminações realizadas pré-ovulação (G2), não sendo encontradas diferenças ( $p>0,05$ ), quanto às taxas de gestação, entre os grupos.

Ao realizarem inseminações artificiais em 28 éguas, com sêmen congelado de jumento, Jepsen *et al.* (2010), utilizaram duas inseminações por ciclo (6 horas pré e 6 horas pós-ovulação), sendo o sêmen depositado no corpo do útero. Neste estudo, utilizou-se uma dose inseminante de  $300 \times 10^6$  de espermatozoides móveis. Para o congelamento do sêmen, utilizou-se o diluidor EZ Mixin® + 20% gema de ovo + 2% etilenoglicol, quando relatou-se uma taxa de concepção de 6,25% (1/15). Entretanto, quando reduziu-se o percentual de gema de ovo, no mesmo diluidor (EZ Mixin® + 5% gema de ovo + 2% etilenoglicol), obteve-se uma taxa de concepção de 46,5% (20/43). Além disso, ao utilizarem o diluidor EZ Mixin® + 20% gema de ovo + 2% etilenoglicol + 60mM  $\beta$ -ciclodextrina obteve-se uma taxa de gestação de 58,3 % (14/24). Neste estudo, as inseminações foram realizadas ao longo de cinco estações reprodutivas, sendo o envasamento do sêmen realizado em palhetas de 0,5mL.

Em um trabalho realizado por Sales (2011) utilizou-se como método de coleta do sêmen asinino, a coleta fracionada, sendo coletadas apenas os três primeiros jatos (fração rica). Neste estudo, diluiu-se o semen, sem centrifugação, com um diluidor à base de lactose e gema de ovo (Nagase e Niwa, 1964), sem glicerol, na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor). A seguir, 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  $200 \times 10^6$  espermatozoides móveis/mL utilizando-se, inicialmente o diluidor D1, sem glicerol. O recipiente com o sêmen diluído era colocado em um béquer de vidro contendo 250mL (T1) ou 500mL (T2) de água a 37°C, sendo então levado para um balcão refrigerador horizontal regulado para uma temperatura de 5°C, até que atingisse uma temperatura de 6°C. Ao atingir a temperatura, o sêmen foi rediluído com diluidor D2, contendo glicerol, a uma taxa de diluição 1:1 (D1 : D2) e envasado em flatpacks com capacidade de 5mL ou em palhetas de 0,5mL. Os dois tipos de envasamento do sêmen foram colocados entre duas bandejas com tela metálica, visando-se a manutenção, principalmente, da forma achatada do flatpack. Para o congelamento, utilizou-se uma caixa de isopor com 30,5cm de largura, 39,5cm de comprimento e 34cm de altura, na qual colocava-se uma lâmina de quatro centímetros de altura de nitrogênio líquido, sendo as bandejas posicionadas à três centímetros acima da superfície do nitrogênio, por um período de 15 minutos, para a realização do pré congelamento. À seguir, eram mergulhadas diretamente no nitrogênio. Terminado o congelamento, os flatpacks e as palhetas eram transferidos para um botijão contendo nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenadas por no mínimo 60 dias, antes do descongelamento. Para o descongelamento, colocou-se os flatpacks em uma proveta, com capacidade para 250mL, contendo água à temperatura de 50°C por 13 segundos, após o que eram mantidas, em banho-maria à 37°C por no mínimo 20 segundos. As palhetas foram descongeladas à 37°C por 30 segundos, mas não foram utilizadas para a inseminação das éguas. Neste experimento, utilizou-se 16 éguas mestiças submetidas a controle folicular diário até a detecção em um dos ovários de um folículo com 3,4cm de diâmetro e presença de edema uterino intramural, quando a égua recebia 1.666 UI da hCG por via endovenosa, às 13:00 horas daquele dia, a fim de se induzir a ovulação. Após 24 horas da aplicação da hCG, a égua era submetida à nova palpação transretal. No caso da ovulação ser detectada, inseminava-se a égua, imediatamente, de acordo com o tratamento a qual pertencia. Neste caso, a fêmea recebia apenas uma inseminação, pós-ovulação. Não ocorrendo a ovulação naquele momento, a égua era submetida à palpação transretal e ultrassonografia às 19:00 horas do segundo dia, 30 horas após a aplicação da hCG,

seguida da primeira inseminação artificial, pré programada, de acordo com o tratamento ao qual pertencia, independentemente de estar a égua ovulada ou não. Caso estivesse ovulada, naquele momento, receberia apenas uma inseminação pós-ovulação, às 30 horas após a aplicação da hCG. Na ausência de uma ovulação naquele momento (30 horas), a fêmea voltaria a ser submetida a um controle folicular, às 07:00 horas da manhã do dia seguinte, ou seja, do terceiro dia após a aplicação da hCG e, inseminada pela segunda e última vez, às 42 horas após indução da ovulação. Neste experimento, utilizou-se 16 éguas mestiças, divididas em dois tratamentos, a saber: T1 - éguas (n=7) inseminadas às 24 horas, pós-ovulação ou às 30 e/ou 42 horas após a indução da ovulação com o uso da hCG, na presença de um folículo com  $3,76 \pm 0,21$  cm em um dos ovários, sendo o sêmen depositado no corpo do útero. A dose inseminante utilizada correspondeu ao volume de dois flatpacks, ou seja, 10mL de sêmen, envolvendo uma concentração de  $2 \times 10^9$  de espermatozoides totais móveis, pré congelamento, com no mínimo  $600 \times 10^6$  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 03 (0 - 5); T2 - éguas (n=11) inseminadas às 24 horas, pós-ovulação ou às 30 e/ou 42 horas após a indução da ovulação com hCG, na presença de um folículo com  $3,61 \pm 0,05$  cm em um dos ovários, sendo o sêmen depositado no ápice do corno uterino, ipsilateral ao ovário que continha o folículo dominante ou ovulado recentemente. Neste tratamento, utilizou-se apenas um flatpack por inseminação, correspondendo a uma dose inseminante de 05mL, contendo  $1 \times 10^9$  espermatozoides móveis totais pré-congelamento, com no mínimo  $300 \times 10^6$  espermatozoides móveis pós-descongelamento, em virtude de terem sido utilizadas apenas doses inseminantes com motilidade e vigor espermáticos superiores a 30% e 03, respectivamente. Assim, a primeira inseminação foi realizada em média, às  $30,17 \pm 0,13$  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 ocorrência da ovulação. As taxas de gestação, obtidas neste estudo, foram de 0% para os dois tratamentos. Acredita-se que a alta concentração de gema de ovo, aditivamente ao sêmen coletado de forma fracionada, tenha sido responsáveis pela infertilidade dessas fêmeas, provavelmente, por um estado de decapacitação espermática advinda dos procedimentos.

Legha *et al.* (2012) coletaram o sêmen de quatro jumentos da raça Poitou. Após a coleta, o sêmen foi diluído na proporção 1:1 em diluidor contendo citrato-EDTA à 37°C, sendo centrifugado à 2000 rpm por 5 minutos a 8-10°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspenso em diluidor de lactose-glicose-EDTA-gema de ovo (Martin *et al.*, 1979), à uma concentração de  $500 \times 10^6$  espermatozoides móveis por mL. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL, mantidas por 2 horas à 5-8°C e, em seguida, colocadas em congelador bio-programável. O protocolo de inseminação incluía a utilização de uma ou duas inseminações, sendo a segunda inseminação realizada após 24 horas da primeira, somente quando a égua não havia ainda ovulado. Neste experimento, utilizou-se 8 palhetas por dose inseminante com no mínimo  $300 \times 10^6$  espermatozoides móveis, sendo o sêmen depositado no corpo do útero. A taxa de gestação média, obtida neste estudo, foi de 43,5% (67/154 éguas).

Em um estudo conduzido por Rota *et al.* (2012), avaliou-se a fertilidade de jumentas inseminadas com sêmen asinino congelado em diferentes diluidores e rediluído ou não, após o descongelamento. Para este estudo, foram utilizados 39 ciclos de jumentas e sêmen de jumentos da raça Amiata. Os diluidores de congelamento foram preparados a partir de 200mL do diluidor

INRA96, dos quais retirou-se 8mL. Aos 8mL do diluidor acrescentou-se 10mL de gema de ovo, submetidos à centrifugação à 600 x g durante 10 minutos. Após a centrifugação, retirou-se 16mL do sobrenadante, sendo este volume acrescentado à 184mL do diluidor INRA96. À seguir esse diluidor foi dividido em duas partes de 100mL, a saber: parte 1- dos 100mL retirou-se 4,4mL e acrescentou-se 4,4mL de glicerol (E2-GLY); parte 2- dos outros 100mL, retirou-se 2,8mL e acrescentou-se 2,8mL de etileno-glicol (E2-EG). Após a coleta, o sêmen foi filtrado para remoção do gel e diluído em diluidor INRA96, colocado em tubo plástico de 50mL e armazenado em banho-maria à 24°C durante 10 minutos, sendo, à seguir, centrifugado a 600 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, sendo o “pellet” ressuscitado em INRA96 para que atingisse uma concentração espermática de  $336 \times 10^6$  espermatozoides/mL. No primeiro experimento, o sêmen diluído foi dividido em duas alíquotas e resfriado à 4°C durante 45 minutos. Cada alíquota foi então rediluída na proporção 1:1 em E2-GLY ou em E2-EG, de modo que a concentração final fosse  $168 \times 10^6$  espermatozoides/mL, diluídos em INRA96 + 2% de gema de ovo + 2,2% de glicerol ou 1,4% de etileno-glicol. No experimento 2, o sêmen foi diluído em E2-GLY, mantido à 4°C durante 15 minutos e acondicionado em palhetas de 0,5mL, antes do congelamento em congelador programável. Para a obtenção do plasma seminal, centrifugou-se o sêmen a 1000 x g durante 10 minutos; em seguida, o sobrenadante foi filtrado e armazenado à -18°C até a sua utilização. Na primeira fase in vivo do experimento, foram utilizados 24 ciclos de 10 jumentas, sendo oito estros para cada diluidor, a saber: T1- sêmen criopreservado em diluidor contendo GLY e rediluído pós-descongelamento em INRA96 (GLY-INRA); T2- sêmen criopreservado em diluidor contendo EG e rediluído pós-descongelamento em INRA96 (EG-INRA) e T3- sêmen criopreservado em diluidor contendo GLY e rediluído pós-descongelamento em plasma seminal. Na segunda fase, in vivo, utilizou-se 15 ciclos de jumentas, sendo o sêmen congelado da mesma forma que na primeira fase. Porém, após o descongelamento, o sêmen não foi rediluído (T4) ou rediluído em INRA96 (GLY-INRA) – T5 ou em plasma seminal (GLY-SPL) - T6. Neste estudo, as fêmeas foram induzidas com 2000UI da hCG ou acetato de buserelina, na presença de um folículo dominante de 32mm, em um dos ovários. As inseminações foram realizadas após 16 ou 18 horas da indução com hCG ou GnRH, respectivamente. Se após 22 ou 24 horas não tivessem ovulado, foi realizada uma segunda inseminação. Cada dose inseminante continha  $500 \times 10^6$  espermatozoides móveis, sendo o sêmen depositado no corpo do útero. Quando as fêmeas foram inseminadas com sêmen diluído em diluidor INRA96+2% gema de ovo + glicerol, rediluído em plasma seminal após o descongelamento, a taxa de gestação obtida foi de 61,54% (8/13). Entretanto, quando utilizou-se o INRA96+2% de gema de ovo + glicerol, rediluído em INRA96 após o descongelamento, a taxa de gestação foi de 23,1% (3/13). A substituição do glicerol pelo etileno-glicol no diluidor INRA96 + 2% de gema de ovo + etilenoglicol, rediluído em INRA96 após o descongelamento, resultou em uma taxa de gestação de 25% (2/8). Finalmente obteve-se uma taxa de gestação de 20% (1/5) quando utilizou-se o diluidor INRA96 + 2% de gema de ovo + glicerol. Acredita-se que o plasma seminal tenha melhorado a fertilidade do sêmen congelado de asininos, quando utilizado para inseminar jumentas, por interferir positivamente no controle da reação inflamatória do útero dessas fêmeas.

Serres *et al.* (2014) diluíram o sêmen asinino em diluidor contendo lactose-EDTA-dimetilformamida e inseminaram 15 ciclos de 5 jumentas. O sêmen foi processado de três formas, a) grupo controle - sêmen diluído e não processado; b) sêmen diluído e centrifugado e c) sêmen diluído e filtrado em membrana sintética. Após os tratamentos b e c, o sêmen foi ressuscitado em diluidor INRA96. As inseminações foram realizadas 30 horas após a aplicação da hCG, utilizando-se uma dose inseminante de  $1000 \times 10^6$  depositada no ápice do

cornu uterino. Os resultados de fertilidade obtidos foram de 40% (2/5), 80% (4/5) e 80% (4/5), respectivamente, para os tratamentos a, b e c.

As tabelas 3.1 e 3.2 apresentam uma síntese das taxas de gestação de éguas e jumentas inseminadas com sêmen congelado de asininos, obtidas em diferentes trabalhos realizados no mundo.

Tabela 3.1 Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen asinino congelado

Autores	Tipo de coleta	Diluidor	Forma de envase	Local da IA	Dose inseminante	Momento da IA	Nº de IAs	Fertilidade (total)
Krause e Grove (1967)	Total/centrifugado	Glicose-gema-glicerol, lactose-gema-glicerol e rafinose-gema-glicerol	Pellets	-	100 pellets	Pré	1 a 4	50% (1/2)
Oliveira (2005)	Total/Centrifugado	MP 50 + 3% Glicerol + 2% DMF	Palheta 0,5	Corpo do útero	800 x 10 <sup>6</sup>	Pós	1	40% (4/10 – éguas)
Canisso (2008)	Total/Centrifugado	Lactose- Gema de Ovo Glicerol (Nagase e Niwa, 1964)	Palheta 0,5	Intracornual profunda	300 x 10 <sup>6</sup> (motilidade progressiva)	Pós	1	50,00% (aos 13 dias) e 10% (aos 35 dias)
		Lactose – Gema - EDTA(Martin et al., 1979)						53,33% (aos 13 dias) e 16,6% (aos 35 dias)
Vidament et al. (2009)	Total/Centrifugado	INRA 82 + 2% Gema + 2,2% Glicerol	Palheta 0,5	Corpo do útero	800 x 10 <sup>6</sup>	Até 24hs pré	-	36% (18/50 - éguas)
Gama Ker (2009)		Lactose+gema de ovo+EDTA	Palheta 0,5	Ápice do corno uterino	300 x 10 <sup>6</sup> (motilidade progressiva)	Pré	1 a 2	26% (6/23)
Jepsen et al. (2010)	Total/Centrifugado	EZ Mixin +20% Gema de Ovo + 4% Glicerol	Palheta 0,5	Corpo do útero	300 x 10 <sup>6</sup>	Pós	1	40% (10/25)
						Pré e Pós (6 horas pré e 6 horas pós)	2	0% (número de éguas não informado)
								6,3% (1/15)
								46,5% (20/43)
		EZ Mixin+20% Gema de ovo+2% Etilenoglicol						58,3 (14/24)
		EZ Mixin+5% Gema de ovo+2% Etilenoglicol						
		EZ Mixin+20% Gema de ovo+2% Etilenoglicol + 60mM β-ciclodextrina						
Sales (2011)	Coleta fracionada (3 primeiros jatos)	Lactose-20% de gema de ovo-glicerol	FlatPack	Corpo do útero	2x10 <sup>9</sup> sptz totais (2 FlatPacks)	Inseminações às 30 e 42 horas após a indução da ovulação	2	0,0% (0/7)
				Ápice do	1x10 <sup>9</sup> sptz			0,0% (0/11)

				corno uterino	totais (1 FlatPack)			
Legha et al. (2012)	Total/cen trifugado	Lactose+glicose+ EDTA+20% gema de ovo+3% glicerol	Palheta 0,5	Corpo do útero	620x10 <sup>6</sup> (mínimo)	Pré	1 IA	38,27 %(31/81)
							2 IA	49,32% (36/73)
							Média	43,5 (67/154)
Costa (2015)	Total/ Centrifuga do	Leite em pó+gema de ovo+etilenoglicol (Jepsen, 2010)	Palheta 0,5	Corpo do útero	Mínimo de 300 x 10 <sup>6</sup> (motilidade progressiva)	Pós	1	23,81% (5/21)
		Leite em pó+lactose+glicose+ EDTA+citrato+etile noglicol+gema de ovo					55,56% (10/18)	

Tabela 3.2: Fertilidade de jumentas inseminadas com sêmen congelado de asininos

Autores	Tipo de coleta	Diluidor	Forma de envase	Local da IA	Dose inseminante	Momento da IA	Nº de IAs	Fertilidade e (total)
Trimeche et al. (1998)	Total/ Centrifugado	T2 - 94 (sem desglicerolização)	Palheta 0,5	-	600 x 10 <sup>6</sup>	Pré	-	0% (0/17 - jumentas)
		T2 - 94 (com desglicerolização)						62% (8/13 - Jumentas)
Rozas (2005)	Total/ Centrifugado	Glicose - EDTA + 2,5% DMF	Palheta 0,5	Corpo útero	500 x 10 <sup>6</sup>	Até 12hs pré	-	0% (0/8 - jumentas)
		Glicose - EDTA + 2,5% Glicerol + CLC						0% (0/7 - jumentas)
		Glicose - EDTA + 2,5% DMF + CLC						11% (1/9 - jumentas)
Oliveira (2005)	Total/ Centrifugado	MP 50 + 2%DMSO + 2% DMF	Palheta 0,5	Corpo do útero	800 x 10 <sup>6</sup>	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					Pós	0% (0/10 - jumentas)
		MP 50 + 3% Glicerol + 2% DMF		Intracornual profunda		1600 x 10 <sup>6</sup>	Pós	
MP 50 + 3% Glicerol + 2% DMF (Desglicerolização)		Intracornual profunda		800 x 10 <sup>6</sup>	Pós		0% (0/10 - jumentas)	
Castejón (2005)	Total/ Centrifugado	Lactose-Gema-EDTA (Martin et al., 1979)+ 2,5% Glicerol - Rediluição	Palheta 0,5	Corpo do útero	500 x 10 <sup>6</sup>	Pré	1	0% (0/9 - jumentas)
		Lactose-Gema-EDTA (Martin et al., 1979)+2,5% Glicerol -						11,11% (1/9 - jumentas)

Eliminação do glicerol								
Vidament et al. (2005, 2009)	Total/ Centrifugado	INRA 82 + 2% Gema + 2,2% Glicerol	Palheta 0,5	Corpo do útero	800 x 10 <sup>6</sup>	Até 24hs pré	-	11% (4/38 - jumentas)
		INRA 82 + 2% Gema + 2,2% Glicerol (+ Diluição pós- descongelamento)			400 x 10 <sup>6</sup>			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)
Rota et al. (2012)	Total/ Centrifugado	INRA96 + 2% gema de ovo + glicerol (rediluição em plasma seminal após descongelamento)	Palheta 0,5	Corpo do útero	500 x 10 <sup>6</sup>	Insemina ções às 16 e 36h após a indução com hCG, ou 18 e 38h após a indução com GnRH	2	61,54% (8/13)
		INRA96 + 2% gema de ovo + glicerol (rediluição em INRA96 após descongelamento)						23,08% (3/13)
		INRA96 + 2% gema de ovo + etilenoglicol (rediluição em INRA96 após descongelamento)						25% (2/8)
		INRA96 + 2% gema de ovo + glicerol						20% (1/5)

## 3.2. Fatores inerentes às fêmeas equinas

### 3.2.1. Idade da égua

Diferentemente do que ocorre em outras espécies, como a bovina e a suína, as fêmeas equinas são mantidas em reprodução por um período prolongado (Ball, 2000; Brandão *et al.*, 2002), sendo comum encontrar éguas com mais de 20 anos sendo utilizadas na reprodução. Assim, falhas reprodutivas, relacionadas à idade, têm recebido estudos consideráveis na espécie equina (Ball, 2000). Entretanto, os estudos sobre a geriatria equina só foram intensificados a partir da década de 90 (Valle *et al.*, 1999).

As fêmeas equinas apresentam um declínio gradativo da capacidade reprodutiva com o avançar da idade. As taxas de gestação começam a diminuir em éguas com idades entre 14 e 16 anos (Ball, 2000), sendo que, as perdas gestacionais estão associadas às éguas mais velhas (Ginther, 1992).

As éguas velhas ( $\geq 15$  anos) apresentam crescimento folicular mais lento, com maiores intervalos inter-ovulatórios, além de possuírem menor número de folículos que as mais jovens. Nesta espécie, o número de folículos aumenta até os cinco anos, estabiliza dos 6 aos 15 anos e declina a partir dos 15, caminhando para a senescência (Ginther, 1992). Além das alterações ovarianas, o envelhecimento também promove alterações na atividade endócrina da égua durante o período reprodutivo (Carnevale *et al.*, 1993).

A atividade folicular e as concentrações circulantes diárias do hormônio folículo estimulante (FSH), do hormônio luteinizante (LH) e da progesterona, foram comparados entre éguas pôneis jovens e velhas (Carnevale *et al.*, 1993). As concentrações circulantes do hormônio luteinizante (LH) não diferiram entre os grupos de idade, jovens (5-7 anos) e intermediárias (15-19 anos), porém, éguas idosas ( $\geq 20$  anos) apresentaram menores concentrações e menor pico de LH, durante o período ovulatório. Entretanto, esses baixos valores não interferiram com o processo de ovulação nesses animais. Já as concentrações circulantes do hormônio folículo estimulante (FSH) e a atividade folicular, durante a fase luteal, foram maiores em éguas de meia idade, em relação ao que observou-se nas éguas idosas e jovens. As baixas concentrações de LH em éguas idosas podem responder pelo prolongamento da fase folicular.

Além dos problemas ovarianos e das alterações endócrinas, que acometem éguas velhas, outros fatores também estão envolvidos na sua queda de fertilidade. Como por exemplo, o posicionamento do útero, que em éguas velhas, encontra-se projetado para o interior da cavidade abdominal, apresentando uma maior angulação e situando-se em um nível mais baixo em relação ao assoalho da pelve. Tal posicionamento dificulta a drenagem uterina (LeBlanc *et al.*, 1998). Esses animais são mais susceptíveis às inflamações e degenerações uterinas (Carnevale e Ginther, 1994) e apresentam menor contratilidade e tônus uterinos quando comparadas às éguas jovens (Ginther, 1992; Carnevale e Ginther, 1994). Além disso, apresentam menor habilidade para expulsar material estranho e bactérias do útero, bem como maior incidência de endometrites (Ginther, 1992).

A endometrite é uma patologia que provoca declínio gradativo da capacidade reprodutiva, em virtude provavelmente de um processo contínuo de mudanças degenerativas no útero, associadas ao envelhecimento e/ou com o número de partos. Após a terceira ou quarta gestação, a égua começa a acumular fluido intra-uterino (LeBlanc, 2003).

Os espermatozoides são depositados diretamente no útero das éguas, sendo rapidamente transportados para as tubas uterinas. Entretanto, apenas um pequeno número de espermatozoides irá alcançar o local de fertilização no oviduto. A maior parte dos espermatozoides permanece no útero e são eliminados por contrações uterinas e/ou por uma resposta inflamatória aguda do útero. Normalmente, o útero das éguas férteis, resolvem a inflamação dentro de 24 a 36 horas após o acasalamento, bem antes do embrião entrar no útero (5-6 dias após a ovulação). Entretanto, se a inflamação persistir, torna-se prejudicial ao endométrio (LeBlanc, 2003). Assim, se ocorrer uma falha nos mecanismos de defesa, haverá condições para que as bactérias possam se aderir à mucosa uterina, resultando em perda da integridade da mucosa e a instalação de uma infecção bacteriana. Nestes casos, a inflamação passa a ser patológica, sendo este quadro denominado endometrite persistente pós-cobertura (Oliveira, 2010), podendo resultar em infertilidade, com consequente perda econômica significativa para a indústria dos equinos (LeBlanc *et al.*, 1998).

Há que se salientar que, éguas susceptíveis à endometrite persistente induzida pela cobertura devem ser cobertas ou inseminadas apenas uma vez por ciclo estral visando à redução do acúmulo de fluido intra-uterino. Além disso, quando utiliza-se a monta natural recomenda-se a sua realização até 48 horas pré-ovulação. Já as inseminações com sêmen refrigerado, deveriam ser utilizadas até 24 horas antes da ovulação (LeBlanc, 2003).

Carnevale e Ginther (1992) avaliaram a função uterina e eficiência reprodutiva de 31 éguas pôneis, divididas em dois grupos, o de fêmeas jovens, com idade entre 5 e 7 anos (9 animais) e o composto por animais velhos, com idade de 15 ou mais anos (22 animais). No grupo de fêmeas velhas, a taxa de gestação aos 12 dias pós-ovulação foi menor, acompanhada por uma maior taxa de perda embrionária (32% e 62%, respectivamente), quando comparadas às do grupo de éguas jovens (100% e 11%, na mesma ordem anterior). Os autores observaram, ainda, uma redução da contratilidade e do tônus uterinos nas éguas velhas, associados a um acúmulo de líquido intrauterino e endometrite, caracterizada por maior quantidade de infiltrados celulares e fibrose, bem como por uma menor densidade de glândulas endometriais.

Éguas com idade avançada podem apresentar um acúmulo de debris intraluminais, capaz de promover um bloqueio da tuba uterina, sem que haja fibrose, resultando em queda de fertilidade ou até mesmo infertilidade. Normalmente, o embrião equino permanece na tuba uterina das fêmeas por 5 a 6 dias, quando migra para o útero. A secreção de PGE<sub>2</sub> pela mórula equina, no 5º dia pós ovulação, assegura a sua passagem para o útero (Allen *et al.*, 2006), pois, acredita-se que a PGE<sub>2</sub> atue relaxando a musculatura lisa e circular da região do istmo da tuba uterina, permitindo que o embrião entre no lúmen uterino (Peres, 2008).

Sabendo-se disso, Allen *et al.*, (2006) trataram 15 éguas com idade entre 10-21 anos, com aplicações de 0,5mL de gel contendo 0,2 mg de PGE<sub>2</sub> na superfície de cada oviduto, através de um laparoscópio rígido inserido no abdômen através da musculatura do flanco, visando promover a dilatação da tuba uterina. Essas éguas possuíam histórico de infertilidade por até quatro estações de monta sem, que apresentassem qualquer patologia reprodutiva aparente. Das 15 éguas tratadas, 14 (93%) se tornaram gestantes após o tratamento, na mesma estação ou na estação de monta subsequente.

Carnevale e Ginther (1994) coletaram oócitos de éguas doadoras jovens (2-10 anos) e velhas (≥ 15 anos), e os transferiram para a tuba uterina de éguas jovens. Inicialmente, um menor número

de oócitos foi coletado, em éguas velhas. Além disso, observou-se menor taxa de gestação, quando os oócitos fertilizados eram oriundos de fêmeas mais velhas (8/26), em relação ao que verificou-se com os oriundos de éguas jovens (11/12). Neste estudo, verificou-se que os oócitos de éguas mais velhas já estão comprometidos, assim como seus embriões, independentemente da condição uterina.

Ball (2000) observou queda acentuada na taxa de recuperação de blastocistos em éguas mais velhas. Além disso, os blastocistos desses animais possuíam maior percentual de defeitos morfológicos, o que resultou em maior ocorrência de perdas gestacionais, quando comparadas às fêmeas jovens. A maior parte destas perdas foram observadas no início da gestação. Concluiu-se que os efeitos deletérios relacionados à idade da égua sobre a fertilidade devem ser atribuídos, principalmente, a defeitos intrínsecos ao oócito e ao embrião resultante, podendo, as anormalidades, exercerem maior impacto sobre estágios mais avançados da gestação.

Ao contrário de muitos autores, Brandão *et al.* (2002) não observaram influência da idade na fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. Neste estudo, foram utilizados noventa e um ciclos estrais de sessenta éguas inseminadas com doses inseminantes de 200 ou 400 milhões de espermatozoides em 10mL de sêmen diluído, de apenas um garanhão da raça brasileira de hipismo. As taxas de concepção, ao primeiro ciclo, foram, respectivamente de 72,73% (8/11); 62,50% (10/16); 66,67% (12/18); 63,64% (7/11) e, após quatro ciclos, de 64,29% (9/14); 60,71% (17/28); 44,83% (13/29) e de 50,00% (10/20), para as faixas etárias de 4 a 6 anos, 7 a 10 anos, 11 a 14 anos e de 15 a 16 anos de idade, respectivamente, sem que houvessem diferenças significativas entre elas.

### 3.2.2. Categoria reprodutiva

As éguas tem sido classificadas, de acordo com o seu estado fisiológico e metabólico, em quatro categorias reprodutivas, a saber: potras (éguas jovens que nunca conceberam), éguas solteiras (vazias na estação reprodutiva anterior), éguas paridas (com potro ao pé) ou éguas no “cio do potro” (no primeiro cio pós-parto). As éguas mais férteis são aquelas pertencentes às categorias potra e égua parida, com potencial de fertilidade acima de 70%. Tem sido descrito que potras e éguas gestantes possuem um potencial de fertilidade entre 70 e 100%, superior ao das éguas que não conceberam na estação de monta anterior (50-70%), ao das éguas vazias por mais de duas estações reprodutivas consecutivas (25-50%) e, finalmente, bem superior, aos daquelas susceptíveis às infecções e/ou com idade avançada (< 25%) (Von Lepel, 1975).

A gestação equina dura em média 335-340 dias. Assim, a produção de um potro/égua/ano só é possível naquelas éguas que parem e emprenham novamente dentro de 25-30 dias pós-parto (Camilo *et al.*, 1997). A involução uterina macroscópica e microscópica é bem rápida no pós-parto das éguas, resultando em retorno à condição pré-gravídica a partir dos 14 dias, acompanhada por manifestação de estros férteis nas primeiras duas semanas pós-parto (Blanchard e Macpherson, 2011).

O reinício da atividade ovariana nas éguas, não é impedido pela sucção nem pela presença do potro. Menos do que 10% das éguas não conseguem ovular dentro de duas semanas após o parto. O anestro lactacional como ocorre regularmente em seres humanos, suínos ou bovinos de corte, portanto, não existe nos equinos (Heidler *et al.*, 2003).

Quando a inseminação artificial é realizada no “cio do potro”, geralmente, é acompanhada por taxa de gestação inferior ao que observa-se nas éguas cobertas em cios subsequentes (Camilo *et al.*, 1997). Tais resultados podem estar associados à eliminação incompleta de micro-organismos introduzidos no ambiente uterino, durante a cópula ou inseminação artificial, diante de uma involução uterina incompleta (McKinnon *et al.*, 1988). Segundo Kurtz Filho *et al.* (1998) o primeiro cio pós-parto ocorre em média aos 12,3 dias  $\pm$  10,9. Quando possui uma duração entre 8 e 14 dias, responde por uma taxa de gestação significativamente maior, em relação às durações fora destes limites.

Em um experimento conduzido por Kurtz Filho *et al.* (1998), demonstrou-se que, a taxa de gestação, ao primeiro cio pós-parto, foi similar às obtidas no terceiro e quarto cios. Entretanto, obteve-se uma taxa de gestação significativamente maior no segundo cio, em relação à obtida no primeiro cio. A involução uterina completa das éguas sadias, no segundo cio, pode justificar os resultados obtidos. Ao primeiro cio pós-parto, o útero apresenta-se em plena involução clínica. Entretanto, ao segundo cio, toda égua sadia apresenta-se em condições de conceber e manter a gestação. Há que se enfatizar, entretanto, que as éguas apresentando o terceiro e quarto cios, na maioria das vezes, tiveram a oportunidade de conceber no segundo cio, o que pode indicar a presença de algum problema reprodutivo.

Camilo *et al.* (1997) também relataram maior taxa de gestação no segundo ciclo pós-parto, sem que houvesse, entretanto, diferenças estatísticas dos demais ciclos avaliados. Assim, a taxa de gestação em éguas inseminadas no “cio do potro” foi de 71,9%, cerca de 13% mais baixa que a observada no segundo ciclo, de 84,6%, porém, foi similar às taxas de gestação do primeiro e segundo ciclos, de éguas não lactantes (77,8 e 75,7%, respectivamente).

Ao avaliar a eficiência reprodutiva de receptoras involuadas no “cio do potro”, observou-se ser a sua eficiência reprodutiva similar às involuadas em cios subsequentes (Azevedo, *et al.*, 2013).

A maioria das éguas possui grande capacidade de eliminar a contaminação bacteriana presente, no sistema genital, no pós-parto. Neste sentido, Purswell *et al.* (1989) estudaram a contaminação uterina no pós parto. Para tal, coletou-se swabs endometriais de éguas no segundo dia pós-parto e durante o “cio do potro”. Em sete éguas, que não conceberam no “cio do potro”, o swab foi coletado no segundo estro pós-parto. Constatou-se, neste estudo, que sete das treze éguas (53,85%) apresentaram contaminação bacteriana aeróbica, dentro das 48 horas pós-parto. No “cio do potro”, 23% (3/13) das éguas apresentaram crescimento bacteriano aeróbico, enquanto no segundo estro pós-parto, 100% (7/7) não apresentaram contaminação bacteriana. Conclui-se assim, que as éguas são capazes de eliminar espontaneamente a contaminação bacteriana uterina no pós-parto.

Segundo Reiner *et al.* (1988), desde que o parto não tenha complicações e que a égua esteja sadia, é vantajosa a utilização do “cio do potro”, pois além de se ganhar um tempo precioso, evita-se que as fêmeas entrem em anestro por questões hormonais. Neste estudo, observou-se que as taxas de gestação e de morte embrionária precoce para éguas cobertas no “cio do potro”, foram em 1982 de 54% e 12,2%; em 1983, de 48% e 7,1%; em 1984, de 37% e 26,3%; em 1985, de 47% e 13,5% e em 1986, de 51% e 8,5%, respectivamente.

No mesmo sentido, Fernandes *et al.* (1995) avaliaram a eficiência reprodutiva de 1255 éguas PSI durante cinco estações reprodutivas (agosto à dezembro de 1990 à 1994). As taxas de gestação e as de gestação/ciclo, não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre as categorias: lactantes (80% e

52%); éguas solteiras – falhadas no ano anterior (84% e 49%) e potras (85% e 49%), respectivamente. Entretanto, o percentual de reabsorção embrionária foi menor ( $p < 0,01$ ) para as potras (1/134 – 1%), em comparação às éguas lactantes (51/648 – 8,0%) e solteiras (22/247 – 9,0%). Decorridos, cinco ciclos, observou-se uma redução da taxa de gestação ( $p < 0,01$ ), a partir do terceiro ciclo (50%; 43%; 28%; 16% e 1%), sem que houvesse diferenças ( $p > 0,05$ ) entre as categorias. O percentual de perda embrionária aumentou, significativamente ( $p < 0,01$ ), a partir do terceiro ciclo (5%, 8%, 17%, 12% e 16%). Entretanto, as éguas lactantes apresentaram maior percentual (6,2%) de perdas no primeiro ciclo (cio do potro), em relação às demais categorias (solteiras = 2,8% e potras = 0%).

Quanto à categoria de potras, Nishikawa (1959), recomendou a sua utilização em idade superior aos três anos, em virtude da imaturidade do sistema genital, nas potras mais jovens. Em um estudo utilizando 137 potras jovens, com 12 a 14 meses de idade, expostas ao garanhão pela primeira vez, obteve-se uma taxa de concepção de 69,34% (95/137), sendo que dessas, 46,32% (44/95) sofreram aborto espontâneo (entre 30 e 160 dias). A alta incidência de perdas pode ter ocorrido, principalmente, em função da imaturidade das fêmeas púberes (Mitchell e Allen, 1975).

Potras com um ano de idade são capazes de conceber, embora não consigam parir um potro vivo (Panzani *et al.*, 2007), em virtude de se encontrarem na puberdade (12-18 meses). Ao utilizarem dois grupos de éguas, primíparas e múltiparas, observou-se menor área total microcotiledonária, que fica em contato com o feto, nas primíparas. Tal observação pode explicar a menor fertilidade observada em potras muito jovens, assim como o menor peso dos potros nascidos de primíparas em relação aos de fêmeas múltiparas, influenciado por fatores de maturação uterina (Wilsher e Allen, 2002),

Em um estudo conduzido por Panzani *et al.* (2007) comparou-se a taxa de recuperação embrionária de potras de um ano (12 a 16 meses) ou dois anos (24 a 28 meses), com o de éguas maduras (de 3 a 12 anos). Neste estudo, observou-se diferenças ( $p < 0,01$ ) entre as taxas de recuperação de embriões entre os três grupos avaliados, de 47,7% (21/44) para o grupo de um ano de idade, 75% (12/16) para as fêmeas de dois anos de idade e 84,6% (22/26), para as éguas maduras. Entretanto, não observou-se diferenças significativas entre as faixas etárias das doadoras, quanto às taxas de gestação obtidas, após a transferência dos embriões. Concluiu-se, dessa maneira, que as potras com um ano de idade produzem embriões morfológicamente normais e capazes de se desenvolverem quando transferidos para receptoras, pelo menos, até os 25 dias de gestação.

Há que se salientar, neste momento, que na categoria de éguas solteiras, podem ser encontradas fêmeas submetidas a um manejo reprodutivo inadequado na estação de monta anterior, na ausência de quaisquer patologias. Por outro lado, observa-se também, animais com problemas reprodutivos transitórios. Assim, é importante analisar esses animais de forma criteriosa. Em um trabalho realizado por Ferreira (1993), avaliou-se a eficiência reprodutiva de éguas pertencentes a três categorias: potras, éguas solteiras e éguas com “potro ao pé”, inseminadas com sêmen asinino. As taxas de gestação obtidas foram de, 81,8% para as potras, 93,7% para as éguas solteiras e 81,8% para as éguas com “potro ao pé”, destacando-se o bom resultado obtido na categoria de éguas solteiras.

Rossi (2008) não observou diferenças entre éguas pertencentes a quatro categorias reprodutivas avaliadas, no que se refere à fertilidade. As fêmeas foram inseminadas com sêmen diluído e

resfriado de jumentos. As taxas de concepção obtidas foram de 61,54%, 47,13%, 54,76% e 47,17%, respectivamente, para as categorias potra, égua solteira, égua com “potro ao pé” e égua no “cio do potro”. Quanto às perdas gestacionais, observou-se um percentual total de 8,51% (12/141), com a seguinte distribuição, por faixa etária: 2,5- 6,0 anos (1/141-0,71%); 6,5-10 anos (5/141- 3,55%); 10,5-14,0 anos (1/141-0,71%) e 14,5-19,0 anos (5/141-3,55%). Assim, não observou-se efeito da faixa etária sobre as perdas gestacionais, o que caracterizou, naquele experimento, ausência de efeito da idade sobre a fertilidade das éguas. Tais resultados conflitam com diversos estudos (Carnevale e Ginther, 1992; Brinsko *et al.*, 1994), que demonstraram maior percentual de perdas gestacionais relacionadas às éguas mais velhas.

### 3.2.3 Momento de deposição do sêmen no sistema genital da fêmea equídea em relação à ovulação

Inúmeros fatores influenciam a taxa de gestação de éguas submetidas à inseminação artificial, incluindo a fertilidade inerente da égua e do garanhão, o tipo de sêmen utilizado para a inseminação (fresco, resfriado/transportado ou congelado/descongelado), o número de espermatozoides/dose inseminante, o tempo de estocagem do sêmen antes da inseminação artificial (Sieme *et al.*, 2003), dentre outros. Além disso, o momento da deposição do sêmen, em relação à ovulação, é de fundamental importância quando se estuda fertilidade (Silva Filho *et al.*, 1998), pois exerce forte efeito sobre as taxas de gestação obtidas, principalmente, quando se utiliza sêmen congelado/descongelado. Vale salientar, neste momento, que a vida média dos espermatozoides submetidos ao congelamento é bem mais curta que a dos espermatozoides oriundos do sêmen fresco (Leite, 1994), para a maioria dos reprodutores equídeos.

A fertilização requer um oócito maduro e espermatozoides capazes de alcançá-lo e penetrá-lo. Os espermatozoides estão presentes na tuba uterina dentro de quatro horas após a monta natural ou inseminação artificial. A capacitação espermática ocorre quando os espermatozoides são expostos às secreções do sistema genital da fêmea, quando tornam-se capazes de fertilizar um oócito. Quando este processo é concluído, a sobrevivência dos espermatozoides na tuba uterina, até a ovulação de um oócito fértil, determinará se a concepção ocorrerá após um único acasalamento, antes da ovulação (Stone, 1994). A longevidade dos espermatozoides frescos no sistema genital da fêmea equina varia de 24 horas até sete dias, havendo consideráveis variações entre garanhões (Sieme *et al.*, 2003). Assim, se a inseminação for realizada pré-ovulação, a fertilização dependerá da viabilidade espermática no sistema genital da égua. Por outro lado, se a inseminação for realizada após a ocorrência da ovulação, a viabilidade do oócito será o fator de maior influência sobre o sucesso ou não da fertilização (Woods *et al.*, 1990). A partir de 12 horas após a liberação do oócito, ocorrerá um processo de degeneração nuclear, acompanhado por um pareamento imperfeito dos cromossomos na placa metafisária, podendo levar a morte do embrião (Hunter, 1990), ou o nascimento de animais com complementos cromossômicos imperfeitos e as devidas alterações resultantes do processo. Assim, a inseminação artificial deve ser realizada no momento adequado, de forma que tanto os gametas masculinos quanto o feminino estejam viáveis no momento da fertilização (Jacob *et al.*, 2000).

Vários trabalhos compararam a taxa de gestação de éguas, cobertas à diferentes intervalos antes e/ou após a ovulação (Palmer, 1984; Woods *et al.*, 1990; Squires *et al.*, 1998; Sieme *et al.*, 2003), com um decréscimo da taxa de prenhes proporcional ao aumento do intervalo da cobertura à ovulação. Entretanto, a inseminação com sêmen fresco pós-ovulação não é amplamente praticada por causa do aumento do número de palpções ovarianas necessárias,

embora haja relatos de taxas de gestação aceitáveis utilizando esta abordagem (Kloppe *et al.*, 1988).

Em 1990, Woods *et al.* realizaram dois experimentos para avaliar o efeito do momento da inseminação em relação à ovulação. No primeiro estudo, foram utilizadas 86 éguas, submetidas à indução da ovulação, ao apresentarem um folículo com 35mm, com 2000 UI da hCG via endovenosa. Após a aplicação da hCG, essas fêmeas foram divididas em três grupos, a saber: 1 – éguas inseminadas no dia da indução; 2 – éguas inseminadas no dia da ovulação e 3 – éguas inseminadas um dia após a ovulação. As inseminações foram realizadas com sêmen a fresco diluído de garanhões, com doses inseminantes contendo  $400 \times 10^6$  espermatozoides móveis. Neste estudo, obteve-se taxas de gestação de 56% (19/34), 44% (11/25) e 4% (1/27), para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente. No segundo estudo, as éguas foram inseminadas à intervalos de 0-6, 6-12, 12-18, 18-24, 24-30 e mais de 30 horas após a ocorrência da ovulação. Neste estudo, observou-se que as éguas inseminadas até seis horas pós-ovulação apresentaram maior taxa de gestação que as inseminadas entre 18 (dezoito) e 24 (vinte e quatro) horas pós-ovulação. Após 30 (trinta) horas de ocorrência da ovulação, nenhuma égua ficou gestante. As taxas de gestação foram de 78,57% (11/14), 65% (13/20), 50% (7/14), 33% (7/21), 25% (3/12), 0% (0/31), respectivamente, na mesma ordem anterior.

No mesmo sentido, Ferraz e Vicente (2006) avaliaram diferentes momentos de cobrição, pré e pós-ovulação. Foram cobertas 405 éguas da raça Puro Sangue Inglês, utilizando-se 629 ciclos estrais, entre os meses de agosto e dezembro (época que compreende a estação de monta do Puro Sangue Inglês), nos anos de 1995 à 2002. Essas fêmeas foram distribuídas em cinco grupos experimentais, de acordo com o momento da cópula em relação à ovulação, a saber: grupo I – éguas submetidas à cobrição entre 48 e 36 horas antes da ovulação; grupo II – éguas cobertas entre 36 e 24 horas antes da ovulação; grupo III – éguas cobertas entre 24 e 12 horas antes da ovulação; grupo IV – éguas cobertas entre 12 e zero horas antes da ovulação e grupo V – éguas cobertas entre zero e 12 horas após a ovulação. Neste estudo, concluíram que cobrições realizadas nas 24 horas que antecederam à ovulação responderam pela maior eficiência reprodutiva. Além disso, observaram que as taxas de concepção aos 14 dias, bem como a morte embrionária precoce, estiveram fortemente relacionadas ao momento da cobrição em relação à detecção da ovulação.

Após o processo de congelamento e descongelamento, a viabilidade da célula espermática é reduzida, diminuindo sua longevidade e capacidade de fecundação, o que justifica os baixos índices de gestação obtidos. Por este motivo, a inseminação artificial deve ser realizada imediatamente após o descongelamento do sêmen, bem próximo ao momento da ovulação. O ideal é que se faça controle folicular com acompanhamento ultra-sonográfico em tais programas de inseminação em equinos, a fim de se prever a ovulação e decidir o melhor momento para a inseminação (Brinsko e Varner, 1993). Vale salientar que quanto maior o intervalo de tempo da ovulação à inseminação com sêmen descongelado, maior será a taxa de perda embrionária (Woods *et al.*, 1990), em virtude das alterações degenerativas que acontecem no oócito a partir de 8-10 horas após a ovulação. O envelhecimento do oócito é caracterizado pela perda da estabilidade das organelas citoplasmáticas e nucleares, quando o mesmo se encontra na tuba uterina, após a ovulação. Estas alterações degenerativas associadas com o pareamento imperfeito dos cromossomos tem como principal sequela a perda embrionária. Além disso, com o envelhecimento do oócito, os grânulos responsáveis por desencadear o bloqueio à poliespermia distanciam-se da córtex, impedindo que ocorram as mudanças necessárias na

membrana plasmática, denominado bloqueio vitelínico e que impede a entrada de vários espermatozoides no oócito (Hunter, 1990).

Alguns autores avaliaram a taxa de gestação obtida em éguas com o uso do sêmen congelado-descongelado, sendo as inseminações realizadas, antes ou após a ovulação. Palmer (1984) estudando a eficiência do sêmen congelado-descongelado, realizou inseminações dentro de 24 horas antes da ovulação e obteve uma taxa de gestação superior à obtida quando de inseminações realizadas entre 24 a 48 horas antes de sua ocorrência (38%, n=61; 19%, n=57, respectivamente).

Kloppe *et al.* (1988) avaliaram o efeito do momento da inseminação sobre a fertilidade de éguas, utilizando o sêmen a fresco ou congelado/descongelado de um garanhão. Com o sêmen a fresco, as inseminações foram realizadas a cada dois dias, até a ovulação, a partir da detecção de um folículo de 35mm de diâmetro; para o sêmen congelado/descongelado as inseminações foram realizadas diariamente durante o estro, a partir da detecção de um folículo de 35mm de diâmetro, até a ovulação ou realizada apenas uma única vez, até seis horas pós-ovulação. Dando ênfase ao sêmen congelado, neste estudo, comprovou-se que inseminações diárias até a ovulação, ou uma única inseminação, dentro de 6 horas após a sua ocorrência, responderam por taxas de gestação aceitáveis (60 e 55%, respectivamente).

Em 2003, Sieme e colaboradores utilizaram uma única inseminação com sêmen congelado, no intervalo entre 12 e 24 horas pré-ovulação, quando obtiveram uma baixa taxa de gestação, de 30,80%. Entretanto, observaram elevação significativa da fertilidade quando associou a esta, outra inseminação dentro de até 12 horas após a ovulação, quando obteve-se uma taxa de gestação de 61,90%.

A literatura é escassa quando se considera o intervalo de tempo da deposição do sêmen em relação à ovulação, em jumentas e éguas inseminadas com sêmen asinino. Neste sentido, Ferreira (1993) ao trabalhar com éguas inseminadas com sêmen asinino resfriado à 5°C, observou que as taxas de concepção foram influenciadas ( $p < 0,05$ ) pelo intervalo inseminação - ovulação. Desta forma, nas éguas inseminadas 24 a 48 horas antes da ovulação, obteve-se uma taxa de gestação de 61,8% (21/34), enquanto nas inseminadas dentro de 24 horas pré-ovulação, obteve-se uma taxa de gestação de 88,9% (32/36). Neste mesmo estudo, quando as inseminações foram realizadas dentro de um período máximo de 12 horas pós-ovulação, obteve-se uma taxa de gestação de 85,7% (6/7), que não diferiu ( $p > 0,05$ ) do grupo de éguas inseminadas dentro de 24 horas, antes da ovulação. Entretanto, Leite (1994) também utilizando sêmen asinino, porém, a fresco diluído, não observou diferenças quanto à fertilidade de éguas inseminadas dentro do período de 0-24 horas ou 24-48 horas antes da ovulação.

Rossi (2008) trabalhando com éguas inseminadas com sêmen asinino resfriado à 5°C, obteve taxas de gestação de 46,55% e 45,45%, quando de inseminações realizadas 24 ou 48 horas, respectivamente, antes da ovulação. Quando as inseminações foram realizadas 48 horas pré-ovulação e repetida no momento de sua detecção pós-ovulação, a taxa de gestação foi de 50,70%. Além disso, quando as inseminações foram realizadas 72 horas antes da ovulação e repetidas no momento de sua ocorrência, após a ovulação, a taxa de gestação foi de 60%, não havendo diferenças significativas entre os diferentes intervalos avaliados.

Ao utilizar o sêmen asinino congelado em palhetas de 0,5mL, Gama Ker (2009) avaliou a fertilidade de éguas inseminadas pré ou pós-ovulação, com doses inseminantes de  $300 \times 10^6$

espermatozoides viáveis, depositados no ápice do corno uterino. A taxa de gestação das fêmeas inseminadas pré-ovulação, 24 horas após a aplicação da hCG e repetida 24 horas após, caso não ocorresse a ovulação, foi de 26% (6/23). Nas éguas inseminadas após a ovulação, dentro de seis horas da sua ocorrência, obteve-se uma taxa de gestação 40% (10/25), aos 13 dias de gestação, não sendo encontradas diferenças ( $p>0,05$ ), nas taxas de gestação, entre os dois momentos de inseminação. As taxas de perda embrionária aos 25 e 35 dias, foram similares para os dois tratamentos, ocorrendo uma perda no tratamento pós-ovulação e duas perdas no tratamento pré-ovulação.

Também utilizando o sêmen congelado asinino, porém, inseminando jumentas, Trimeche *et al.* (1998) inseminaram as fêmeas todos os dias, a partir da primeira exibição do estro, acompanhada pela presença de folículos de 30mm, até a ovulação. A dose inseminante utilizada (sêmen congelado-descongelado), continha  $600 \times 10^6$  espermatozoides com no mínimo 35% de motilidade total. Neste estudo, observou-se uma taxa de gestação de 38% (8/21).

De modo geral, a maioria dos autores concordam que quanto mais próximo da ovulação for realizado a inseminação, maiores serão as taxas de gestação.

#### 3.2.4. Efeito do local de deposição do sêmen no sistema genital da fêmea equídea e da concentração espermática/dose inseminante sobre a fertilidade de éguas e jumentas

O local de deposição do sêmen, no momento da inseminação artificial, é um fator muito estudado em todas as espécies, sendo de grande importância para a obtenção de bons resultados de fertilidade (Ginther, 1992).

Na monta natural ou na inseminação artificial convencional em éguas, o sêmen é depositado no corpo do útero. Este local é bastante eficiente quando utiliza-se um elevado número de espermatozoides por dose inseminante (Ginther, 1992). Minutos após a deposição do sêmen no corpo do útero, os espermatozoides são transportados até a tuba uterina (Bader, 1982; Ginther, 1992; Katila *et al.*, 2000). Entretanto, os primeiros espermatozoides, provavelmente, não irão fertilizar o oócito (Ginther, 1992).

Para avaliar a presença de espermatozoides na junção útero-tubárica, istmo e ampola, Bader (1982) inseminou 14 éguas com sêmen a fresco e nove éguas com sêmen congelado, sendo as inseminações realizadas 0-6 horas após a detecção da ovulação. As éguas foram abatidas 2, 4 ou 6 horas após a inseminação. A junção útero-tubárica, istmo e ampola, foram lavados separadamente para a recuperação dos espermatozoides, não havendo diferenças significativas no grau de migração dos espermatozoides nas diferentes regiões da tuba uterina. Entretanto, houve uma diferença notável quanto ao número de espermatozoides dentro da tuba, sendo o maior percentual observado após 4 horas da inseminação. A junção útero-tubárica exerce a função de reservatório espermático, podendo atuar, além disso, como um filtro de forma a evitar que um número excessivo de espermatozoides chegue até a ampola (Ginther, 1992), além de controlar a velocidade de passagem dos espermatozoides, de forma lenta para o local onde ocorrerá a fertilização (Boyle *et al.*, 1987).

A inseminação artificial com sêmen fresco de garanhões, sem problemas reprodutivos, geralmente utiliza doses inseminantes com 250 a  $500 \times 10^6$  espermatozoides viáveis (Brinsko e Varner, 1993). Neste sentido, Leite (1994) avaliou diferentes concentrações espermáticas ao

inseminar éguas, no corpo do útero, com sêmen a fresco de jumentos. As concentrações utilizadas foram de 50, 100, 200, 400 ou 600 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva por dose inseminante. As taxas de gestação proporcionadas com as doses de 50 ou 100 milhões de espermatozoides, com motilidade progressiva, foram de 3,44% (1/29) e 20,68% (6/29), respectivamente, que diferiram ( $p < 0,05$ ) das taxas de gestação obtidas com as outras concentrações. Para as concentrações de 200, 400 e 600 x 10<sup>6</sup> obteve-se taxas de gestação de 53,12%, 70% e 67,64%, sem que houvesse diferenças ( $p > 0,05$ ) entre elas. Neste estudo, demonstrou-se que uma dose inseminante de 200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides asininos com motilidade progressiva, proporciona uma taxa de gestação comercialmente aceitável.

Visando melhorar os resultados de fertilidade de indivíduos subfêrteis, maximizar o aproveitamento de animais férteis de alto potencial, conseguir melhores resultados com a aplicação do sêmen congelado e proporcionar a utilização de um baixo número de espermatozoides na inseminação, alguns autores têm estudado a possibilidade do uso da inseminação histeroscópica em equinos, na qual, faz-se a deposição do sêmen sobre a junção útero-tubárica com auxílio de um endoscópio, eliminando a fase de transporte uterino dos espermatozoides (Leão, 2002).

Morris *et al.* (2003) observaram resultados positivos ao utilizar baixas concentrações por dose inseminante, no sêmen congelado-descongelado, associado à inseminação histeroscópica na junção utero-tubárica. Os autores avaliaram e compararam a eficácia da inseminação convencional no corpo do útero com a da histeroscópica. Para tal, foram utilizadas 86 éguas, inseminadas uma única vez, com sêmen congelado, com baixo número de espermatozoides (3-14 x 10<sup>6</sup>), após 32 horas do tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG). As taxas de gestação foram similares em éguas inseminadas convencionalmente ou histeroscopicamente, com 14 x 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis (67% e 64%, respectivamente). No entanto, quando a concentração foi reduzida para 3 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides móveis, a taxa de gestação foi significativamente mais elevada nas éguas inseminadas histeroscopicamente, na junção utero-tubárica, quando comparadas às inseminadas no corpo do útero (47% e 15%;  $p < 0,05$ ). Entretanto, alguns problemas podem ser encontrados durante o procedimento de histeroscopia, tais como a difícil visualização e a incapacidade de manobrar o endoscópio dentro do corno uterino, durante o procedimento (Weems e Byers, 2004).

A inseminação intrafolicular, procedimento que envolve a introdução direta de espermatozoides em um folículo pré-ovulatório, não tem demonstrado bons resultados. Assim, em um estudo conduzido por Leão *et al.* (2004), avaliou-se a eficiência da inseminação intrafolicular, utilizando-se vinte éguas, que ao apresentarem um folículo dominante com 35mm de diâmetro, receberam 2500 UI da hCG. Após 30 horas da indução, o controle folicular foi realizado a cada 6 horas e a inseminação realizada próximo da ovulação. Foram utilizadas doses inseminantes com 20 x 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis, oriundas de garanhões. O ovário foi manipulado pelo reto para o posicionamento adequado do folículo dominante. Com a ajuda ultrassonográfica pelo reto, a parede folicular foi perfurada e o sêmen injetado no folículo. Neste estudo, observou-se a ineficiência da inseminação intrafolicular, acompanhada por uma taxa de gestação de 0%.

Inseminações artificiais em equinos envolvendo a deposição do sêmen no corpo do útero ou no ápice do corno tem sido conduzidas e avaliadas por vários autores. Neste sentido, Buchanan *et al.* (2000) compararam as taxas de gestação de éguas inseminadas com 500 x 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis em 20mL depositados no corpo do útero (T1), 25 x 10<sup>6</sup>

espermatozoides móveis em 1,0mL (T2),  $5 \times 10^6$  espermatozoides móveis em 1,0mL (T3) e  $5 \times 10^6$  espermatozoides móveis em 0,2mL (T4), depositados na extremidade do corno uterino, ipsilateral à ovulação. As taxas de gestação obtidas foram de 90% (18/20), 57% (12/21), 30% (3/10) e 40% (4/10), respectivamente, para os tratamentos T1, T2, T3 e T4. Neste estudo, concluíram que a deposição do sêmen na extremidade do corno uterino, ipsilateral ao folículo ovulatório, pode maximizar a fertilidade quando se utiliza baixo número de espermatozoides em um pequeno volume, como dose inseminante.

Papa e Dell'Aqua Júnior (2001) avaliando o efeito do local de deposição, utilizaram inseminações no corpo do útero e na extremidade do corno, ipsilateral à ovulação, bem como o efeito da concentração da dose inseminante sobre as taxas de gestação obtidas. Neste estudo, utilizou-se o sêmen de quatro garanhões para inseminar vinte potras em idade reprodutiva. Para avaliar o efeito do local de deposição do sêmen, utilizou-se quatro protocolos, a saber: G1 – sêmen depositado no corpo do útero com concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides, pré-ovulação; G2 – sêmen depositado no ápice do corno uterino com concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides, pré-ovulação; G3 – sêmen depositado no corpo do útero com concentração de  $150 \times 10^6$  espermatozoides, pós-ovulação; G4 – sêmen depositado no ápice do corno uterino com concentração de  $150 \times 10^6$  espermatozoides, pós-ovulação. A taxa de gestação foi de 20%, quando depositou-se  $50 \times 10^6$  espermatozoides pré-ovulação no corpo do útero (G1). Quando a mesma concentração espermática foi depositada no ápice do corno uterino, a taxa de gestação foi de 0% (G2). Nos tratamentos G3 e G4, envolvendo a deposição de  $150 \times 10^6$  espermatozoides pós-ovulação, obteve-se uma taxa de gestação de 40%, quando o sêmen foi depositado no corpo do útero (G3) e de 50%, quando o sêmen foi depositado no ápice do corno (G4).

Em 2010, Moreira comparou o efeito da deposição do sêmen no corpo uterino ou no ápice do corno uterino. Para tal, utilizou o sêmen congelado de seis garanhões para inseminar oito éguas, sendo quatro inseminadas no corpo útero e quatro no corno uterino, ambas com doses inseminantes de  $200 \times 10^6$  espermatozoides totais. As taxas de gestação para as éguas inseminadas, independentemente do local de deposição do sêmen, foram similares (3/4 e 3/4; 75%). O número de inseminações necessário para se obter uma gestação, no grupo das éguas inseminadas no corno uterino (2,66/égua), também foi similar ao que verificou-se no grupo de éguas inseminadas no corpo uterino (1/égua) ( $p > 0,05$ ). Em média, foram necessárias 1,83 inseminações para se obter uma gestação. Neste estudo, concluiu-se ser possível obter taxas de gestação aceitáveis com sêmen congelado quando se reduz a concentração espermática, abaixo da dose convencional. Também concluiu-se que o local de deposição do sêmen, corpo uterino ou no ápice do corno uterino, não parece influenciar as taxas de gestação, na presença de uma concentração espermática de  $200 \times 10^6$  espermatozoides totais por dose inseminante.

### 3.2.5. Número de inseminações artificiais por ciclo estral sobre a fertilidade de éguas ou jumentas inseminadas

A frequência de cobrições ou inseminações é um dos aspectos mais importantes do manejo reprodutivo de equinos, dependendo da individualidade do garanhão e do tipo de sêmen utilizado. Quanto à individualidade do garanhão, é importante saber que a qualidade do sêmen sofre variações entre ejaculados e indivíduos, quanto à motilidade progressiva do sêmen, a concentração necessária por dose inseminante, a duração da capacidade fecundante no sistema genital da fêmea, dentre outras. Igualmente importante para o sucesso da concepção é o

acompanhamento do desenvolvimento folicular, visando detectar o momento da ovulação (Silva Filho *et al.*, 1998).

O controle da ovulação possibilita a redução do número de inseminações artificiais/ciclo, sendo este, um fator importante a ser considerado quando se pretende reduzir custos em um programa de inseminação artificial de equinos, notadamente naqueles envolvendo o transporte de sêmen entre haras (Valle *et al.*, 2000). A determinação do momento exato da ovulação requer um maior controle das éguas, através da realização de palpções transretais e/ou de exames ultrassonográficos sistemáticos da atividade ovariana das éguas. Com este manejo, é possível reduzir o número de inseminações artificiais por ciclo, com conseqüente redução dos riscos de contaminação iatrogênica do sistema genital, principalmente em éguas susceptíveis à endometrite (Brinsko e Varner, 1993).

Ao contrário de outras espécies domésticas, as éguas possuem uma fase folicular longa, com duração do estro bastante variável (Pace e Sullivan, 1975). Para facilitar o manejo de forma que a inseminação ocorra o mais próximo da ovulação, preconiza-se os agentes indutores da ovulação. Esses agentes são aplicados na presença de um folículo com 33mm de diâmetro em éguas pôneis e de 35mm em éguas, período em que o folículo encontra-se mais responsivo ao LH (Melo *et al.*, 2012). Deste modo, após a indução da ovulação, a maioria das éguas irá ovular dentro de 36-48 horas da indução, havendo, desta forma, uma variação individual acentuada, que pode estar relacionada ao diâmetro ovulatório de cada animal (Sieme *et al.*, 2003).

Alguns autores observaram maior eficiência dos ciclos acompanhados por um maior número de cobrições ou inseminações (Squires *et al.*, 1998; Vidament *et al.*, 1997; Sieme *et al.*, 2003; Xavier *et al.*, 2010). Entretanto, vários autores não observaram efeito dessa variável sobre a fertilidade das fêmeas equinas (Pace e Sullivan, 1975; Kloppe *et al.*, 1988; Valle *et al.*, 2000; Brandão *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado por Squires *et al.* (1998), utilizou-se o sêmen de três garanhões para inseminar 33 éguas, divididas em três grupos. No primeiro grupo, as éguas foram inseminadas duas vezes, sendo a primeira inseminação realizada com  $1 \times 10^9$  espermatozoides com motilidade progressiva, com o sêmen resfriado à 5°C durante 24 horas. A segunda inseminação foi realizada 24 horas após a primeira, com a mesma concentração, embora o sêmen tenha sido resfriado por 48 horas (T1); no segundo grupo, as éguas foram inseminadas apenas uma vez com  $1 \times 10^9$  espermatozoides com motilidade progressiva, sendo o sêmen resfriado à 5°C por 24 horas (T2). No terceiro grupo, as éguas foram inseminadas apenas uma vez com  $2 \times 10^9$  espermatozoides com motilidade progressiva, sendo o sêmen resfriado à 5°C durante 24 horas (T3). Todas as fêmeas foram induzidas com 2500UI de hCG, no momento da inseminação. As taxas de gestação obtidas foram de 64% (16/25), 31,0% (9/20) e 41,4% (12/17), respectivamente, para os tratamentos T1, T2 e T3, sendo os valores do T1 superiores aos do T2 e T3, que não diferiram ( $p > 0,10$ ) entre si.

No mesmo sentido, Vidament *et al.* (1997), também observaram melhores resultados ao inseminar as éguas duas ou mais vezes por ciclo, em relação as inseminadas apenas uma vez, com taxas de gestação de 34% (n=1.576) e 26% (n=626), respectivamente.

Sieme *et al.* (2003) observaram que a taxa de gestação de éguas inseminadas apenas uma vez com sêmen resfriado de garanhões (84/169; 49,7%), não diferiu ( $p > 0,05$ ) das inseminadas duas vezes por ciclo (48/85; 56,5%), embora diferisse ( $p < 0,05$ ) das inseminadas três (20/28; 71,4%)

vezes por ciclo, sendo o intervalo entre as inseminações de 24 horas. Em outro estudo, avaliando as taxas de nascimento, verificaram os menores valores nas éguas inseminadas uma vez por ciclo (507/1622; 31,2%), em relação às inseminadas duas (791/1905; 41,5%), três (464/1064; 43,6%) ou quatro (314/714; 43,9%) vezes por ciclo. Além disso, ao utilizarem sêmen congelado e uma única inseminação realizada entre 12 horas antes (31/75; 41,3%) até às 12 horas após (24/48; 50%) a ovulação, obteve-se taxas de concepção similares às observadas para as éguas inseminadas duas (31/62, 50%) ou três (3/9; 33,3%) vezes, a intervalos de 24 horas.

Diferentemente, Pace e Sullivan (1975) observaram que as taxas de concepção 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.

O efeito do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen asinino diluído e resfriado à 5°C, por 12 horas de armazenamento, foi estudado por Rossi *et al.* (2012), ao utilizarem o sêmen de cinco jumentos da raça Pêga e 195 ciclos de 140 éguas. As inseminações foram realizadas quando da detecção de um folículo com diâmetro de 3,0 a 3,5cm de diâmetro, sendo o sêmen depositado no corpo do útero. As éguas foram agrupadas segundo o número de inseminações realizadas por ciclo em: uma inseminação, duas inseminações e três ou mais inseminações, sendo as doses inseminantes, de 20mL com  $400 \times 10^6$  espermatozoides móveis, resfriadas à 5°C por 12 horas de armazenamento, em contêiner especial. A redução do número de inseminações, no presente trabalho, não causou prejuízos à fertilidade, já que a taxa de gestação, com apenas uma inseminação foi de 47,69% (31/65), similar às obtidas com duas inseminações, de 55,56% (45/81) e com três ou mais inseminações, de 42,86% (21/49), que também não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si.

Ao utilizarem o sêmen congelado asinino para inseminar jumentas, a partir de um folículo  $\geq 30$ mm, Trimeche *et al.* (1998) inseminou as fêmeas uma vez por dia até a ovulação. A dose inseminante continha  $600 \times 10^6$  espermatozoides (20 palhetas), com pelo menos, 35% de motilidade total. Neste estudo, obteve-se uma taxa de gestação de até 62% (8/13).

Castejon (2005) utilizou o sêmen congelado asinino, da raça Zamorano-Leonés, para a inseminação de jumentas da mesma raça. Neste estudo, utilizou uma única inseminação, 24 horas após a indução da ovulação pela administração da hCG, sendo a dose inseminante utilizada de  $500 \times 10^6$  espermatozoides móveis. Obteve-se apenas uma gestação em 18 ciclos reprodutivos de seis jumentas (5,5% - 1/18).

Ao utilizarem o sêmen congelado asinino para inseminar 28 éguas, Jepsen *et al.* (2010) utilizaram duas inseminações por ciclo (6 horas pré e 6 horas pós-ovulação). Neste estudo, utilizou-se uma dose inseminante de  $300 \times 10^6$  espermatozoides móveis, depositados no corpo do útero, quando obteve-se taxas de gestação de até 58,3% (14/24), ao longo de cinco estações reprodutivas.

É possível afirmar que apenas uma inseminação é capaz de produzir taxa de gestação aceitável comercialmente, similarmente às obtidas com múltiplas inseminações, desde que, seja realizada de 24 horas pré até 12 horas após a ovulação. Quando se utiliza o sêmen resfriado ou congelado, preconiza-se que a inseminação deveria ocorrer de 12 horas pré até 12 horas após a ovulação (Sieme *et al.*, 2003).

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1. Localização e condições climáticas

O experimento foi conduzido na Fazenda do Váú, localizada no município de Lagoa Dourada, Estado de Minas Gerais, Brasil. Distanto de Belo Horizonte 150 km, situa-se a 20° 54' 50'' de latitude S e 44° 4' 40'' de longitude W. Gr., em uma altitude média de 1124 metros e 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 Tab 4.1, foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). O experimento foi realizado no período de novembro de 2013 a março de 2014, representando a estação de monta fisiológica de reprodução dos equídeos na região (Rossi, 2008). Entretanto, o período pré-experimental foi realizado na Escola de Veterinária da UFMG, nos meses de junho, julho, agosto, setembro e outubro de 2013.

Tabela 4.1. Dados meteorológicos médios do período experimental

Período (mês/ano)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Precipitação (mm/mês)
Out/13	25,8	14,7	95,4
Nov/13	27,0	16,0	261,2
Dez/13	27,9	18,1	273,0
Jan/14	-	-	248,0
Fev/14	29,1	16,8	46,0
Mar/14	28,2	17,2	116,2

Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) / Fazenda Santa Edwiges

### 4.2. Delineamento experimental

#### 4.2.1. Efeito de dois diluidores de sêmen sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga

Foram utilizadas 34 fêmeas equinas distribuídas ao acaso, após o seu agrupamento por idade e categoria reprodutiva, em um esquema fatorial 2x2, compreendendo o sêmen congelado de dois reprodutores asininos diluído em dois diluidores e sua deposição no corpo do útero (CU), como a seguir:

- Tratamento I: éguas inseminadas após a detecção da ovulação com o sêmen congelado de dois jumentos da raça Pêga, diluído no diluidor de leite em pó desnatado-glicose (LPDG)- gema de ovo- etilenoglicol<sup>1</sup> (Jepsen, 2010), à uma concentração de  $1 \times 10^9$  espermatozoides móveis pré - congelamento/dose inseminante de 5mL, com deposição do sêmen no corpo do útero (n=16);

-Tratamento II: éguas inseminadas após a detecção da ovulação com sêmen congelado de dois jumentos da raça Pêga, diluído no diluidor PIVO-2013, à uma concentração de  $1 \times 10^9$  espermatozoides móveis pré - congelamento/dose inseminante de 5mL, com deposição do sêmen no corpo do útero (n=18).

A distribuição das fêmeas equinas por reprodutor e diluidor está apresentada na Tabela 4.2.

<sup>1</sup> Sigma - Aldrich

Tabela 4.2. Distribuição das fêmeas equinas por reprodutor e diluidor

Reprodutor	Diluidor	
	DI <sup>a</sup>	DII <sup>b</sup>
1	8	9
2	8	9
Total	16	18

<sup>a</sup>Diluidor de leite em pó desnatado-glicose (LPDG) - gema de ovo-etilenoglicol (Jepsen, 2010).

<sup>b</sup>Diluidor PIVO (Silva Filho, 2013).

Nas tabelas 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 estão apresentadas as distribuições dos ciclos das éguas por jumento e tratamento, considerando-se as variáveis categoria reprodutiva e idade das éguas.

Tabela 4.3. Distribuição percentual dos ciclos estrais por jumento de acordo com a categoria reprodutiva das fêmeas equinas, independentemente do diluidor

Categoria reprodutiva	Jumento		Total
	1	2	
Potra (1)	2,56% (1/39) <sup>1</sup>	5,13% (2/39)	7,69% (3/39)
Égua solteira (2)	15,38% (6/39)	15,38% (6/39)	30,77% (12/39)
Égua parida (3)	28,21% (11/39)	23,08% (9/39)	51,28% (20/39)
Cio do potro (4)	7,69% (3/39)	2,56% (1/39)	10,26% (4/39)
Total	53,84% (21/39)	46,15% (18/39)	100,0% (39/39)

<sup>1</sup>Número observado/número total

Tabela 4.4. Distribuição percentual dos ciclos estrais por jumento, de acordo com a idade das fêmeas equinas, independentemente do diluidor

Idade das fêmeas	Jumentos		Total
	1	2	
Equinas			
2,5 a 5,0 anos	5,13% (2/39) <sup>1</sup>	5,13% (2/39)	10,26% (4/39)
6,0 a 10 anos	30,77% (12/39)	15,38% (6/39)	46,15% (18/39)
11 a 14 anos	12,82% (5/39)	25,64% (10/39)	38,46% (15/39)
≥ 15 anos	5,13% (2/39)	0,00% (0/39)	5,13% (2/39)
Total	53,85% (21/39)	46,15% (18/39)	100,0% (39/39)

<sup>1</sup>Número observado/número total

Tabela 4.5. Distribuição percentual dos ciclos estrais por diluidor, de acordo com a categoria reprodutiva das fêmeas equinas, independentemente do jumento

Categoria reprodutiva/ Diluidor	Diluidor		Total
	1	2	
Potra (1)	2,56% (1/39) <sup>1</sup>	5,13% (2/39)	7,69% (3/39)
Égua solteira (2)	15,39% (6/39)	15,39% (6/39)	30,77% (12/39)
Égua parida (3)	28,21% (11/39)	23,08% (9/39)	51,28% (20/39)
Cio do potro (4)	2,56% (1/39)	7,69% (3/39)	10,26% (4/39)
Total	48,72% (19/39)	51,28% (20/39)	100,0% 39/(39)

<sup>1</sup>Número observado/número total

Tabela 4.6. Distribuição percentual dos ciclos estrais por diluidor, de acordo com a idade das fêmeas equinas, independentemente do jumento

Idade das fêmeas equinas/ Diluidor	Diluidor		Total
	1	2	
2,5 a 5,0 anos	5,13% (2/39) <sup>1</sup>	5,13% (2/39)	10,26% (4/39)
6,0 a 10 anos	28,21% (11/39)	17,95% (7/39)	46,15% (18/39)
11 a 14 anos	17,95% (7/39)	20,51% (8/39)	38,46% (15/39)
≥ 15 anos	2,56% (1/39)	2,56% (1/39)	5,13% (2/39)
Total	53,85% (21/39)	46,15% (18/39)	100,0% (39/39)

<sup>1</sup>Número observado/número total

Tabela 4.7. Distribuição percentual dos ciclos estrais por diluidor e jumento, de acordo com a categoria reprodutiva das fêmeas equinas

Categoria reprodutiva/ Diluidor	Diluidor I		Diluidor II		Total
	Jumento				
	1	2	1	2	
Potra (1)	0,00% (0/39) <sup>1</sup>	2,56% (1/39)	2,56% (1/39)	2,56% (1/39)	7,69% (3/39)
Égua solteira (2)	7,69% (3/39)	7,69% (3/39)	7,69% (3/39)	7,69% (3/39)	30,77% (12/39)
Égua parida (3)	17,95% (7/39)	10,26% (4/39)	10,26% (4/39)	12,82% (5/39)	51,28% (20/39)
Cio do potro (4)	5,13% (2/39)	2,56% (1/39)	2,56% (1/39)	0,00% (0/39)	10,26% (4/39)
Total	30,77% (12/39)	23,08% (9/39)	23,08% (9/39)	23,08% (9/39)	100,0% (39/39)

<sup>1</sup>Número observado/número total

Tabela 4.8: Distribuição percentual dos ciclos estrais por diluidor e jumento, de acordo com a idade das fêmeas equinas.

Idade das fêmeas equinas/ Diluidor	Diluidor I		Diluidor II		Total
	Jumento		Jumento		
	1	2	1	2	
2,5 – 5,0 anos	2,56% (1/39) <sup>1</sup>	2,56% (1/39)	2,56% (1/39)	2,56% (1/39)	10,26% (4/39)
6,0 – 10 anos	20,51% (8/39)	7,69% (3/39)	10,26% (4/39)	7,69% (3/39)	46,15% (18/39)
11 a 14 anos	5,13% (2/39)	12,82% (5/39)	7,69% (3/39)	12,82% (5/39)	38,46% (15/39)
≥ 15 anos	2,56% (1/39)	0,00% (0/39)	2,56% (1/39)	0,00% (0/39)	5,13% (2/39)
<b>Total</b>	<b>30,77% (12/39)</b>	<b>23,08% (9/39)</b>	<b>23,08% (9/39)</b>	<b>23,08% (9/39)</b>	<b>100,0% (39/39)</b>

<sup>1</sup>Número observado/número total

#### 4.2.2 Manejo reprodutivo e nutricional das éguas

Foram utilizados 39 ciclos de 34 potras e éguas sem raça definida de 2,5 a 16 anos de idade, distribuídas de forma inteiramente ao acaso, utilizando-se sorteio após o agrupamento por idade e categoria reprodutiva (potra, égua solteira, parida ou no “cio do potro”). As fêmeas foram submetidas, no início da estação de monta, a um exame ginecológico constituído de avaliação da conformação da genitália externa, palpação transretal do sistema genital e avaliação ultrasonográfica<sup>2</sup> dos ovários e do útero.

Durante a estação de monta, o manejo reprodutivo das fêmeas equinas obedeceu ao organograma de controle reprodutivo, apresentado na Figura 4.1.

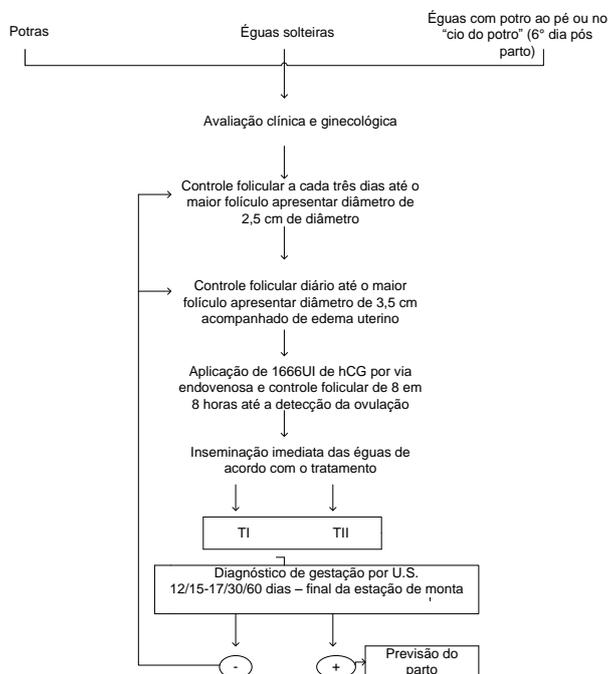


Figura 4.1. Organograma para o controle reprodutivo das éguas

<sup>2</sup> Ultra-som Modelo DP2200, probe 7,5mHz (Mindray)

Segundo o organograma as fêmeas equinas foram palpadas e submetidas a exames ultrassonográficos a cada três dias, até a detecção em um dos ovários, de um folículo com 2,5cm de diâmetro. A partir daí o controle folicular foi realizado diariamente até a detecção de um folículo dominante de 3,5cm de diâmetro em um dos ovários, na presença de edema uterino intramural.

Na presença de um folículo com diâmetro igual ou superior a 3,5cm, associado à presença de edema uterino, aplicava-se 1666 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG<sup>3</sup>) como agente indutor da ovulação, por via endovenosa, sendo o controle folicular realizado a partir desse momento de oito em oito horas até a detecção da ovulação. Foi estabelecida uma classificação subjetiva (1-3) para o edema uterino das éguas utilizadas neste experimento, onde o grau 1 correspondeu à presença de discreto edema uterino e o grau 3, ao edema uterino máximo (Rocha, 2012).

Imediatamente após a detecção das ovulações, as fêmeas equinas foram inseminadas de acordo com o tratamento ao qual pertenciam, como descrito no item 4.2. (Delineamento Experimental).

Além da hCG, durante a estação de monta utilizou-se a prostaglandina sintética como auxiliar no controle reprodutivo. Assim, as éguas que apresentavam corpo lúteo em um dos ovários, detectado por ultrassonografia, no início do acompanhamento reprodutivo ou após o diagnóstico de gestação negativo, receberam 1,5mL de prostaglandina sintética (d-cloprostenol<sup>4</sup>) por via intramuscular.

Éguas que apresentavam acúmulo de fluido intrauterino durante o acompanhamento reprodutivo ultrassonográfico receberam uma dose de 10 U.I (1,0mL) de ocitocina<sup>5</sup> por via intramuscular (IM) associada a 1,5mL de prostaglandina sintética (d-cloprostenol) por via IM e 1,5g (15mL) de enrofloxacin<sup>6</sup> por via IM durante cinco dias.

Para o diagnóstico de gestação, as fêmeas foram examinadas por palpções trans-retais e/ou por exames ultra-sonográficos a partir do 12º dia pós ovulação, que foram repetidos nas éguas gestantes aos 15-17, 30 e aos 60 dias pós ovulação, bem como ao final da estação de monta (Fig. 4.2). As anotações foram realizadas em ficha própria (Fig. 4.8).

As éguas foram mantidas a pasto durante todo o período experimental, sendo o capim gordura a gramínea predominante (*Melinis minutiflora*), embora existissem outras espécies forrageiras consorciadas, como as cultivares Tanzânia, Mombaça e Atlas (*Panicum Maximum*), o capim Jaraguá (*Hiparrhenia rufa*) e o capim Humidícola (*Brachiara humidicola*), sendo o fornecimento de água e sal mineralizado *ad libitum*.

#### 4.2.3. Manejo reprodutivo e nutricional dos reprodutores

Foram utilizados dois jumentos da raça Pêga com idades de 6 (J2) e 7 (J1) anos, com fertilidade conhecida, segundo dados obtidos de estações de monta anteriores.

---

<sup>3</sup> Vetecor® - Hertape Calier

<sup>4</sup> Veteglan® - Hertape Calier Saúde Animal

<sup>5</sup> Forte UCB®

<sup>6</sup> Zelotril 10%®(Agener União)

Antes do início da estação de monta, os reprodutores foram submetidos a exame andrológico, compreendendo a avaliação da condição externa do animal, seguida por avaliação física e morfológica do sêmen (cor, aspecto, motilidade, vigor, concentração, morfologia espermática).

Os jumentos foram mantidos em baias individuais de alvenaria, com área de 16m<sup>2</sup> e piso de cimento e cama de palha seca, sendo soltos de forma alternada em um piquete durante o período do dia.

Cada reprodutor, recebeu, diariamente 20 kg de capim elefante picado (*Pennisetum purpureum*), distribuídos duas vezes ao dia, 4 kg de ração farelada produzida na própria fazenda (Tab. 4.9), sal mineralizado<sup>7</sup> e água *ad libitum*.

Tabela 4.9. Composição da ração fornecida aos reprodutores

Componentes	Quantidade (kg)
Rolão de milho	75,0
Farelo de soja	25,0
Sal mineralizado	2,0
Calcário calcítico	4,0

#### 4.2.4. Diluidores utilizados

Foram utilizados três diluidores, sendo um para centrifugação e os outros dois para o resfriamento e congelamento, do sêmen estando a composição de cada diluidor apresentada na Tabela 4.10.

Os diluidores foram preparados na semana da coleta e estocados em recipientes estéreis com capacidade para 50mL, aproximadamente, permanecendo congelados em freezer. No dia da coleta e após o seu descongelamento adicionava-se 5,0% de gema de ovo de galinha aos diluidores Jepsen (2010) e Silva Filho (2013). Para a separação da gema, os ovos eram lavados e desinfetados com álcool, antes de serem quebrados (Fig. 4.3 A e B). Parte da clara foi descartada na quebra dos ovos, sendo o restante eliminado pela passagem da gema em papel filtro<sup>8</sup> qualitativo (Fig. 4.3 C). Após a retirada de toda a clara, a gema foi então rompida e misturada ao diluidor, no percentual desejado (Fig. 4.3 D).

<sup>7</sup> Sal mineral - Matsuda

<sup>8</sup> Qualy®

Tabela 4.10. Composição dos diluidores utilizados no experimento

Ingredientes	DILUIDORES		
	LPDG <sup>a</sup>	LPDG - gema de ovo-etileno-glicol <sup>b</sup>	PIVO <sup>c</sup>
Leite em pó desnatado (g)	2,4	2,4	2,4
Lactose (g)	-	-	5,5
Glicose (g)	4,9	4,9	1,5
EDTA dissódico (g)	-	-	0,0925
Citrato de sódio dihidratado (g)	-	-	0,0925
Etileno-glicol (mL)	-	2,0	1,4
Gema de ovo (mL)	-	5,0	5,0
Penicilina G Potássica (UI)	50.000	50.000	50.000
Água (q.s.p) <sup>d</sup>	100	100	100
pH	6,63	6,62	6,2
Osmolaridade	351	669	619

<sup>a</sup> LPDG – Kenney *et al*, 1983; <sup>b</sup> LPDG – gema de ovo – etilenoglicol – Jepsen, 2007.

<sup>c</sup> PIVO – Silva Filho, 2013; <sup>d</sup> Água mili-Q autoclavada.

#### 4.2.5. Coleta de sêmen

As coletas foram realizadas dentro de um galpão coberto por telha de barro, protegidas do sol e da chuva. Para tal, utilizaram-se jumentas ou éguas no cio, segundo a preferência de cada reprodutor, imobilizadas em tronco de contenção. As coletas foram realizadas às segundas e quintas-feiras ou às terças e sextas-feiras, no período da manhã, segundo as recomendações da literatura (Pickett e Amann, 1993). O tronco especial de contenção foi idealizado para a realização de montas naturais envolvendo jumentos e éguas. Na região posterior do tronco, construiu-se uma rampa de alvenaria, que permitia o posicionamento do jumento em uma altura superior à da égua, de forma a facilitar à monta natural e/ou a colheita do sêmen (Fig. 4.4 A e B). O piso de cimento da rampa, próximo aos membros posteriores da égua, era coberto por cama de baía, antes das coletas de sêmen, de forma a propiciar maior estabilidade aos reprodutores durante as mesmas.

Para a coleta do sêmen utilizou-se uma vagina artificial modelo Hannover (Fig. 4.4 C e D). Após a sua montagem, incluindo o tubo rígido e a camisa de látex, utilizou-se uma luva<sup>9</sup> de palpação transretal, internamente à vagina, com extremidade distal (mão) cortada, de forma a evitar o contato do sêmen com a camisa de látex. Desta forma, a extremidade anterior e o interior da vagina ficavam cobertos pela luva plástica de palpação retal, na qual era fixada, na sua extremidade posterior, uma mamadeira com uma tampa larga vazada. Por dentro da mamadeira, colocava-se um saco plástico estéril (mamadeira descartável de bebê<sup>10</sup>) graduado, com capacidade de 250mL. Finalmente, acoplava-se na tampa da mamadeira um filtro descartável de colheita de sêmen suíno<sup>11</sup>, utilizado para reter a fração gelatinosa do sêmen. Antes da colheita do sêmen, a vagina artificial era preenchida com água à temperatura de 50°C. Em seguida, lubrificava-se o seu interior com gel à base de água (gel KY<sup>12</sup>), quando eliminava-se o excesso de água do interior da vagina artificial, antes da colheita do sêmen.

<sup>9</sup> TNB Brasil

<sup>10</sup> Playtex , Parent's Choice - Bottle Liners

<sup>11</sup> Filtro descartável® - Minitub

<sup>12</sup> KY gel lubrificante - Johnson & Johnson

#### 4.2.6. Avaliação física, pré-diluição, resfriamento e diluição final

Após a coleta, o sêmen era levado ao laboratório e avaliado quanto à sua cor e aspecto. Para tal, retirava-se o saco plástico da mamadeira descartável e imediatamente o colocava em banho-maria, a 37°C, para evitar choque térmico (Fig. 4.5A). Amostras para concentração e morfologia espermáticas eram retiradas neste momento. Para o cálculo da concentração espermática, um volume de 50 µl de sêmen era retirado com auxílio de um pipetador automático, com ponteira descartável e, diluído em 5mL de solução formol salina tamponada (1:100). O cálculo dessa concentração era realizado ao final do processamento do sêmen, após o término do congelamento.

Para avaliação da motilidade e vigor, colocava-se uma gota de sêmen, entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas em mesa aquecedora à 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%), utilizando-se para a avaliação do vigor espermático, 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.

Para o congelamento do sêmen utilizou-se o protocolo descrito a seguir, estando um esquema do mesmo apresentado na Figura 4.6.

Após a coleta das amostras para avaliação da concentração e morfologia espermáticas, o sêmen era submetido à uma diluição 2:1, com diluidor LPDG, à 37°C. O sêmen diluído era dividido em dois ou mais tubos Falcon (Fig. 4.5B) que eram, então, transferidos para uma centrifuga refrigerada à 23°C. A seguir, o sêmen era centrifugado a 1700 rpm (592 x g) por 10 minutos (Fig. 4.5C). Após o término da centrifugação, aspirava-se o sobrenadante (plasma + diluidor), de cada tubo (Fig. 4.5D). Após a aspiração, ressuspensava-se os “pellets” da metade dos tubos, utilizando-se uma taxa de diluição 1:1, em diluidor LPDG - gema de ovo-etileno-glicol (Jepsen, 2007) e a outra metade em diluidor PIVO (Silva Filho, 2013). Para o cálculo da concentração espermática, utilizou-se volume de 20 µl de sêmen centrifugado (pellet + diluidor), com auxílio de pipetador automático, com ponteira descartável, a ser diluído em 8mL de solução formol salina tamponada (1:400). Após homogeneização da solução, a câmara hemocitométrica (câmara de Neubauer) era preenchida com o uso de um tubo capilar, permanecendo em repouso, por cinco minutos, antes de se iniciar a contagem dos espermatozoides (Fig. 4.5E).

Após o cálculo da concentração espermática por meio da contagem celular em câmara de Neubauer, realizava-se a correção das duas alíquotas para a diluição pretendida, ou seja, para uma concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozoides móveis por 0,5mL de sêmen diluído. Assim, a quantidade restante dos diluidores propostos por Jepsen (2007) e Silva Filho (2013) eram adicionados a cada alíquota, após o cálculo da concentração e determinação do volume de diluidor a ser acrescentado a cada uma, previamente diluídas a uma razão aproximada de 1:1.

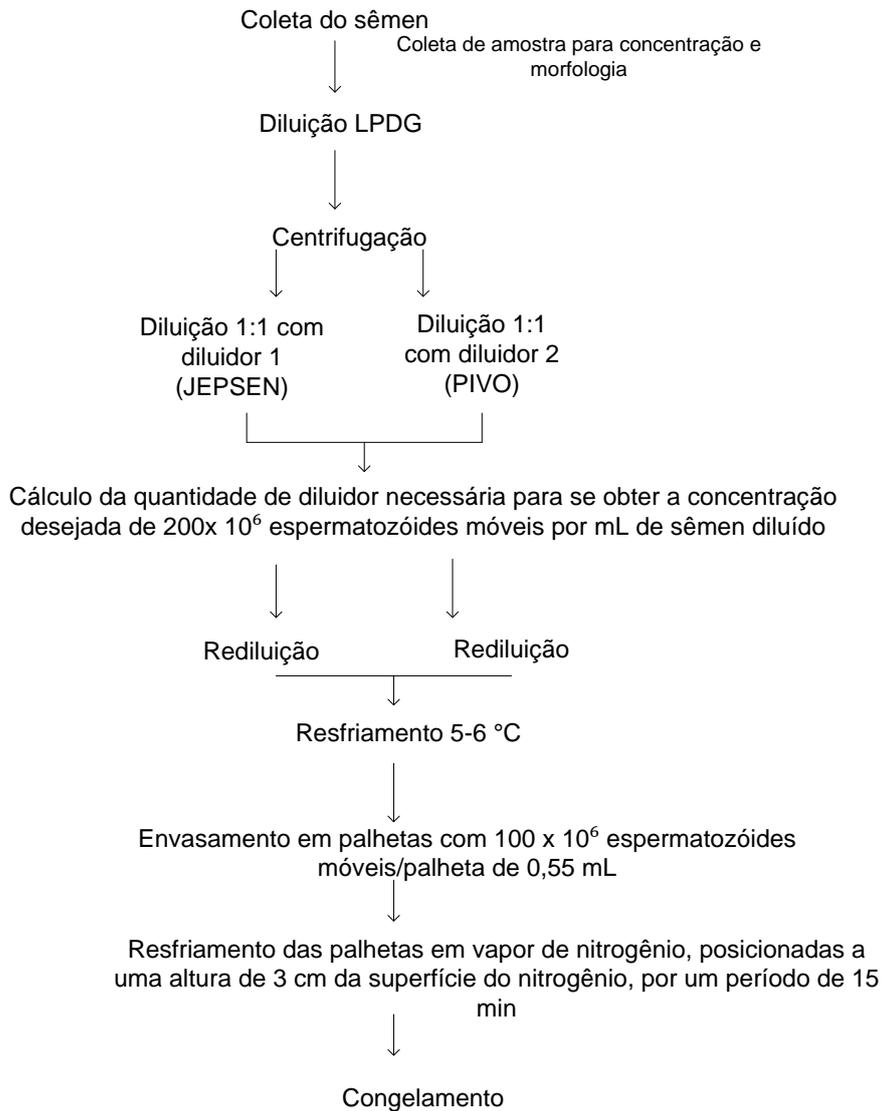


Figura 4.6. Protocolo para o congelamento de sêmen

Após a diluição final, os tubos com o sêmen eram transferidos para um Becker contendo 500mL de água à 24°C, transferido rapidamente para um balcão refrigerador horizontal<sup>13</sup>, regulado para uma temperatura de 5 -6°C. Este balcão possuía 1,5 metros de comprimento, 70cm de largura e 75cm de altura, sendo completamente fechado nas laterais e na parte posterior. Na parte frontal, era fechado por duas portas de vidro que se movimentavam lateralmente, cada uma das quais possuindo duas aberturas circulares com tampa, com 14cm de diâmetro, o que permitia a manipulação do sêmen em seu interior sem a abertura das portas, de forma a evitar uma elevação indesejável da temperatura em seu interior (Fig. 4.5 F). O recipiente contendo os tubos de sêmen diluído permaneciam no interior do balcão, até o envasamento do sêmen, pré-congelamento.

<sup>13</sup>Maquinox®

Quando o sêmen diluído atingia a temperatura de 5-6°C, no interior do balcão, realizava-se o seu envasamento em palhetas de 0,55mL, cada uma contendo  $100 \times 10^6$  espermatozoides móveis, pré-congelamento.

#### 4.2.7. Envasamento do sêmen em palhetas

Para o envasamento do sêmen em palhetas de 0,55mL<sup>14</sup> utilizou-se uma bomba de vácuo<sup>15</sup> apropriada, acoplada a uma mangueira plástica longa, adaptada a um sistema de envasamento com capacidade de envasar quinze palhetas de cada vez. Assim, a bomba era ativada quando as extremidades das palhetas entravam em contato direto com o sêmen no Becker, de forma a preenchê-las até que o sêmen diluído entrasse em contato com o lacre, presente em suas extremidades opostas. Após o envasamento do sêmen, as palhetas eram lacradas com esferas metálicas armazenadas em uma placa de petri, dentro do balcão refrigerador. A seguir, as palhetas eram colocadas em bandejas de tela metálica (Fig. 4.7A). Estas bandejas possuíam 35cm de comprimento e 25,5cm de largura, sendo o centro constituído por tela metálica. A bandeja inferior possuía duas alças nas laterais que permitiam o seu encaixe em duas armações metálicas, em forma de degraus e acopladas nas laterais da caixa de congelamento. Por outro lado, a bandeja superior encaixa-se na inferior, possuindo duas alças nas extremidades, para facilitar a sua manipulação (Fig. 4.7B). Todo o procedimento de envase e colocação das palhetas nas bandejas era realizado dentro do balcão refrigerador, quando procurava-se manter uma temperatura entre 5 – 6°C.

#### 4.2.8. Congelamento, descongelamento e avaliação do sêmen

Para o congelamento do sêmen utilizou-se uma caixa de isopor com 30,5cm de largura, 39,5cm de comprimento e 34cm de altura (Fig. 4.7 C). Essa caixa possuía duas estruturas metálicas, na sua face superior interna, acopladas às suas laterais, em forma de sete pequenos degraus, com um cm de distância entre eles, de forma a permitir o encaixe das bandejas que abrigavam as palhetas. Tal sistema permitia a manutenção das doses a diferentes distâncias do nitrogênio líquido e, assim, a utilização de diferentes curvas de congelamento. No presente experimento, as bandejas eram posicionadas a uma altura de 3cm da superfície do nitrogênio líquido, por um período de 15 minutos, para a realização do pré congelamento. À seguir, eram mergulhadas diretamente em uma lâmina de quatro cm de nitrogênio líquido. Terminado o congelamento, as palhetas eram transferidas utilizando-se uma pinça metálica para um botijão contendo nitrogênio líquido, onde ficavam armazenadas, até o descongelamento e avaliação física, acompanhadas ou não pela inseminação artificial (Fig. 4.7 D e E).

As palhetas eram descongeladas diretamente no banho-maria a uma temperatura de 37°C por 30 segundos, sendo secas com papel toalha (Fig. 4.7 F e G). A seguir, as extremidades das mesmas, fechadas com esferas, eram cortadas com o auxílio de uma tesoura, sendo o sêmen transferido para um saquinho plástico, após o corte da outra extremidade (Fig. 4.7 H e I).

As avaliações do sêmen pós-descongelamento foram realizadas ao final do processo, considerando-se os parâmetros de motilidade, vigor e morfologia espermática. À medida que as

---

<sup>14</sup> IMV ®

<sup>15</sup> Dia-Pump® Compressor Modelo C – FANEM LTDA®

amostras eram descongeladas, colocava-se uma gota entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas em mesa aquecedora a 37°C e imediatamente submetidas à avaliação microscópica de campo claro, com aumento de 100X e 400X, visando-se avaliar a motilidade e vigor espermáticos. Todas as amostras passaram por avaliações de duas médicas veterinárias envolvidas no experimento. As amostras para morfologia foram coletadas e armazenadas em tubos endorff contendo 1mL de solução formol salina.

Os dados de todas as coletas realizadas duas vezes por semana (segundas e quintas-feiras ou terças e sextas-feiras) foram registrados em fichas individuais (Fig. 4.9), 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.

#### 4.2.9 Sincronização, indução e controle da ovulação, inseminação artificial e controle da gestação

##### 4.2.9.1 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 2,5cm de diâmetro em um dos ovários. A partir daí, as palpações passaram a ser diárias. No caso da detecção de um corpo lúteo (CL) em um dos ovários e ausência de edema uterino intramural, 1,5mL de prostaglandina intramuscular era administrado. 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.

##### 4.2.9.2 Controle da ovulação

Ao ser detectado um folículo dominante com no mínimo 3,5cm de diâmetro e presença de edema uterino intramural, a égua em questão recebia em torno de 1.666 UI de hCG endovenosa às 06:00, 14:00 ou às 22:00 horas do mesmo dia, a fim de se induzir a ovulação. Foi estabelecida uma classificação subjetiva (1-3) para o edema uterino das éguas utilizadas neste experimento, onde o grau 1 correspondeu à presença de discreto edema uterino intramural e o grau 3, ao edema uterino intramural máximo (Rocha, 2012). Após a aplicação da hCG as éguas eram submetidas a palpação transretal à intervalos de oito em oito horas ( 6:00 horas, 14:00 horas e às 22:00 horas), seguida de exame ultrassonográfico (Fig. 4.10). Quando da detecção da ovulação, submetia-se a égua a uma inseminação, de acordo com o tratamento a qual pertencia, de forma que cada égua recebeu, apenas, uma inseminação artificial pós ovulação.

##### 4.2.9.3. Inseminação artificial

Para a inseminação das éguas, descongelou-se uma media de  $10,51 \pm 0,18$  palhetas (variação: 10 a 16 palhetas) de 0,55mL de cada vez, de forma que a dose inseminante tinha sempre um volume fixo de 5mL e uma concentração média de  $319,23 \pm 3,95$  de espermatozoides móveis/dose (variação: 300 a  $350 \times 10^6$ ). Só foram utilizadas para as inseminações artificiais as

partidas apresentando uma motilidade média de  $31,92 \pm 0,39\%$  (variação: 30 - 35%) e vigor médio de  $3,91 \pm 0,06$  (variação: 3,50 - 4,50).

Antes da inseminação, a vulva da égua era higienizada com sabão neutro e água, sendo seca com papel toalha (Fig. 4.7 J). Após o descongelamento das palhetas (média  $10,51 \pm 0,18$ ), o volume era acondicionado em um saco plástico, sendo a dose inseminante de 5mL aspirada em uma seringa estéril de igual capacidade. A seguir, essa seringa era acoplada à pipeta de inseminação. A inseminação era realizada por via intravaginal profunda, com pipeta rígida apropriada<sup>16</sup>, guiada pelo braço, protegido com uma luva descartável<sup>17</sup>, através da cavidade vaginal, passando pelo cérvix, sendo o sêmen depositado no corpo do útero (Fig. 4.7 K). Após a deposição do sêmen no corpo do útero, 5mL de ar eram aplicados na pipeta de inseminação utilizando-se a mesma seringa, visando-se eliminar o sêmen residual em direção ao útero da égua. Em seguida, retirava-se a mão com a pipeta protegida, e realizava-se massagem do clitóris. A pipeta era imediatamente levada ao laboratório, para avaliar uma gota residual do sêmen, presente em seu interior. A hora da inseminação de cada égua era imediatamente anotada em fixa própria (Fig. 4.8).

### 4.3. Análises estatísticas

Inicialmente as variáveis numéricas apresentadas nas tabelas 4.11 e 4.14, considerando-se o efeito do jumento, bem como as de números 4.17 e 4.18, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento, foram testadas quanto à normalidade pelo procedimento “Proc Univariate Normal” (SAS, 1997) e avaliadas quanto à probabilidade ( $p>0,05$ ) de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, pré-transformação e pós-transformação.

Variáveis com distribuição não paramétrica foram transformadas pelo  $\log(x+1)$ , sendo as proporcionais transformadas pelo  $\arcsen \sqrt{x}$ , antes de serem novamente submetidas ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Quando as variáveis transformadas continuaram apresentando padrão não paramétrico, foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon (duas Médias) ou pelo de Kruskal-Wallis (comparação de três médias).

Verifica-se na Tab. 4.11 que apenas as variáveis intervalo do final do resfriamento ao início do envase, intervalo do final do envase ao início do congelamento e tempo de envase/palheta não apresentaram distribuição normal, sendo assim submetidas ao teste de Wilcoxon (Tab. 4.12). Por apresentarem distribuição normal, as demais variáveis apresentadas nesta tabela foram submetidas ao teste "t" de Student (Tab. 4.13).

---

<sup>16</sup> Provar®

<sup>17</sup> Wal Mur®

Tabela 4.11. Teste de normalidade das variáveis brutas sem transformação, considerando-se o efeito do jumento

Variáveis avaliadas	Teste estatístico	Significância
Intervalo da coleta à diluição do sêmen (minutos)	Shapiro-Wilk	0,6636
Intervalo da diluição à centrifugação do sêmen (minutos)	Shapiro-Wilk	0,2402
Intervalo da coleta à centrifugação (minutos)	Shapiro-Wilk	0,1961
Intervalo da centrifugação à pré-rediluição (minutos)	Shapiro-Wilk	0,4881
Intervalo da pré-rediluição à diluição final (minutos)	Shapiro-Wilk	0,4174
Intervalo da coleta à pré-rediluição (minutos)	Shapiro-Wilk	0,5674
Intervalo coleta à rediluição (minutos)	Shapiro-Wilk	0,1456
Intervalo da diluição final ao início do resfriamento (minutos)	Shapiro-Wilk	0,2843
Intervalo do início ao final do resfriamento (minutos)	Shapiro-Wilk	0,8585
Intervalo da coleta ao início do resfriamento (minutos)	Shapiro-Wilk	0,1496
Intervalo da coleta ao final do resfriamento (minutos)	Shapiro-Wilk	0,4742
Intervalo do final do resfriamento ao início do envase (minutos)	Shapiro-Wilk	0,0242
Intervalo do início ao final do envase (minutos)	Shapiro-Wilk	0,1763
Intervalo da coleta ao início do envase (minutos)	Shapiro-Wilk	0,5178
Intervalo da coleta ao final do envase (minutos)	Shapiro-Wilk	0,2216
Intervalo do final do envase ao início do congelamento (minutos)	Shapiro-Wilk	0,0004
Intervalo da coleta ao início do congelamento (minutos)	Shapiro-Wilk	0,2736
Intervalo da coleta ao final do congelamento (minutos)	Shapiro-Wilk	0,2736
Tempo de envase/palheta (minutos)	Shapiro-Wilk	0,0051
Número de palhetas/ejaculado	Shapiro-Wilk	0,6711
Número de doses inseminantes/ejaculado	Shapiro-Wilk	0,6711
Número de éguas inseminadas	Shapiro-Wilk	0,9396

Tabela 4.12. Análises estatísticas envolvendo as variáveis não paramétricas, considerando-se o efeito do jumento

Variáveis avaliadas	Teste estatístico	Significância
Intervalo do final do resfriamento ao início do envase (minutos)	Wilcoxon	$p > 0,05$
Intervalo do final do envase ao início do congelamento (minutos)	Wilcoxon	$p > 0,05$
Tempo de envase/palheta (minutos)	Wilcoxon	$p > 0,05$

Tabela 4.13. Análises estatísticas envolvendo as variáveis com distribuição normal, considerando-se o efeito do jumento

Variáveis avaliadas	Teste estatístico	Significância
Intervalo da coleta à diluição do sêmen (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da diluição à centrifugação do sêmen (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da coleta à centrifugação (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da centrifugação à pré-rediluição (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da pré-rediluição à diluição final (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da coleta à pré-rediluição (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da coleta à rediluição (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da diluição final ao início do resfriamento (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo do início ao final do resfriamento (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da coleta ao início do resfriamento (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da coleta ao final do resfriamento (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo do início ao final do envase (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da coleta ao início do envase (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da coleta ao final do envase (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da coleta ao início do congelamento (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Intervalo da coleta ao final do congelamento (minutos)	Teste "t"	p > 0,05
Número de palhetas/ejaculado	Teste "t"	p > 0,05
Número de doses inseminantes/ejaculado	Teste "t"	p > 0,05
Número real de éguas inseminadas	Teste "t"	p > 0,05

No que se refere a Tab. 4.14, as variáveis número de montas/ejaculado, intervalo entre ejaculados, motilidade do sêmen fresco, motilidade espermática pós-diluição, número de tubos utilizados, perdas de espermatozoides no transcorrer da centrifugação, perdas de espermatozoides móveis no transcorrer da centrifugação, taxa de recuperação espermática e taxa de recuperação espermática real, não apresentaram distribuição normal, sendo assim submetidas ao teste de Wilcoxon (Tab. 4.15). As demais variáveis contantes desta tabela, por apresentarem distribuição normal foram submetidas ao test "t" de Student (Tab. 4.16).

Verifica-se, na Tab.4.17, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento, que nenhuma das variáveis analisadas apresentaram distribuição normal. Desta forma foram submetidas ao teste de Kruskal-wallis (Tab. 4.17).

Na tabela 4.18, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento, verificou-se que apenas as variáveis peso das éguas, intervalo do parto à ovulação e intervalo da detecção da ovulação à inseminação artificial apresentaram distribuição normal. Assim, estas variáveis foram submetidas a um modelo (Tab. 4.19), contemplando o efeito do diluidor e do jumento, bem como as suas interações por meio do PROCGLM (Tab.s 4.22 e 4.24). As demais variáveis, contantes da Tab. 4.18, por não apresentarem uma distribuição normal, foram avaliadas pelo teste de Kruskal-wallis, quando considerou-se o efeito do diluidor e do jumento (Tab. 4.20) ou pelo de Wilcoxon, quando avaliou-se o efeito do diluidor, independentemente do jumento (Tab. 4.22) ou do jumento, independentemente do diluidor (Tab. 4.24).

As variáveis proporcionais incluindo as taxas de gestação/ciclo, a distribuição das fêmeas por categoria reprodutiva, distribuição das ovulações ao longo do dia e percentual de éguas tratadas durante o ciclo estral, considerando-se as avaliações por diluidor e jumento, por diluidor independentemente do jumento e por jumento, independentemente do diluidor foram avaliadas pelo teste de dispersão da frequência ( $X^2$ ) (Tab.s 4.21, 4.22 e 4.24, respectivamente).

Todas as análises foram realizadas pelo programa Statistical Analyses Systems (SAS, 1997), após tabulação, considerando-se a probabilidade de 95% ( $p < 0,05$ ) para significância.

Tabela 4.14. Teste de normalidade das variáveis brutas sem transformação, considerando-se o efeito do jumento

Variáveis analisadas	Teste estatístico utilizado	Significância
<i>Comportamento sexual</i>		
Número de montas/ejaculado	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0001
Intervalo entre ejaculados (dias)	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0053
<i>Características do sêmen fresco</i>		
Volume do sêmen (mL)	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,3356
Motilidade (0-100%)	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0001
Vigor (0-5)	Shapiro-Wilk	-
Número de espermatozoides/mL ( $\times 10^6$ )	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,3181
Número de espermatozoides móveis/mL ( $\times 10^6$ )	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,2434
Número de espermatozoides totais/ejaculado ( $\times 10^6$ )	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,8041
Número de espermatozoides móveis/ejaculado ( $\times 10^6$ )	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,7812
Volume de diluidor LPDG (mL)	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,3356
Volume de sêmen + diluidor (mL)	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,3356
Motilidade espermática pós-diluição (%)	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0001
Vigor pós-diluição (0-5)	Shapiro-Wilk	-
<i>Características da centrifugação e do sêmen centrifugado</i>		
Volume do sêmen/tubo centrífuga (real) (mL)	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,1047
Número de tubos utilizados	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0148
Perda de volume (mL)	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,2191
Volume do sêmen pós-centrifugação (mL)	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,4437
Volume de sêmen + diluidor no tubo de centrífuga	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,9030
Número de espermatozoides por mL	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,2376
Número de espermatozoides móveis/mL	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,2331
Número total de espermatozoides ( $\times 10^6$ )	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,8574
Número total de espermatozoides móveis ( $\times 10^6$ )	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,8696
Perdas de espermatozoides no transcorrer da centrifugação ( $\times 10^6$ )	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0003
Perdas de espermatozoides móveis no transcorrer da centrifugação ( $\times 10^6$ )	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0003
Taxa de recuperação espermática (%)	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0273
Taxa de recuperação espermática real (%)	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0469

Tabela 4.15. Análises estatísticas envolvendo as variáveis não paramétricas, considerando-se o efeito do jumento

Variáveis analisadas	Teste estatístico utilizado	Significância
Número de montas/ejaculado	Wilcoxon	$p > 0,05$
Intervalo entre ejaculados	Wilcoxon	$p > 0,05$
Motilidade do sêmen fresco (%)	Wilcoxon	$p > 0,05$
Motilidade do sêmen fresco pós-diluição (%)	Wilcoxon	$p > 0,05$
Número de tubos utilizados/centrifugação	Wilcoxon	$p > 0,05$
Perdas de espermatozoides no transcorrer da centrifugação (%)	Wilcoxon	$p > 0,05$
Perdas de espermatozoides móveis no transcorrer da centrifugação (%)	Wilcoxon	$p > 0,05$
Taxa de recuperação espermática (%)	Wilcoxon	$p > 0,05$
Taxa de recuperação espermática real (%)	Wilcoxon	$p > 0,05$

Tabela 4.16. Análises estatísticas envolvendo as variáveis com distribuição normal, considerando-se o efeito do jumento

Variáveis analisadas	Teste estatístico utilizado	Significância
<i>Características do sêmen fresco</i>		
Volume de sêmen (mL)	Teste “t” de Student	p > 0,05
Número de espermatozoides/mL (x10 <sup>6</sup> )	Teste “t” de Student	p < 0,05
Número de espermatozoides móveis/mL (x10 <sup>6</sup> )	Teste “t” de Student	p < 0,05
Número de espermatozoides totais/ejaculado (x10 <sup>6</sup> )	Teste “t” de Student	p > 0,05
Número de espermatozoides móveis/ejaculado (x10 <sup>6</sup> )	Teste “t” de Student	p > 0,05
Volume de diluidor LPDG (mL)	Teste “t” de Student	p > 0,05
Volume de sêmen + diluidor (mL)	Teste “t” de Student	p > 0,05
<i>Características da centrifugação e do sêmen centrifugado</i>		
Volume de sêmen/tubo centrifuga (real) (mL)	Teste “t” de Student	p > 0,05
Perda de volume (mL)	Teste “t” de Student	p > 0,05
Volume de sêmen pós-centrifugação (mL)	Teste “t” de Student	p > 0,05
Número de espermatozoides por mL	Teste “t” de Student	p < 0,05
Número de espermatozoides móveis por mL	Teste “t” de Student	p < 0,05
Número total de espermatozoides (x10 <sup>6</sup> )	Teste “t” de Student	p < 0,05
Número total de espermatozoides móveis (x10 <sup>6</sup> )	Teste “t” de Student	p < 0,05

Tabela 4.17. Análises estatísticas de características físicas do sêmen de jumentos da raça Pêga, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento, após a centrifugação e o descongelamento

Variáveis	Teste de normalidade pré-transformação		Teste de normalidade pós-transformação		Comparação entre as médias	
	Teste	Significância	Significância	Teste	Significância	
Motilidade pós-centrifugação	Shapiro-Wilk	Pr < w0,0001	0,0001	Kruskal-Wallis	0,0250	
Motilidade pós-descongelamento	Shapiro-Wilk	Pr < w0,0001	0,0001	Kruskal-Wallis	0,2987	
Vigor pós-centrifugação	-	-	-	Kruskal-Wallis	0,0475	
Vigor pós-descongelamento	-	-	-	Kruskal-Wallis	0,0979	

Tabela 4.18. Teste de normalidade das variáveis brutas sem transformação e após transformação, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento

Variáveis	Teste Estatístico	Significância Pré-transformação	Significância Pós-transformação
Idade das éguas	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0299	0,0048
Peso das éguas	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,3550	–
Intervalo do parto à ovulação	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0953	–
Tamanho do folículo à indução	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0001	0,0002
Número de controles foliculares da indução à ovulação	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0001	0,0001
Tamanho do folículo no último controle folicular	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0016	0,0054
Intervalo da aplicação da hCG à ovulação	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0001	0,0001
Intervalo da aplicação da hCG à inseminação artificial	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0001	0,0001
Intervalo da detecção da ovulação à inseminação artificial	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0986	–
Motilidade do sêmen ao descongelamento	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0001	0,0001
Número de espermatozoides móveis/dose inseminante no momento da inseminação artificial	Shapiro-Wilk	Pr < w 0,0001	0,0001

Tabela 4.19. Análises estatísticas envolvendo as variáveis com distribuição normal, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento, bem como as interações

Variáveis	Teste estatístico	Significância	
Peso das éguas	Modelo	Tratamento	0,2077
		Jumento	0,0878
		Interação tratamento x jumento	0,6675
Intervalo do parto à ovulação	Modelo	Tratamento	0,2440
		Jumento	0,1612
		Interação tratamento x jumento	0,3759
Intervalo da detecção da ovulação à inseminação artificial	Modelo	Tratamento	0,7311
		Jumento	0,1540
		Interação tratamento x jumento	0,8103

Tabela 4.20. Análises estatísticas envolvendo as variáveis não paramétricas, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento

Variáveis	Teste estatístico	Significância
Idade das éguas	Kruskal-Wallis	0,6417
Escore da condição corporal	Kruskal-Wallis	0,9092
Tamanho do folículo à indução	Kruskal-Wallis	0,5910
Escore do edema uterino na indução	Kruskal-Wallis	0,0878
Número de controles foliculares da indução à ovulação	Kruskal-Wallis	0,1185
Tamanho do folículo no último controle folicular	Kruskal-Wallis	0,1036
Escore do edema uterino no último controle folicular	Kruskal-Wallis	0,0547
Intervalo da aplicação da hCG à ovulação	Kruskal-Wallis	0,4262
Intervalo da aplicação da hCG à inseminação artificial	Kruskal-Wallis	0,3993
Qualidade do sêmen à Inseminação artificial	Kruskal-Wallis	0,1386
Motilidade do sêmen ao descongelamento	Kruskal-Wallis	0,0026
Vigor ao descongelamento do sêmen	Kruskal-Wallis	0,0044
Número de espermatozoides móveis /dose inseminante no momento da inseminação artificial	Kruskal-Wallis	0,0026

Tabela 4.21. Análises estatísticas envolvendo as variáveis dicotômicas, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento

Variáveis	Teste estatístico	Significância
Distribuição das fêmeas equinas por categoria reprodutiva, diluidor e jumento	X <sup>2</sup>	0,9536
Distribuição das ovulações ao longo do dia por diluidor e jumento	X <sup>2</sup>	0,8227
Percentual de éguas submetidas à tratamento por diluidor e jumento	X <sup>2</sup>	0,4259
Taxa de concepção/ciclo por diluidor e jumento	X <sup>2</sup>	0,1288

Tabela 4.22. Análises estatísticas considerando-se o efeito do diluidor, independentemente do jumento

Variável	Teste estatístico	Significância
Idade das éguas	Wilcoxon	0,5000
Escore da condição corporal	Wilcoxon	0,3803
Tamanho do folículo a indução	Wilcoxon	0,3054
Escore do edema uterino na indução	Wilcoxon	0,3676
Número de controles foliculares da indução à ovulação	Wilcoxon	0,1472
Tamanho do folículo no último controle folicular	Wilcoxon	0,4139
Escore do edema uterino no último controle folicular	Wilcoxon	0,0707
Intervalo da aplicação da hCG à ovulação	Wilcoxon	0,2291
Intervalo da aplicação da hCG à inseminação artificial	Wilcoxon	0,2291
Qualidade do sêmen à inseminação artificial	Wilcoxon	0,1025
Escore do edema uterino no último controle folicular	Wilcoxon	0,0707
Peso corporal das éguas	Teste “t”	0,2733
Intervalo parto/ovulação	Teste “t”	0,2214
Intervalo da detecção da ovulação à inseminação artificial	Teste “t”	0,6169
Distribuição das fêmeas por categoria reprodutiva	X <sup>2</sup>	0,7267
Distribuição das ovulações ao longo do dia	X <sup>2</sup>	0,7186
Percentual de éguas submetidas à tratamento	X <sup>2</sup>	0,3029
Taxa de concepção/ciclo	X <sup>2</sup>	0,0422

Tabela 4.23. Características seminais e fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o efeito do diluidor, independentemente do jumento

Variáveis	Tratamentos	
	Diluidor 1	Diluidor2
Número de palhetas utilizadas/dose inseminante	10	10
Motilidade do sêmen ao descongelamento (%)	Significativo no teste não paramétrico. Não pode aglutinar os dados	
Vigor do sêmen ao descongelamento (0-5)	Significativo no teste não paramétrico. Não pode aglutinar os dados	
Número de espermatozoides móveis/dose inseminante no momento da inseminação artificial	Significativo no teste não paramétrico. Não pode aglutinar os dados	

Tabela 4.24. Análises estatísticas considerando-se o efeito do jumento, independentemente do diluidor

Variáveis	Teste estatístico	Valor
Idade das éguas	Wilcoxon	0,1360
Escore da condição corporal	Wilcoxon	0,5000
Tamanho do folículo à indução	Wilcoxon	0,1854
Escore do edema uterino na indução	Wilcoxon	0,0114
Número de controles foliculares da indução à ovulação	Wilcoxon	0,0198
Tamanho do folículo no último controle folicular	Wilcoxon	0,0074
Escore do edema uterino no último controle folicular	Wilcoxon	0,0100
Intervalo da aplicação da hCG à ovulação	Wilcoxon	0,0949
Intervalo da aplicação da hCG à inseminação artificial	Wilcoxon	0,0865
Qualidade do sêmen à inseminação artificial	Wilcoxon	0,0631
Peso corporal das éguas	Teste “t”	0,0958
Intervalo parto/ovulação	Teste “t”	0,1465
Intervalo da detecção da ovulação à inseminação artificial	Teste “t”	0,1154
Distribuição das fêmeas por categoria reprodutiva	X <sup>2</sup>	0,7267
Distribuição das ovulações ao longo do dia	X <sup>2</sup>	0,7186
Percentual de éguas submetidas à tratamentos	X <sup>2</sup>	0,3029
Taxa de concepção/ciclo	X <sup>2</sup>	0,1703

Tabela 4.25. Características seminais e fertilidade de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o efeito do jumento, independentemente do diluidor

Variáveis	Tratamentos	
	Jumento 1	Jumento 2
Número de palhetas utilizadas/dose inseminante	10	10
Motilidade do sêmen ao descongelamento (%)	Significativo no teste não paramétrico. Não pode aglutinar os dados	
Vigor do sêmen ao descongelamento (0-5)	Significativo no teste não paramétrico. Não pode aglutinar os dados	
Número de espermatozoides móveis/dose inseminante no momento da inseminação artificial	Significativo no teste não paramétrico. Não pode aglutinar os dados	

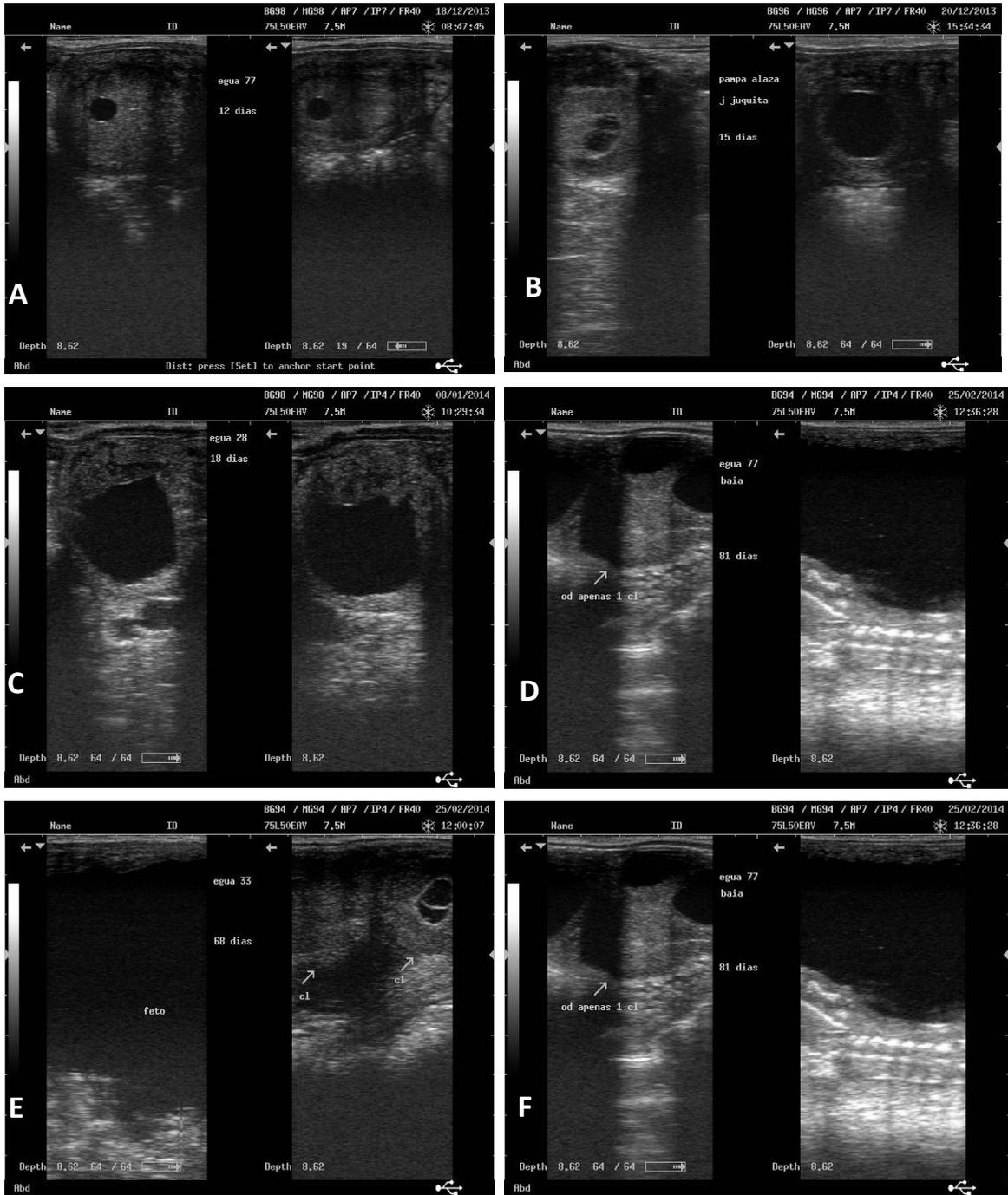


Figura 4.2. A: vesícula embrionária com 12dias, B: corpo lúteo (cl) à esquerda e a direita vesícula embrionária com 15 dias; C: vesícula embrionária com 18 dias; D: corpo lúteo à esquerda e a direita, vesícula embrionária com 30 dias de gestação; E: corpo lúteo à direita e a esquerda, feto com 68 dias de gestação; F: à esquerda corpo lúteo e a direita, feto com 81 dias de gestação.



Figura 4.3. A,B, C, D: Preparação dos diluidores, ovos lavados e desinfetados com álcool, separação da gema pela passagem em papel filtro, transferência da gema de ovo para o Becker.



Figura 4.4. A, B: Tronco de coleta com rampa; C, D: Vagina artificial modelo Hannover.



Figura 4.5. A: Sêmen em mamadeira plástica descartável com capacidade para 250mL; B:Sêmen diluído sendo dividido em tubos Falcon; C: Centrífuga programada à 23°C, 1700rpm (592xg); D: aspiração do sobrenadante; E: câmara hemocimétrica (Neubauer) utilizada para o cálculo da concentração espermática; F: balcão refrigerador.



Figura 4.7. A: bandeja com tela metálica; B: bandeja inferior e superior; C:caixa de congelamento; D e E: armazenamento das palhetas; F e G: descongelamento das palhetas; H, I: corte das extremidades das palhetas; J: higienização da vulva; K: Inseminação Artificial.

ÉGUA	IDADE	CATEGORIA
REPRODUTOR	TRATAMENTO	PARTO/SEXO

DATA												
IA												
ÚTERO CERVIX												
OVÁRIO DIREITO												
OVÁRIO ESQUERDO												

DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO	
DATA	ACHADOS

Figura 4.8. Ficha de controle das fêmeas.

Reprodutor: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Nºmontas/ejaculado: \_\_\_\_\_

Volume do sêmen (mL): \_\_\_\_\_ Volume Final Ressuspensão (mL): \_\_\_\_\_  
 Volume LPDG (2:1)(mL): \_\_\_\_\_ Volume Final / Tratamento (mL): \_\_\_\_\_  
 Volume em cada tubo (mL): \_\_\_\_\_ Volume Crio Acrescentado (mL): \_\_\_\_\_

Hora da Coleta: \_\_\_\_\_ Início Resfriamento: \_\_\_\_\_  
 Diluição LPDG (2:1): \_\_\_\_\_ Término Resfriamento: \_\_\_\_\_  
 Centrifugação: \_\_\_\_\_ Envase Início: \_\_\_\_\_  
 Rediluição Pré [ ]: \_\_\_\_\_ Envase Final: \_\_\_\_\_  
 Rediluição Final: \_\_\_\_\_ Vapor de N2: \_\_\_\_\_

	Motilidade (0-100%):	Vigor (0-5):	Obs:
Fresco	_____	_____	_____
Diluído LPDG	_____	_____	_____
Resf I (Jepsen)	_____	_____	_____
Resf II (PIVO)	_____	_____	_____
Descongelado I	_____	_____	_____
Descongelado II	_____	_____	_____

**Cálculo da Concentração 1 (1:100)**

$$\frac{\text{_____} + \text{_____}}{2} = \text{_____} = \text{_____} \times 5 = \text{_____} \times 10^6 \text{ sptz/mL (A)}$$

$$(A) \text{_____} \times (\text{mot}) \text{_____} = \text{_____} \times 10^6 \text{ sptz móveis/mL}$$

**Cálculo da Concentração 2 (1:400)**

$$\frac{\text{_____} + \text{_____}}{2} = \text{_____} = \text{_____} \times 20 = \text{_____} \times 10^6 \text{ sptz/mL (A)}$$

$$(A) \text{_____} \times (\text{mot}) \text{_____} = \text{_____} \times 10^6 \text{ sptz móveis/mL}$$

$$\frac{\text{_____}}{\text{móveis/mL}} \times \frac{\text{_____}}{\text{vol. Sêmen/tubo}} = \frac{\text{_____}}{\text{Células/tubo}}$$

**Cálculo do Volume Final / Tratamento**

200 x 10<sup>6</sup> sptz móveis ----- 1mL

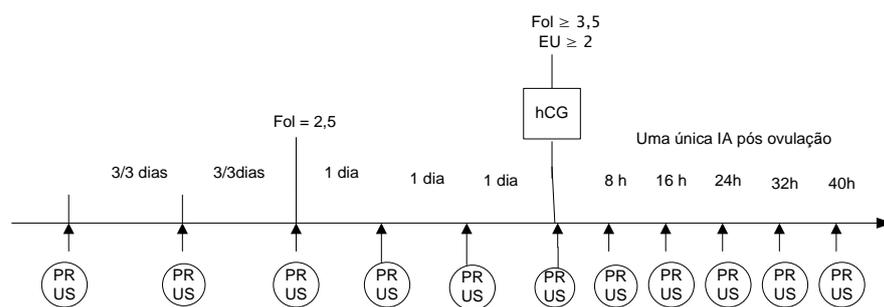
$$\frac{\text{_____}}{\text{Nº Cél/Tubo}} \times 10^6 \text{ ----- } X \quad X = \frac{\text{_____}}{\text{vol. Final/Tubo}} \text{ mL}$$

**Nº de DOSES produzidas** =  $\frac{\text{_____}}{\text{vol. Final/Tubo}} \text{ mL} \div 0,5 \text{ mL} = \text{_____} \text{ Palhetas//} \text{_____} \text{ (real)}$

**ÉGUAS INSEMINADAS**

Égua-número	Data	Horário	Pré/Pós	Observações
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____

Figura 4.9: Ficha da coleta



Legenda:  
 PR – Palpação retal  
 US – Ultrassonografia  
 EU – Edema uterino  
 hCG – Aplicação de 1666 UI de hCG  
 IA – Inseminação artificial

Figura 4.10. Controle da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo, em éguas submetidas à aplicação da hCG, quando de um folículo  $\geq 3,5$ cm em um dos ovários.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Características físicas do sêmen asinino diluído, centrifugado, rediluído, resfriado, envasado em palhetas de 0,55mL e congelado

#### 5.1.1. Comportamento sexual, características do sêmen fresco, da centrifugação e do sêmen centrifugado

Foram utilizados neste experimento 14 ejaculados oriundos de dois jumentos da raça Pêga, sendo oito ejaculados do jumento 1 e seis ejaculados do jumento 2, coletados durante os meses de dezembro de 2013, janeiro e fevereiro de 2014. Os dados referentes ao comportamento sexual, características físicas do sêmen fresco, da centrifugação e do sêmen centrifugado, estão apresentados na Tab. 5.1.

Observa-se na Tab. 5.1, que o número de montas/ejaculado não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre os jumentos, com uma média de  $1,07 \pm 0,07$  montas/ejaculado. Também o intervalo entre ejaculados não diferiu entre os reprodutores, sendo a média de  $9,60 \pm 2,39$  dias.

Quanto às características do sêmen fresco, 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; Rossi, 2008; Rocha, 2012).

No que se refere ao número de espermatozoides/mL e ao de espermatozoides móveis/mL observou-se diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os dois jumentos, destacando-se os dados do jumento 1. Neste sentido, vale salientar o menor volume de sêmen livre de gel observado para este reprodutor. Possivelmente, tal característica possa explicar em parte o maior número de espermatozoides por mL de sêmen, encontrado em seu ejaculado. Os valores de motilidade e vigor espermáticos, não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre os machos, estando dentro da normalidade

para os dois jumentos. Há que se salientar, ainda, que o valor médio de motilidade espermática registrado, no presente experimento ( $90,42 \pm 0,42$ ) foi superior aos observados por Ferreira (1993), Rossi (2008) e Rocha (2012) de 73,89%, 82,69% e 88,71%, respectivamente. Ao trabalhar com jumentos da raça Pêga, Rossi (2008) observou, também, grande variação individual entre os reprodutores quanto ao volume de sêmen, número de espermatozoides totais e móveis por ejaculado, bem como quanto à concentração de espermatozoides totais e móveis por mL do sêmen *in natura*. Em 2012, Rocha também observou variações do sêmen fresco entre os três reprodutores utilizados em seu estudo. Da mesma forma, Carvalho (2011), ao realizar a coleta fracionada do sêmen de jumentos, observou, na fração rica em espermatozoides, grande variação entre os reprodutores para todos os parâmetros avaliados no sêmen fresco.

Tabela 5.1. Comportamento sexual, características físicas do sêmen fresco e do centrifugado de jumentos da raça Pêga

Parâmetros avaliados	Jumentos		$\bar{X} \pm EP$ .
	1	2	
<i>Comportamento sexual</i>			
- número de montas/ejaculado	1,13 ± 0,13	1,0 ± 0,00	1,07 ± 0,07
- intervalo entre ejaculados (dias)	9,00 ± 2,02	10,20 ± 2,75	9,60 ± 2,39
<i>Características do sêmen fresco</i>			
- volume de sêmen (mL)	61,19 ± 8,14	70,50 ± 3,66	65,85 ± 5,9
- motilidade (0-100%)	90,00 ± 0,00	90,83 ± 0,83	90,42 ± 0,42
- vigor (0-5)	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00
- número de espermatozoides/mL ( $\times 10^6$ )	234,46 ± 25,04 <sup>a</sup>	146,25 ± 12,36 <sup>b</sup>	190,36 ± 18,70
- número de espermatozoides móveis/mL ( $\times 10^6$ )	211,02 ± 22,54 <sup>a</sup>	132,50 ± 10,56 <sup>b</sup>	171,76 ± 16,55
- número de espermatozoides totais/ejaculado ( $\times 10^6$ )	14939,29 ± 1976,53	10145,21 ± 591,95	12542,25 ± 1284,24
- número de espermatozoides totais móveis/ejaculado ( $\times 10^6$ )	13445,36 ± 1778,87	9194,56 ± 480,50	11319,96 ± 1129,69
- volume de diluidor LPDG (mL)	122,38 ± 16,28	141,00 ± 7,31	131,69 ± 11,80
- volume de sêmen + diluidor (mL)	183,56 ± 24,42	211,50 ± 10,97	197,53 ± 17,70
- motilidade espermática pós-diluição (%)	90,00 ± 0,00	90,83 ± 0,83	90,42 ± 0,42
- vigor pós-diluição (0-5)	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00
<i>Características da centrifugação e do sêmen centrifugado</i>			
- volume de sêmen diluído/tubo centrífuga (mL) – real	40,94 ± 2,82	42,67 ± 2,00	41,81 ± 2,41
- número de tubos de centrífuga utilizados	4,50 ± 0,63	5,00 ± 0,45	4,75 ± 0,54
- perda de volume (mL)	2,31 ± 0,51	2,80 ± 0,12	2,56 ± 0,32
- volume de sêmen pós-centrifugação (mL)	15,98 ± 2,26	18,47 ± 1,81	17,23 ± 2,04
- volume de sêmen + diluidor no tubo de centrífuga	12,56 ± 1,31 <sup>a</sup>	8,12 ± 1,06 <sup>b</sup>	10,34 ± 2,37
- número de espermatozoides por mL ( $\times 10^6$ )	827,50 ± 113,99 <sup>a</sup>	487,50 ± 65,88 <sup>b</sup>	657,5 ± 89,94
- número de espermatozoides móveis por mL ( $\times 10^6$ )	744,75 ± 102,59 <sup>a</sup>	441,33 ± 57,94 <sup>b</sup>	593,04 ± 80,27
- número total de espermatozoides/ejaculado ( $\times 10^6$ )	12448,88 ± 1504,67 <sup>a</sup>	8478,33 ± 658,06 <sup>b</sup>	10463,61 ± 1081,37
- número total de espermatozoides móveis/ejaculado ( $\times 10^6$ )	11203,99 ± 1354,20 <sup>a</sup>	7687,85 ± 566,65 <sup>b</sup>	9445,50 ± 960,43
- perdas de espermatozoides no transcorrer da centrifugação ( $\times 10^6$ )	2626,29 ± 967,03	1666,88 ± 383,20	2146,59 ± 675,12
- perdas de espermatozoides móveis no transcorrer da centrifugação ( $\times 10^6$ )	2363,66 ± 870,33	1506,71 ± 341,92	1935,19 ± 606,13
- taxa de recuperação espermática total (%)	82,64 ± 4,56	83,53 ± 3,87	83,09 ± 4,22
- taxa de recuperação espermática real (%)	83,65 ± 4,64	83,99 ± 4,75	83,82 ± 4,70

A adição de diluidores ao sêmen tem como objetivos proteger os espermatozoides de condições ambientais desfavoráveis e prolongar a sua sobrevivência (Pickett e Amann, 1987). Como pode ser observado na Tab. 5.1 utilizou-se uma proporção 2:1 (diluidor : sêmen) pré centrifugação.

A centrifugação do sêmen tem sido uma das alternativas utilizadas para reduzir ou eliminar o plasma seminal (Brinsko *et al.*, 2000; Brugué, 2010), de forma a aumentar a concentração espermática de animais que apresentam baixa concentração (Amann e Pickett, 1987; Brugué, 2010). Normalmente, as centrifugações são feitas por 10-15 minutos à uma velocidade de 400 - 600 x g (Brugué, 2010). 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). Apesar disto, a centrifugação é utilizada rotineiramente quando da criopreservação do sêmen (Brugué, 2010). No presente estudo, observou-se perdas médias de aproximadamente 16 – 17% dos espermatozoides no processo de centrifugação do sêmen (Tab. 5.1) Além disso, após a centrifugação do sêmen, observou-se uma grande diferença ( $p < 0,05$ ) entre os jumentos quanto ao volume de sêmen + diluidor no tubo de centrifuga, número de espermatozoides por mL ( $\times 10^6$ ), número de espermatozoides móveis por mL ( $\times 10^6$ ), número total de espermatozoides/ejaculado ( $\times 10^6$ ) e número total de espermatozoides móveis/ejaculado ( $\times 10^6$ ) (Tab. 5.1), como era de se esperar diante das diferenças entre eles observadas no sêmen fresco.

#### 5.1.2. Intervalos de tempo avaliados no transcorrer do congelamento do sêmen, da coleta à inseminação artificial

As variáveis de controle envolvendo os intervalos de tempo avaliados no transcorrer do processo de congelamento do sêmen, da coleta do sêmen à inseminação artificial estão apresentadas na tabela 5.2, não havendo diferença ( $p > 0,05$ ) entre os jumentos, o que demonstra uniformidade do processamento do sêmen, durante todo o estudo. Os intervalos de tempo da coleta do sêmen até o congelamento foram os menores possíveis, dentro do protocolo estabelecido para o processamento do sêmen.

Neste estudo, após a centrifugação do sêmen, o mesmo foi rediluído para concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozoides móveis por 0,5mL de sêmen diluído e refrigerado à  $5-6^\circ\text{C}$  durante aproximadamente 3 horas ( $-0,10^\circ\text{C}/\text{minuto}$ ), após o que foi envasado em palhetas de 0,5mL, mantidas por 15 minutos no vapor de nitrogênio, antes de serem mergulhadas no nitrogênio líquido.

Ao comparar três curvas de resfriamento ( $-0,2$ ;  $-0,3$  ou  $-0,6^\circ\text{C}/\text{minuto}$ ), sendo o sêmen diluído em diluidor à base de lactose-gema de ovo, a uma concentração de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL, Ferreira (1993) observou que a taxa de resfriamento de  $-0,6^\circ\text{C}/\text{minuto}$  proporcionou maior longevidade espermática, acompanhada pela manutenção do seu poder fecundante por até 48 horas, quando preservado à  $5^\circ\text{C}$ . No mesmo sentido, Santos (1994) avaliou o efeito de três taxas de resfriamento ( $-0,3$ ;  $-0,6$  e  $-1,0^\circ\text{C}/\text{minuto}$ ) ao trabalhar com o sêmen de três jumentos da raça Pêga e três mestiços (Pêga x Nordeste), diluído em diluidor à base de leite em pó desnatado-glicose, à uma concentração de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Neste estudo, avaliaram-se os efeitos dos tratamentos sobre as características de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermáticos. Assim, na presença de taxas de resfriamento mais rápidas ( $0,6$  ou  $1,0^\circ\text{C}/\text{minuto}$ ), observou-se melhor conservação do sêmen à  $5^\circ\text{C}$ , em relação aos valores observados, quando utilizou-se uma taxa mais lenta ( $0,3^\circ\text{C}/\text{minuto}$ ).

Tabela 5.2. Características do protocolo de congelamento utilizado para o sêmen de jumentos da raça Pêga, da coleta do sêmen à inseminação artificial das éguas

Parâmetros avaliados	Jumentos		$\bar{X} \pm EP$
	1	2	
Intervalo da coleta à diluição do sêmen (minutos)	9,13 ± 0,90	6,67 ± 0,88	7,90±0,89
Intervalo da diluição à centrifugação do sêmen (minutos)	10,88 ± 1,75	12,17 ± 1,30	11,53±1,53
Intervalo da coleta à centrifugação (minutos)	20,00 ± 2,46	18,83 ± 2,06	19,42±2,26
Intervalo da centrifugação à pré-rediluição (minutos)	28,00 ± 1,67	27,67 ± 1,28	27,84±1,48
Intervalo da pré-rediluição à diluição final	24,63 ± 1,08	22,83 ± 2,27	23,73±1,68
Intervalo da coleta à pré-rediluição (minutos)	48,00 ± 3,74	46,50 ± 3,13	47,25±3,44
Intervalo da coleta à rediluição final (minutos)	72,63 ± 3,88	69,33 ± 3,68	70,98±3,78
Intervalo da diluição final ao início do resfriamento (minutos)	2,50 ± 0,50	1,83 ± 0,75	2,17±0,63
Intervalo do início ao final do resfriamento (minutos)	178,00 ± 9,94	185,83 ± 17,67	181,92±13,81
Intervalo da coleta ao início do resfriamento (minutos)	75,13 ± 4,14	71,17 ± 3,32	73,15±3,73
Intervalo da coleta ao final do resfriamento (minutos)	253,13 ± 12,99	257,00 ± 20,20	255,07±16,60
Intervalo do final do resfriamento ao início do envase (minutos)	4,13 ± 1,29	5,00 ± 0,68	4,57±0,99
Intervalo do início ao final do envase (minutos)	35,00 ± 3,26	29,00 ± 1,03	32,00±2,15
Intervalo da coleta ao início do envase (minutos)	257,25 ± 12,35	262,00 ± 20,58	259,63±16,47
Intervalo da coleta ao final do envase (minutos)	292,25 ± 12,38	291,00 ± 20,29	291,63±16,34
Intervalo do final do envase ao início do congelamento (minutos)	5,13 ± 2,00	2,50 ± 0,89	3,82±1,45
Intervalo da coleta ao início do congelamento (minutos)	297,38 ± 13,15	293,50 ± 20,35	295,44±16,75
Intervalo da coleta ao final do congelamento (minutos)	312,38 ± 13,15	308,50 ± 20,35	310,44±16,75
Tempo de envase/palheta (minutos)	0,34 ± 0,04	0,39 ± 0,04	0,37±0,04
Número de palhetas/ejaculado	110,50 ± 13,43	77,00 ± 6,62	93,75±10,03
Número de doses inseminantes/ejaculado	11,05 ± 1,34	7,70 ± 0,66	9,38±1,00
Número real de éguas inseminadas	4,80 ± 1,07	3,80 ± 0,80	4,30±0,94

Para o congelamento do sêmen asinino Legha e Yash Pal (2012) compararam quatro métodos de congelamento, sendo o sêmen mantido à 5°C durante duas horas, previamente ao seu envasamento em palhetas de 0,5mL. Após o envasamento, as palhetas foram divididas em quatro grupos. No primeiro grupo, as palhetas foram congeladas em bio-congelador programável, à uma taxa de -0,3°C/min, na amplitude de 18°C até 5°C. De 5°C à -15°C, utilizou-se uma taxa de -10°C/min. Finalmente, de -15°C à -100°C, utilizou-se uma taxa de -19°C/minuto, sendo as palhetas mergulhadas, em seguida, em nitrogênio líquido. Nos outros três grupos, as palhetas foram colocadas em uma caixa de isopor, horizontalmente, à 3 cm acima da superfície do nitrogênio, quando permaneceram por 8, 10 ou 12min, sendo, à seguir, mergulhadas no nitrogênio líquido. Os melhores resultados foram obtidos com as palhetas mantidas por 12 minutos no vapor de nitrogênio, com percentuais de motilidade, de 35 a 65%.

Em um estudo conduzido por Legha, Yash Pal e Singh (2012), utilizou-se uma curva de resfriamento de - 0,3°C/min, a partir de 18°C até 5°C. Quando o sêmen diluído atingiu 5 °C, foi mantido por duas horas entre 5-8°C, para em seguida, ser congelado a uma taxa de - 10°C/min de 5°C até - 15°C. Entre as temperaturas de - 15°C à -100°C, utilizou-se uma queda de - 19°C/min. Quando o sêmen atingiu a temperatura de - 100°C, foi imerso em nitrogênio líquido. O sêmen de quatro jumentos foi descongelado à 37°C por um minuto e utilizado para inseminar 154 ciclos estrais de éguas, quando obteve-se uma taxa de gestação de 43,5% (67/154).

Já Flores *et al* (2008) utilizaram uma redução da temperatura, de 20 para 5°C, à uma taxa de resfriamento de 0,26°C/min. A seguir, utilizou-se uma queda de - 4,75°C/min, entre 5°C e - 90°C. Finalmente, utilizou-se uma taxa de 11,11°C/min, entre -90°C e -120°C. Neste estudo, foram feitas apenas avaliações *in vitro* do sêmen descongelado.

No presente estudo, as palhetas de 0,5mL, foram utilizadas para armazenar o sêmen asinino congelado. Entretanto, alguns estudos tem avaliado a melhor forma de envasamento do sêmen. Neste sentido, Sales, em 2011, comparou dois tipos de envasamento, flatpacks e palhetas de 0,55mL, para o sêmen asinino. Essa autora observou que as amostras envasadas em palhetas de 0,55mL apresentaram melhor viabilidade espermática, quando comparadas às envasadas em flatpacks. Ao trabalharem com o sêmen equino congelado, Heitland *et al.* (1996) observaram os melhores resultados quando o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL, em relação aos obtidos quando utilizou-se macrotubos de 2,5mL. Diferentemente, Oliveira (2005) trabalhando com sêmen asinino, não observou diferenças significativas, no que diz respeito às características espermáticas, quando o sêmen foi envasado em palhetas francesas de 0,55mL ou em macrotubos de 2,5mL. Em trabalho conduzido anteriormente, Crockett *et al.* (2001), também não verificaram diferenças significativas, quanto à motilidade pós descongelamento, no sêmen equino envasado em palhetas de 0,5mL ou em macrotubos de 2,5mL (21 e 28%, respectivamente).

A concentração espermática por mL de sêmen diluído ideal, quando os espermatozoides são congelados em palhetas de 0,5mL, tem sido estudada por vários autores. Em 2012, Contri e colaboradores, coletaram o sêmen de sete jumentos da raça Martina Franca para avaliarem se a concentração espermática por mL interfere na qualidade espermática pós-descongelamento. Neste estudo, avaliaram diferentes concentrações, a saber: 100, 250, 500, 750 e 1000 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides por mL de sêmen diluído. As palhetas que continham menores concentrações apresentaram os melhores resultados de motilidade, viabilidade e integridade da membrana no pós-descongelamento. Assim, os melhores resultados foram associados às concentrações de 100

e  $250 \times 10^6$  espermatozoides/mL. No presente estudo, optou-se pela concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozoides móveis/mL de sêmen diluído.

Apesar do jumento 1 ter apresentado maior número de palhetas/ejaculado, número de doses inseminantes/ejaculado e número de éguas inseminadas, estes valores não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre os jumentos (Tab. 5.2).

### 5.1.3. Efeito do jumento e do diluidor sobre a motilidade e vigor do sêmen centrifugado e descongelado.

A motilidade e o vigor espermáticos pós-centrifugação, foram influenciados ( $p < 0,05$ ) pelo jumento (Tab. 5.3), não tendo sido detectada influencia ( $p > 0,05$ ) do diluidor. Segundo Mann *et al.* (1963), variações envolvendo o sêmen de diferentes animais ou mesmo de ejaculados de um mesmo animal, podem estar associadas às variações sazonais, bem como à faixa etária.

Tabela 5.3. Características físicas do sêmen após a centrifugação e o descongelamento do sêmen, considerando-se o efeito do jumento (J1, J2) e do diluidor (D1, D2), bem como as suas interações (jumento x diluidor).

Parâmetros avaliados	Tratamentos			
	J1D1	J1D2	J2D1	J2D2
Motilidade espermática pós-centrifugação (%)	$70,00 \pm 2,99^b$	$70,00 \pm 2,99^b$	$77,50 \pm 2,14^a$	$78,33 \pm 2,47^a$
Vigor espermático pós-centrifugação (0-5)	$4,69 \pm 0,13^b$	$4,69 \pm 0,13^b$	$5,00 \pm 0,00^a$	$5,00 \pm 0,00^a$
Motilidade espermática pós-descongelamento (%)	$26,88 \pm 3,26$	$31,25 \pm 1,25$	$31,67 \pm 1,05$	$32,50 \pm 1,12$
Vigor espermático pós-descongelamento (0-5)	$3,63 \pm 0,08$	$3,63 \pm 0,08$	$4,00 \pm 0,18$	$4,00 \pm 0,18$

<sup>ab</sup> Médias acompanhadas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ( $p < 0,05$ )

Em um estudo realizado por Rota *et al.* (2008), observou-se o efeito do reprodutor sobre as características espermáticas (motilidades espermáticas total e progressiva), logo após a diluição do sêmen, bem como variações entre ejaculados de um mesmo reprodutor. A variação individual foi observada até as 72 horas de armazenamento à 5°C, sendo identificadas diferenças entre os indivíduos quanto ao percentual de redução da motilidade.

Em um estudo envolvendo o sêmen de cinco jumentos da raça Pêga, Rossi (2008) observou diferenças significativas no que diz respeito às características seminais, entre os jumentos, quanto ao volume de sêmen, número de espermatozoides/mL, vigor e motilidade espermáticas, bem como quanto ao número de montas por ejaculado. O número potencial de éguas a serem inseminadas por ejaculado também variou entre os reprodutores, assim como a taxa de gestação por ciclo de éguas inseminadas que também diferiu entre eles.

A motilidade espermática variou de  $70,00 \pm 2,99$  a  $78,33 \pm 2,47$  (%), logo após a centrifugação. Estes resultados, estão de acordo com os encontrados por outros autores, sendo que, em um

estudo realizado por Canisso (2008), observou-se motilidade média de  $70,8 \pm 6,37$  % no sêmen centrifugado e resfriado. Similarmente, Miró *et al.* (2009) observaram motilidade de 72,4% no sêmen centrifugado e resfriado por 24 horas.

Durante o processo de criopreservação, os principais danos sofridos pelas células espermáticas, ocorrem durante o resfriamento e o descongelamento (Pickett e Amann, 1993; Furst, 2006). O choque pelo frio pode causar prejuízos irreversíveis, caracterizados pela rápida perda da motilidade, danos à membrana plasmática, redução do metabolismo espermático e movimentos circulares (Amann e Pickett, 1987). Com a membrana plasmática danificada, podem ocorrer mudanças de permeabilidade associadas à alterações funcionais e metabólicas, que aditivamente prejudicam a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides (Amann e Graham, 1993). Além da curva de resfriamento, o tipo de curva utilizada no processo de congelamento também influencia diretamente a magnitude das lesões celulares (Terraciano *et al.*, 2008), devido aos processos de desidratação espermática que provoca mudanças intracelulares, e a formação de cristais de gelo intra e extracelulares (Amann e Pickett, 1987; Terraciano *et al.*, 2008). Sendo assim, no processo de resfriamento, qualquer dano espermático será exacerbado no descongelamento (Amann e Pickett, 1987). Entretanto, para a obtenção de resultados satisfatórios no pós-descongelamento, é necessário que haja uma perfeita interação entre diluidor, crioprotetor, curva de resfriamento, curva de congelamento e descongelamento, para que a formação de cristais de gelo intra e extracelulares possa ser minimizada.

Observou-se uma redução progressiva dos valores de motilidade e vigor espermáticos, para os dois reprodutores, no transcorrer do processo de congelamento. Entretanto, no que diz respeito ao sêmen pós-descongelamento, não observou-se efeito ( $p > 0,05$ ) de jumento ou de diluidor sobre os valores de motilidade e vigor espermáticos (Tab. 5.3).

A curva utilizada no descongelamento depende do tipo de envasamento utilizado e do tempo de exposição das células espermáticas, à uma determinada temperatura (Pickett e Amann, 1993). Neste estudo, o descongelamento foi realizado em banho Maria à  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 30 segundos, sendo similar aos procedimentos realizados por Trimeche *et al.* (1996), Flores *et al.* (2008) e Jepsen *et al.* (2010), que também descongelaram as palhetas a uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos.

Por outro lado, Cochran *et al.* (1984) utilizaram dois métodos de descongelamento do sêmen armazenado em palhetas, sendo que o descongelamento rápido ( $75^{\circ}\text{C}/7$ segundos) proporcionou melhores resultados que o descongelamento mais lento ( $37^{\circ}\text{C}/30$ segundos). Entretanto, o descongelamento na temperatura de  $75^{\circ}\text{C}$  pode ser um procedimento bastante perigoso para ser utilizado rotineiramente no campo, sem um controle absoluto do tempo de submissão do sêmen à mesma (Vidament *et al.*, 2001). Diante destes riscos, Borg *et al.* (1997), não encontrando diferenças entre os dois métodos de descongelamento, sugerem que o sêmen equino, armazenado em palhetas de 0,55mL, deveria ser descongelado à  $37^{\circ}\text{C}/30$  segundos, por ser um método mais seguro e prático no campo.

No presente experimento, a motilidade pós-descongelamento variou de  $26,88 \pm 3,26$  à  $32,50 \pm 1,12$  %. Em um estudo realizado por Krause e Grove (1967) o sêmen descongelado apresentou uma motilidade progressiva de 50-70%. Canisso (2008) obteve uma motilidade total média, pós-descongelamento, de  $37,32 \pm 5,91$ %, enquanto Flores *et al.* (2008) observaram uma motilidade de 48,4% no sêmen asinino pós-descongelamento. Esses resultados foram superiores aos encontrados no presente estudo (Tab. 5.3).

## 5.2 Efeito do diluidor e do jumento sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado

Não havendo diferenças entre os tratamentos, nem interação jumento x tratamento ( $p>0,05$ ), foi possível comparar o efeito dos diluidores, independentemente dos jumentos, bem como o efeito dos jumentos, independentemente dos diluidores, sobre diferentes características reprodutivas bem como sobre a taxa de gestação de éguas inseminadas com sêmen diluído e congelado (Tab. 8.2 - Anexo).

### 5.2.1 Efeito do diluidor sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado

Não havendo efeito do jumento sobre a fertilidade, foi possível comparar-se a eficiência de dois diluidores para o congelamento do sêmen de asininos. Assim, foram utilizados, 39 ciclos de 34 éguas sem raça definida, distribuídos uniformemente, após agrupamento por idade e categoria reprodutiva entre os tratamentos LPDG e PIVO e, inseminadas com sêmen congelado de dois jumentos da raça Pêga. A distribuição das fêmeas equinas por categoria reprodutiva, considerando-se o efeito do diluidor, independentemente do jumento, esta apresentada na Tabela 5.4. Nessa tabela, observa-se a distribuição dos 39 ciclos utilizados, de acordo com a categoria reprodutiva das éguas: potras - 7,69%, éguas solteiras - 30,77%, éguas no “cio do potro” -10,26% e éguas com potro ao pé - 51,28%, representando, a última, um pouco mais da metade das fêmeas utilizadas.

Os parâmetros de controle das fêmeas inseminadas, por jumento e tratamento ao qual pertenciam, os quais informam a uniformidade entre os mesmos, bem como os parâmetros de resultados, que são as respostas aos tratamentos, estão apresentados nas tabelas 8.1 e 8.2 dos Anexos.

Tabela 5.4. Distribuição das fêmeas equinas por categoria reprodutiva, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento

Categoria reprodutiva	Diluidor		Total
	D1	D2	
Potra	1/39 (2,56%)	2/39 (5,13%)	3/39 (7,69%)
Égua solteira	6/39 (15,38%)	6/39 (15,38%)	12/39 (30,77%)
Égua no “cio do potro”	3/39 (7,69%)	1/39 (2,56%)	4/39 (10,26%)
Égua com potro ao pé	11/39 (28,21%)	9/39 (23,08%)	20/39 (51,28%)
Total	21/39 (53,85%)	18/39 (46,15%)	39/39 (100,00%)

#### 5.2.1.1 Características biométricas e fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga

As características biométricas das éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o efeito do diluidor, independentemente do jumento, estão apresentadas na Tabela 5.5. Para cada diluidor foram utilizadas 17 éguas, sendo 21 ciclos para o diluidor 1 e 18 ciclos para o diluidor 2.

Tabela 5.5. Características biométricas de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento

Variáveis	Tratamentos	
	Diluidor 1	Diluidor 2
Número de éguas	17	17
Número de ciclos	21	18
Idade das éguas (anos)	9,33±0,78	9,47±0,92
Peso corporal das éguas (kg)	373,24±9,29	357,33±11,02
Escore da condição corporal (1-5)	3,12±0,10	3,14±0,13
Taxa de gestação/ciclo (%)	23,81% (5/21) <sup>b</sup>	55,56% (10/18) <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Médias acompanhadas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ( $p < 0,05$ )

Na Tabela 5.5, verifica-se que os parâmetros de controle, capazes de interferir na taxa de gestação de éguas inseminadas, tais como idade, peso corporal e escore da condição corporal, não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, caracterizando uma homogeneidade adequada entre os mesmos.

A idade das éguas utilizadas variou de 9,33±0,78 a 9,47±0,92 anos ( $p > 0,05$ ) para os tratamentos 1 e 2, respectivamente (Tab. 5.5). Têm sido observados resultados de fertilidade satisfatórios em éguas com idade entre dois e 13 anos, havendo uma redução progressiva dos mesmos, a partir dos 14 anos (Woods *et al.*, 1987). Além disso, observa-se que a atividade ovariana tende a decrescer a partir dos quinze anos de idade (Wesson e Ginther, 1981). Consequentemente, as taxas de gestação começam a diminuir em éguas com idades entre 14 e 16 anos (Ball, 2000), faixa etária na qual se encontravam apenas cinco das 34 éguas utilizadas no presente experimento.

Carnevale e Ginther (1992) observaram que éguas com idade entre cinco e sete anos responderam pelas maiores taxas de fertilidade, quando comparadas às com idade de 15 ou mais anos (100 e 32%, respectivamente). Os autores observaram, ainda, uma redução da contratilidade e do tônus uterinos nas éguas com mais de 15 anos, associados a um acúmulo de líquido intrauterino e endometrite, caracterizada por maior quantidade de infiltrados celulares e fibrose, bem como por menor densidade de glândulas endometriais.

Em um trabalho realizado por Woods *et al.* (1987), observou-se uma taxa de gestação de 55% (177/319) para as éguas de 06 a 09 anos de idade, de 60% (130/216) para aquelas entre 10 e 13 anos, de 51% (72/142) para aquelas entre 14 e 17 anos de idade, de 45% (34/76) para aqueles entre 18 e 21 anos de idade e de 33% (12/36) para as éguas com idade superior a 21 anos. No mesmo sentido, Valle *et al.* (1999) avaliaram o efeito da idade sobre a fertilidade de éguas, quando observaram uma queda da fertilidade relacionada ao aumento da idade, representada pela redução da taxa de gestação/ciclo. Assim, ao estudarem 147 ciclos estrais de 99 éguas, divididas em grupos de três a seis anos; sete 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.

Por outro lado, Brandão *et al.* (2002) não observaram influência da idade sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. As taxas de gestação, ao primeiro ciclo, foram, respectivamente de 72,73% (8/11); 62,50% (10/16); 66,67% (12/18) e 63,64% (7/11) e, após

quatro ciclos, de 64,29% (9/14); 60,71% (17/28); 44,83% (13/29) e de 50,00% (10/20), para as faixas etárias de quatro a seis anos, sete a 10 anos, 11 a 14 anos e de 15 a 16 anos de idade, respectivamente, sem que houvessem diferenças significativas entre elas.

Em relação aos parâmetros de resultados (taxa de gestação/ciclo) observou-se, no presente experimento, uma superioridade do diluidor 2 (PIVO) com uma taxa de gestação de 55,56% (10/18), em relação ao diluidor 1 (LPDG - gema de ovo-etileno-glicol), com uma taxa de gestação de 23,81% (5/21) - Tabela 5.5. Conseqüentemente, observou-se no tratamento 2 (PIVO), associado à uma maior taxa de gestação/ciclo, a necessidade de um menor número de ciclos/gestação.

#### 5.2.1.2 Análise crítica do diluidor proposto

O presente experimento faz parte de uma linha de pesquisa desenvolvida na Escola de Veterinária da UFMG envolvendo a preservação e fertilidade do sêmen asinino, bem como as perdas gestacionais advindas de éguas e jumentas inseminadas com sêmen a fresco, resfriado e congelado de asininos (cruzamento inter-espécies), visando a produção de muare e asininos para reprodução, trabalho e lazer (Rossi, 2008; Carvalho, 2011; Gonczarowska, 2011; Salles, 2011; Rocha, 2012; Rossi, 2015; Costa, 2015). Um dos aspectos mais importantes do presente experimento foi a formulação de um diluidor de sêmen capaz de permitir a criopreservação das células espermáticas de jumentos e manter, com sucesso, as características físicas e morfológicas do sêmen e subsequentemente responder por taxas de gestação comercialmente aceitáveis, após o descongelamento.

Inicialmente, gastou-se um tempo considerável em um pré-experimento visando formular um diluidor que atendesse as demandas energéticas das células espermáticas de asininos, fornecesse um balanço iônico adequado às células e uma relação adequada crioprotetor extracelular (lactose) : crioprotetor intracelular (etileno-glicol), capaz de reduzir o percentual do crioprotetor intracelular e que, além disso, fosse menos agressivo às células espermáticas do jumento que o glicerol (Vidament *et al.*, 2009).

Após extensa revisão de literatura envolvendo trabalhos nacionais e estrangeiros e de cinco dissertações realizadas pelo mesmo grupo, subsequentemente, concluiu-se que um dos primeiros aspectos a serem considerados para a formulação de um possível diluidor, visando o congelamento do sêmen asinino, seria o tipo de macromolécula a ser incorporada ao mesmo, na ausência do plasma seminal, retirado após a centrifugação do sêmen. Assim, incorporou-se ao diluidor macromoléculas do leite e da gema de ovo, sendo a última em um baixo percentual, incapaz de levar as células à um estado de decapacitação, já verificado anteriormente pelo mesmo grupo, no sêmen resfriado (Carvalho, 2011) e congelado (Salles, 2011), embora Jepsen (2010), tenha sido a primeira autora no mundo a observar tal fenômeno e a descrevê-lo com profundidade científica no sêmen asinino. Acrescentou-se, ainda, ao diluidor substâncias capazes de manter valores adequados de pH (EDTA/citrato de sódio). Finalmente, procurou-se formular um diluidor que fornecesse um equilíbrio osmótico que permitisse uma sobrevivência espermática adequada após o descongelamento.

Nos diluidores de sêmen, os açúcares possuem diversas funções, incluindo o fornecimento de substratos energéticos para os espermatozoides, manutenção da pressão osmótica do meio, além de atuarem como crioprotetores (Berlinguer *et al.*, 2007). A escolha do açúcar a ser incluído em um diluidor de sêmen deve ser baseada na sua funcionalidade e propriedades químicas (Purdy,

2006). Dentre os açúcares utilizados nos meios diluidores visando a criopreservação do sêmen estão os açúcares simples, como a frutose e a glicose, bem como os açúcares não penetrantes na célula, tais como a lactose, a rafinose e a trealose (Squires *et al.*, 2004). A ação dos açúcares não penetrantes consiste em elevar a pressão osmótica, resultando na desidratação celular, visando reduzir a quantidade de água que pode vir a se congelar, no interior da célula, e assim, aumentar a sua proteção contra as injúrias causadas pela formação dos cristais de gelo (De Leew *et al.*, 1993). Sugere-se que os açúcares, possuam interação com os fosfolípídeos da membrana plasmática, reorganizando-a e aumentando a sua fluidez. Como resultante, aumentam a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação (Bakás e Disalvo, 1991). Além disso, os açúcares fornecem energia aos espermatozoides (Storey, 2008). Por estes motivos, são adicionados aos diluidores como substratos de energia exógenos, além de componentes osmóticos. No entanto, a concentração de determinados açúcares, presentes nos diluidores de congelamento de sêmen equino, podem influenciar negativamente a viabilidade espermática (Snoek *et al.*, 2007).

A lactose é um dos açúcares que vem sendo utilizados em diluidores envolvendo o congelamento de sêmen asinino. Segundo Lusignan *et al.* (2011a), a lactose é o açúcar mais abundante no leite (4,8%) e parece melhorar a eficiência dos diluidores, embora não seja capaz de proteger os espermatozoides isoladamente. Outro açúcar muito utilizado na preparação dos diluidores é a glicose, que difere de outros açúcares por não ser ionizável e de ser utilizada pelo espermatozoide para a produção de energia, de forma a aumentar a sua longevidade. Quando uma solução de glicose é utilizada em um diluidor, observa-se uma maior sobrevivência espermática durante o armazenamento, embora o número de espermatozoides que sobrevivem ao choque térmico não aumente significativamente (Bogart e Mayer, 1950).

Os açúcares utilizados por Krause e Grove (1967) para o congelamento de sêmen asinino foram a glicose, a lactose e a rafinose, quando obteve-se uma taxa de gestação em éguas de 50% (1/2). Na França, em 1998, Trimeche *et al.* congelaram o sêmen asinino com diluidores contendo glicose, lactose e rafinose. A fertilidade deste sêmen foi testada em jumentas, quando obteve-se uma taxa de gestação de 62% (8/13). Entretanto, tais resultados não foram repetidos em estudos subsequentes.

Em 2005, Rozas optou por diluir o sêmen asinino em diluidor contendo glicose pré-centrifugação. Após a centrifugação, as células espermáticas foram ressuspensas em diluidor contendo lactose. As taxas de gestação em jumentas usando sêmen congelado variaram, neste estudo, de 0 à 11%. No mesmo sentido, Castejón (2005) ressuspendeu o sêmen asinino após a centrifugação, em diluidor contendo lactose e obteve taxas de gestação em jumentas variando de 0 (0/9) à 11,11% (1/9).

Pesquisadores chineses testaram cinco diluidores diferentes para o congelamento do sêmen asinino, a saber: 1 – lactose – Tris - água destilada - gema de ovo -antibiótico-glicerol; 2 – sacarose-glicose - água destilada - gema de ovo – antibiótico - glicerol; 3 – sacarose – lactose – glicose - água destilada - gema de ovo – antibiótico - glicerol; 4 – sacarose – Tris - água destilada - gema de ovo – antibiótico – glicerol e 5- lactose – glicose - citrato de sódio - água destilada-gema de ovo – antibiótico – glicerol. Dentre os cinco diluidores, os autores observaram os melhores resultados quando utilizaram o quinto diluidor, contendo em sua

formulação lactose – glicose - citrato de sódio - água destilada-gema de ovo – antibiótico e o glicerol.<sup>18</sup>

Ao inseminar éguas com o sêmen congelado asinino, Canisso (2008) optou por utilizar diluidores contendo lactose em sua formulação e obteve taxas de gestação de 50 à 53,33%. No mesmo sentido, Gama Ker (2009) utilizou também diluidores à base de lactose e obteve taxas de gestação de até 40%. No presente estudo, utilizou-se apenas a glicose no diluidor 1, à uma concentração de 4,9g/100mL do diluidor final, enquanto no diluidor 2 utilizou-se 5,5g de lactose + 1,5 g de glicose/100mL do diluidor final e obteve-se taxas de gestação de 23,81% e 55,56%, respectivamente.

A formulação de um diluidor visando a criopreservação das células espermáticas requer atenção especial quando da escolha do crioprotetor. Se por um lado o ponto final desejado é a manutenção das características físicas e morfológicas das células espermáticas após o descongelamento, a manutenção da fertilidade é uma condição singular para a aprovação de um determinado diluidor ou protocolo de congelamento. Entretanto, o mecanismo de ação dos crioprotetores ainda não está bem compreendido, podendo estas substâncias atuarem via propriedade coligativa da água, causando uma redução do ponto de congelamento de uma solução. Tais compostos diminuem a formação de cristais de gelo, atuam como solventes e reduzem a concentração de solutos no meio externo, evitando a lesão da membrana plasmática (Watson, 1981). Existem duas classes de crioprotetores, os penetrantes e os não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes recebem este nome, pois, conseguem atravessar a membrana plasmática do espermatozoide e atuar no meio intra e extracelular. Neste grupo, incluem-se as pequenas moléculas como o etilenoglicol, o glicerol, o propilenoglicol, a acetamida e outras amidas, o 1,2 propanodiol e o dimetilsulfoxido (DMSO). A maioria dos crioprotetores penetrantes age como solvente e como soluto. Já os não penetrantes, são grandes moléculas que não atravessam a membrana plasmática e podem ser proteínas como as presentes no leite e na gema de ovo, bem como açúcares tais como a lactose, a frutose, a manose, a rafinose e a trehalose, bem como os polímeros sintéticos como o polivinilpirrolidona e a metilcelulose (McKinnon, 1996).

O glicerol tem sido o crioprotetor mais utilizado para o congelamento do sêmen de garanhões (Martin *et al.*, 1979; Loomis *et al.*, 1983; Cochran *et al.*, 1984). Entretanto, altas concentrações de glicerol têm sido responsabilizadas por baixas taxas de gestação obtidas com o sêmen congelado. Segundo Vidament (2005) a concentração de glicerol no diluidor INRA 82 deve ser de 2-3% para que o sêmen apresente uma motilidade adequada após o descongelamento. Quando se utiliza o diluidor lactose-glicose-EDTA (Martin *et al.*, 1979) a concentração ideal poderia ser de 4% (Cochran *et al.*, 1984; Cristanelli *et al.*, 1985). Entretanto, quando se utilizou o diluidor de mínima contaminação proposto por Kenney *et al.* (1983), obteve-se uma motilidade adequada, após o descongelamento, na presença de concentrações de glicerol entre 0 e 2% (Burns e Reasner, 1995).

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

---

<sup>18</sup> Liang Deng, 2013. Equine Center. China Agricultural University. Informação pessoal.

mesmo penetra nas membranas celulares mais facilmente que outros crioprotetores (Amann e Pickett, 1987; Hammersted e Graham, 1992). Tem sido sugerido que o crioprotetor ideal deve ter baixo peso molecular, grande solubilidade em água e mínima toxicidade. Assim, observa-se que a maioria das amidas possui peso molecular mais baixo que o glicerol, ou seja, podem induzir menores danos osmóticos aos espermatozoides (Alvarenga *et al.*, 2005).

Segundo Vidament *et al.* (2009), a dose tóxica de glicerol para os espermatozoides de jumentos é quase a metade da dose tóxica para o sêmen de garanhões. Assim, além da dimetilformamida, o etilenoglicol, tem sido utilizado visando substituir o glicerol, como crioprotetor, para o congelamento do sêmen do garanhão, com sucesso variável, quanto às taxas de gestação obtidas.

Em 2012, Rota *et al.* compararam a utilização do glicerol ou etileno-glicol como crioprotetores para o congelamento do sêmen asinino, quando utilizou-se o diluidor INRA-96 com 2% de gema de ovo + glicerol ou etilenoglicol. Os resultados foram similares para os dois crioprotetores utilizados.

Em um estudo realizado por Jepsen *et al.* (2010) visando congelar o sêmen asinino, utilizou-se o diluidor EZ Mixin® + 20% gema de ovo + 4% de glicerol, com o qual se obteve uma taxa de gestação de 0%. Quando o glicerol foi substituído pelo etileno-glicol (EZ Mixin® + 20% gema de ovo + 2% etilenoglicol) a taxa de gestação das éguas foi de 6,3% (1/15). Assim, de acordo com os autores, parece que outros fatores, que não apenas o crioprotetor, foram responsáveis pelas baixas taxas de gestação obtidas.

Em 1996, Trimeche *et al.* avaliaram o efeito da incorporação da glutamina em um diluidor para o resfriamento do sêmen asinino, a saber, o diluidor INRA 82 acrescido de 4% de glicerol e 2% de gema de ovo. Ao utilizarem diferentes concentrações de glutamina, observaram que a mesma não protegeu os espermatozoides no transcorrer do processo de resfriamento.

Em 2009, Vidament *et al.* compararam a resistência dos espermatozoides de jumentos e garanhões, no sêmen fresco, resfriado ou congelado, diluídos no diluidor INRA 82, bem como os resultados de fertilidade 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. Enfatizaram, ainda, que a sensibilidade dos espermatozoides dos jumentos ao glicerol, não parece ser a única responsável pelo insucesso do sêmen congelado de asininos, pois, a sua substituição pela dimetilformamida não melhorou os resultados de fertilidade.

Alguns pesquisadores tem chamado a atenção para a remoção do glicerol após o descongelamento. Em 1998, Trimeche *et al.* congelaram o sêmen asinino em diluidor T2-94 (glicose-rafinose-lactose-citrato de sódio-citrato de potássio- glicerol – gema de ovo de codorna – antibióticos – leite desnatado e água) e o utilizaram para inseminar jumentas, quando obteve-se taxa de gestação de 0% (0/17). Entretanto, ao removerem o glicerol após o descongelamento, 62% (8/13) das jumentas se tornaram gestantes. Neste mesmo sentido, Castejón (2005) congelou o sêmen asinino em diluidor lactose-EDTA-2,5% de glicerol, sendo o sêmen dividido em duas partes, após o descongelamento. A primeira parte foi rediluída e a segunda parte, submetida à eliminação do glicerol, quando obteve-se taxas de gestação de 0% (0/9) e 11,11% (1/9), respectivamente.

Em um estudo realizado por Vidament *et al.* (2009) também procurou-se alternativas para melhorar a fertilidade de jumentas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos, removendo ou diluindo o glicerol após o descongelamento. Quando o sêmen foi rediluído em leite obteve-se taxa de gestação de 0% (0/15). Mesmo quando o sêmen foi centrifugado após o descongelamento, visando a remoção do glicerol, obteve-se taxa de gestação de apenas 13% (1/13). Diante destes resultados, procurou-se outra alternativa para melhorar a taxa de gestação das jumentas, substituindo-se o glicerol pela dimetilformamida. Assim, utilizou-se o sêmen de dois jumentos, sendo cada ejaculado dividido em duas partes, congeladas com 2,1% de glicerol ou 2,2% de dimetilformamida (DMF). As taxas de gestação obtidas foram muito baixas, 0% (0/16) e 11% (3/28), respectivamente, para os diluidores com glicerol ou DMF.

A literatura tem enfatizado que o crioprotetor ideal deve ter baixo peso molecular, grande solubilidade em água e mínima toxicidade. Dentre estes, o etilenoglicol além de possuir peso molecular mais baixo que o glicerol, parece ser menos tóxico às células espermáticas. Assim, optou-se no presente trabalho, pela utilização deste crioprotetor, a uma concentração de 2%, no diluidor 1e de 1,4% no diluidor 2, proposto por Silva Filho (2013).

A gema de ovo vem sendo estudada por mais de 60 anos, tendo sido utilizada tanto em diluidores visando o resfriamento quanto o congelamento do sêmen. No entanto, o mecanismo pelo qual a gema de ovo protege os espermatozoides durante o armazenamento era desconhecido (Manjunath *et al.*, 2002). Entretanto, vários estudos tem demonstrado que a gema de ovo possui efeitos benéficos sobre as células espermáticas de várias espécies. Assim, tem sido incorporada aos diluidores utilizados para a conservação do sêmen por proporcionar grande proteção às membranas espermáticas durante o procedimento de criopreservação, quando protege os espermatozoides do choque pelo frio (Lusignan *et al.*, 2011b). Entretanto, altas concentrações de colesterol, podem exercer um efeito negativo sobre as células espermáticas (Parks *et al.*, 1981). Tem sido descrito que a presença do colesterol pode induzir um estado de decapacitação, inibindo a reação acrossômica (Bergeron *et al.*, 2004). Vale salientar, neste momento, que quando o sêmen é diluído em diluidor contendo gema de ovo, em torno de 80% das BSP's (proteínas do plasma seminal bovino) são sequestradas pelas LDL, não se associando aos espermatozoides (Bergeron *et al.*, 2004). Desta forma, o efluxo de colesterol e fosfolípides é menor, mantendo a viabilidade espermática por um período mais longo. As BSP's participam do processo de capacitação espermática, através da retirada do colesterol e dos fosfolípides da membrana plasmática, e da ligação das células espermáticas às células do oviduto (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).

Neste sentido, Jepsen *et al.* (2010) observaram que 20% de gema de ovo em diluidores de sêmen, foi prejudicial aos espermatozoides de asininos, enquanto o percentual de 5% foi benéfico. Neste estudo, 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% em éguas. Ao substituir-se o glicerol pelo etilenoglicol, obteve-se uma taxa de gestação de 6,3% (1/15), 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% (20/43). Segundo os autores, 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, embora na presença de 20% de gema de ovo, neutralizou-se o efeito negativo da alta percentagem de gema de ovo, resultando em uma taxa de gestação de 58,3% (14/24). 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.

Da mesma forma, Carvalho (2011) também não obteve boas taxas de gestação em éguas (4,76% - 1/21) quando utilizou o sêmen asinino diluído em diluidor contendo 20% de gema de ovo, antes do resfriamento, sendo os jumentos submetidos à coleta fracionada. Sales (2011) também coletou o sêmen de jumentos de forma fracionada, diluindo-o em diluidores contendo 18,57% ou 20% de gema de ovo. Neste estudo, ao inseminar éguas com o sêmen congelado, obteve uma taxa de gestação de 0%. Assim, pode ser que a presença de um alto percentual de gema de ovo no diluidor (20%), tenha sido responsável por conferir uma maior estabilidade à membrana espermática que, associada a uma menor presença de proteínas do plasma seminal, decorrente da utilização da coleta fracionada, possa ter interferido no processo de capacitação espermática, com redução drástica da fertilidade das éguas inseminadas.

De uma maneira geral, nos três estudos mencionados anteriormente, propôs-se a existência de uma interação negativa entre a retirada do plasma seminal e a presença de alta concentração de gema de ovo, respondendo pela contraceptividade do sêmen resfriado ou congelado de jumentos, subsequentemente à uma centrifugação (Jepsen *et al.*, 2010) ou a uma coleta fracionada (Carvalho, 2011; Sales, 2011). Assim, preconiza-se que ao se utilizar o sêmen armazenado resfriado ou congelado de asininos, deve-se diluí-lo em diluidores contendo menores concentrações de gema de ovo.

Ainda sobre a gema de ovo, vale salientar que a sua presença, em um percentual de 20%, em diluidores utilizados por Silva (1988), Ferreira (1993) e Rossi (2008), para a diluição do sêmen asinino, não reduziu as taxas de gestação observadas. Provavelmente, estes resultados estiveram associados à manutenção do plasma seminal, em virtude de em todos estes trabalhos ter sido utilizada a coleta total do sêmen.

Outro importante componente dos diluidores de sêmen é o leite, sendo este um meio isotônico utilizado como diluidor para a preservação espermática, tanto em sua versão integral, quanto na desnatada ou ultrapasteurizada (UHT) (Boeta e Quitero, 2000). O sêmen pode ser diluído diretamente nesses diluidores e armazenado à 4°C ou congelado na presença de um crioprotetor. As micelas de caseína (fosfocaseinatos), as principais proteínas do leite, parecem responder pela proteção espermática, durante a sua preservação *in vitro*. Tem sido demonstrado que as micelas de caseína isoladas a partir do leite podem proteger os espermatozoides dos garanhões, dos caprinos, dos ovinos e os dos touros, durante o armazenamento à 4-5°C (Bergeron e Manjunath, 2006). A ação protetora às células espermáticas, conferida pelo leite, é análoga à da gema de ovo, largamente utilizada como um componente dos diluidores utilizados para o armazenamento do sêmen de touros. Como no caso da gema de ovo, o leite impede a ligação das proteínas BSPs aos espermatozoides de forma a reduzir a perda de lipídios da membrana, enquanto mantém a motilidade dos espermatozoides, bem como a sua viabilidade, durante o armazenamento. Curiosamente, enquanto a proteção dos espermatozoides pela gema de ovo envolve o sequestro de proteínas BSPs pelas LDLs, presentes na gema do ovo (interação proteína-lipoproteína), a proteção do leite desnatado não envolve a participação de lipídios e lipoproteínas. Aqui, são as

micelas de caseína, presentes no leite desnatado, que sequestram as proteínas BSPs (interação proteína- proteína) (Bergeron *et al.*, 2007).

Em um trabalho realizado por Rossi (2008), avaliou-se 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 o sêmen asinino diluído em leite UHT, resfriado e armazenado à 4°C por até 8 horas, obtiveram uma taxa de gestação por ciclo de 45%, quando inseminaram éguas e jumentas.

Em um estudo realizado em 2000, por Boeta e Quintero, ao resfriar-se o sêmen asinino à 5°C por até 48 horas, obteve-se taxas de gestação ao primeiro ciclo, de 76,5% (13/17) para o sêmen diluído em diluidor de leite desnatado UHT e de 54,5% (6/11) para o diluído em diluidor de leite em pó desnatado – glicose.

No presente trabalho, ao comparar-se, no entanto, os diluidores quanto às taxas de gestação observou-se uma superioridade do diluidor 2 – PIVO (2,4% de leite em pó desnatado - 5,5% de lactose - 1,5% de glicose - 0,0925% de EDTA dissódico - 0,0925 de citrato de sódio dihidratado - 1,4% de etilenoglicol - 5% de gema de ovo – antibiótico - água ) em relação ao diluidor 1 - LPDG (2,4% de leite em pó desnatado - 4,9% de glicose – 2,0% de etilenoglicol - 5% de gema de ovo – antibiótico - água), sendo as taxas de gestação de 55,56% (10/18) e 23,81% (5/21), respectivamente.

Em um trabalho realizado por Oliveira (2005), as éguas foram inseminadas com sêmen asinino congelado em diluidor contendo 3% de glicerol + 2 % de dimetil formamida, com uma taxa de gestação de 40% (4/10). Neste sentido, Canisso (2008) também obteve boas taxas de gestação em éguas inseminadas com sêmen asinino congelado, quando da utilização de dois diluidores, a saber: 1-diluidor de glicose-lactose-gema de ovo-EDTA e 2- diluidor de lactose-gema de ovo-glicerol. As taxas de gestação obtidas neste experimento, aos 13 dias, foram de 50% (15/30) para o diluidor 1 e de 53,33% (16/30) para o diluidor 2. Aos 25 dias de gestação, obteve-se taxas de gestação de 46,66% (14/30) e 43,33% (13/30), para os tratamentos T1 e T2, que foram drasticamente reduzidas, aos 35 dias, para 10% (3/30) e 16,6% (5/30), respectivamente. Gama Ker (2009) inseminou éguas com sêmen asinino congelado em diluidor contendo lactose-EDTA-gema de ovo. Neste estudo, utilizou-se 42 éguas (48 ciclos), submetidas a dois tratamentos. Assim, após a detecção de um folículo de 35-40mm, as éguas foram distribuídas em dois grupos, a saber: G1 (n=25): controle folicular realizado a intervalos de 6 em 6 horas, sendo a inseminação realizada após a ovulação; G2 (n=23): aplicação de 2000UI de hCG por via intramuscular e controle folicular a intervalos de 12 em 12 horas, sendo as inseminações realizadas 24 horas após a aplicação da hCG e repetidas 24 horas depois, na ausência de uma ovulação detectada dentro de 48 horas após a aplicação da hCG. As taxas de gestação, aos 13 dias pós-inseminação, foram de 40% (10/25), para as inseminações realizadas pós-ovulação (G1) e de 26% (6/23), para as inseminações realizadas pré-ovulação (G2), não sendo encontradas diferenças ( $p>0,05$ ), quanto às taxas de gestação, entre os grupos.

Jepsen *et al.* (2010) obtiveram uma taxa de gestação em éguas de 58,3% (14/24), quando utilizaram o sêmen asinino congelado em diluidor EZ Mixin® OF + 20% de gema de ovo + 2% de etilenoglicol + 60mM de  $\beta$ -ciclodextrina. Além disso, ao utilizarem o sêmen asinino congelado em diluidor EZ Mixin® + 5% de gema de ovo + 2% de etilenoglicol, obtiveram uma

taxa de gestação de 46,5% (20/43), bem superior ao que se verificou, no presente trabalho, ao se utilizar o mesmo diluidor (diluidor 1), contendo 5% de gema de ovo + 2% de etilenoglicol, quanto à taxa de gestação obtida, de apenas 23,81% (5/21).

Em um estudo realizado na Índia por Legha *et al.*, (2012), congelou-se o sêmen asinino em diluidor contendo lactose-glicose-EDTA-gema de ovo (Martin *et al.*, 1979), quando obteve-se uma taxa de gestação de 43,4% (67/154) para éguas. Este foi, sem dúvida, o trabalho que envolveu o maior número de éguas, em todo o mundo, inseminadas com o sêmen congelado de asininos e com resultados comercialmente aceitáveis.

Diferentemente dos resultados obtidos por estes autores, Sales (2011) obteve uma taxa de gestação de 0% (0/18) em éguas, ao utilizar o sêmen asinino congelado em diluidor de lactose-glicerol, com 20% de gema de ovo. Acredita-se que a alta concentração de gema de ovo, adicionada ao sêmen coletado de forma fracionada, tenha sido responsável pelos inaceitáveis resultados obtidos, provavelmente, por um bloqueio da capacitação espermática advindo dos procedimentos.

Com relação às inseminações em jumentas, Trimeche *et al.* (1998) observaram uma taxa de gestação de 0% (0/17) em jumentas inseminadas com o diluidor T2-94 (sem desglicerolização), contendo glicose-rafinose-lactose-citrato de sódio-citrato de potássio-glicerol-gema de ovo de codorna-antibióticos-leite desnatado e água destilada. Na presença do mesmo diluidor, porém com o sêmen sendo submetido à retirada do glicerol, após o descongelamento, obtiveram uma taxa de gestação de 62% (8/13). Entretanto, tais resultados não foram repetidos em estudos posteriores, nem mesmo, pelo próprio INRA, na França.

Rozas (2005) obteve uma taxa de gestação de apenas 11% (1/9), em jumentas, quando utilizou um diluidor contendo lactose-EDTA-ciclodextrina, com 2,5% de dimetilformamida (DMF). Por outro lado, quando utilizou o diluidor lactose-EDTA, com 2,5% de glicerol, obteve uma taxa de gestação de 0% (0/4), o mesmo acontecendo na presença de um diluidor lactose-EDTA, com 2,5% de dimetilformamida (0% - 0/8).

Oliveira (2005) também não obteve nenhuma gestação em seu trabalho, quando inseminou jumentas. Neste estudo, o autor congelou o sêmen asinino utilizando seis relações percentuais de crioprotetores, em um mesmo diluidor (MP50), a saber: 1) 2% de dimetil sulfóxido + 2% de dimetil formamida; 2) 3% de dimetil formamida; 3) 2% de dimetil acetamida + 2% de glicerol; 4) 3% de dimetil acetamida; 5) 3% de glicerol + 2% de dimetil formamida; 6) 3% de dimetil sulfóxido + 2% de glicerol. Das 53 jumentas inseminadas, obteve-se, neste estudo, uma taxa de gestação de 0% (0/53). Diante desses resultados, desenvolveu-se outros experimentos visando melhorar a fertilidade do sêmen congelado asinino. Assim, utilizou-se o diluidor de congelamento contendo 3% de glicerol + 2% de dimetilformamida, para inseminar as jumentas, com doses inseminantes de 800 ou 1600 x 10<sup>6</sup> espermatozoides totais. De 20 inseminações realizadas, 0% das jumentas tornaram-se gestantes. Mesmo quando o sêmen foi submetido à desglicerolização, após o descongelamento, obteve-se uma taxa de gestação de 0% (0/10).

Em um trabalho realizado por Catejón (2005), observou-se apenas uma gestação em jumentas, de 18 ciclos utilizados. Esta gestação foi obtida a partir do congelamento do sêmen asinino em diluidor contendo lactose-EDTA e 2,5% de glicerol, submetido à eliminação do glicerol, após o descongelamento (11,11% - 1/9). Quando o sêmen foi rediluído, sem eliminação do glicerol, a taxa de gestação foi de 0% (0/9). Vidament *et al.* (2009) obtiveram uma taxa de gestação de

13% (1/13) em jumentas, quando utilizaram o diluidor INRA82 + 2,2% de glicerol. Neste estudo, o sêmen foi rediluído após o descongelamento com 11mL de leite, centrifugado, descartando-se o sobrenadante e acrescentando-se 1mL de leite ao pellet. Quando utilizou-se o diluidor INRA82 + 2% de gema de ovo + 2,2% de dimetilformamida, a taxa de gestação foi de 11% (3/28).

Em um estudo conduzido por Rota *et al.* (2012), as fêmeas asininas foram inseminadas com sêmen diluído em diluidor INRA96+2% gema de ovo + glicerol, rediluído em plasma seminal após o descongelamento e obtiveram uma taxa de gestação de 61,54% (8/13). Entretanto, quando utilizou-se o sêmen congelado no diluidor INRA96+2% de gema de ovo + glicerol, rediluído em INRA96 após o descongelamento, a taxa de gestação foi de 23,1% (3/13). A substituição do glicerol por etileno-glicol, no diluidor INRA96 + 2% de gema de ovo + etilenoglicol, rediluído em INRA96 após o descongelamento, resultou em uma taxa de gestação de 25% (2/8). Finalmente, obteve-se uma taxa de gestação de 20% (1/5) quando utilizou-se o sêmen congelado no diluidor INRA96 + 2% de gema de ovo + glicerol, sem rediluição, pré-inseminação artificial. Diante dos resultados obtidos, no presente estudo, acredita-se que a incorporação de plasma seminal ao sêmen, após o descongelamento, pré-inseminação, tenha proporcionado a obtenção dos resultados animadores, possivelmente, por ter interferido positivamente no controle da reação inflamatória observada no útero das fêmeas, acompanhando a utilização do sêmen congelado.

#### 5.2.1.3 Número de ciclos estrais submetidos à tratamentos (antibióticos, PGF<sub>2</sub>α, oxitocina), considerando-se o efeito do diluidor, independentemente do jumento

Em sete dos trinta e nove ciclos utilizados, foram realizados tratamentos com antibióticos, PGF<sub>2</sub>α e oxitocina, devido a presença de líquido intra-uterino (Tab. 5.6). De cinco fêmeas tratadas, inseminadas com o diluidor 1, duas receberam doses de antibiótico enquanto que das inseminadas com o diluidor 2, uma recebeu antibiótico, de duas fêmeas tratadas.

Tabela 5.6. Número de ciclos estrais submetidos ou não à tratamentos (antibióticos, PGF<sub>2</sub>α, oxitocina), considerando-se o diluidor, independentemente do jumento

Tratamento durante o ciclo estral	Tratamento		Total
	D1	D2	
Sim	5/39 (12,82%)	2/39 (5,13%)	7/39 (17,95%)
Não	16/39 (41,03%)	16/39 (41,03%)	32/39 (85,05%)
Total	21/39 (53,85%)	18/39 (46,15%)	39/39 (100,00%)

#### 5.2.2 Efeito do jumento sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado

Neste estudo, as fêmeas equinas foram distribuídas de acordo com a categoria reprodutiva, considerando-se o efeito do jumento, independentemente do diluidor (Tab. 5.7).

Tabela 5.7. Distribuição dos ciclos estrais por categoria reprodutiva, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor

Categoria reprodutiva	Jumentos		Total
	J1	J2	
Potra	1/39 (2,56%)	2/39 (5,13%)	3/39 (7,69%)
Égua solteira	6/39 (15,38%)	6/39 (15,38%)	12/39 (30,77%)
Égua no “cio do potro”	3/39 (7,69%)	1/39 (2,56%)	4/39 (10,26%)
Égua com potro ao pé	11/39 (28,21%)	9/39 (23,08%)	20/39 (51,28%)
Total	21/39 (53,85%)	18/39 (46,15%)	39/39 (100,00%)

p>0,05

#### 5.2.2.1 Características biométricas e fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga.

No que se refere aos parâmetros de controle, observa-se que a idade, o peso corporal e o escore da condição corporal das éguas inseminadas, não diferiram ( $p>0,05$ ) entre os jumentos, caracterizando uma homogeneidade adequada entre os mesmos (Tab. 5.8).

Tabela 5.8. Características biométricas e fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor

Variáveis Biométricas	Jumentos	
	Jumento 1	Jumento 2
Número de éguas	16	18
Número de ciclos	21	18
Idade das éguas (anos)	8,88±0,79	10,00±0,88
Peso corporal das éguas (Kg)	354,86±9,16	378,78±10,70
Escore da condição corporal	3,12±0,11	3,14±0,12
Taxa de gestação/ciclo	28,57%(6/21)	50% (9/18)

Observa-se, na Tabela 5.8, que as taxas de gestação por ciclo, não diferiram ( $p>0,05$ ) entre os dois jumentos utilizados no presente estudo. Possivelmente, o pequeno número de éguas inseminadas com cada reprodutor pode ter sido insuficiente para que as diferenças individuais se manifestassem.

Independentemente da forma de utilização do sêmen (monta natural, inseminação artificial com sêmen fresco, resfriado ou congelado), a literatura é unânime no que diz respeito às variações individuais, no que se refere à fertilidade do reprodutor. Segundo Amann *et al.* (1987) a motilidade e a fertilidade do sêmen descongelado difere muito entre os garanhões. Alguns garanhões apresentam sêmen de boa qualidade após a coleta; no entanto, o sêmen vai perdendo a sua qualidade durante o resfriamento com poucos espermatozoides sobrevivendo ao processo (Brinsko *et al.*, 2000). Estima-se que apenas 30-40% dos garanhões produzam sêmen adequado para a criopreservação (Alvarenga *et al.*, 2003).

Em 1993, Ferreira comparou as características físicas do ejaculado de três jumentos, observando, diferenças entre eles, com superioridade de um em relação aos demais, quando

submetidos ao processo de resfriamento do sêmen. As taxas de concepção obtidas naquele experimento foram de 80% para o sêmen resfriado por até 24 horas e de 75,9% quando o sêmen foi resfriado por 48 horas. Entretanto, Ferreira (1993) utilizou apenas o sêmen do melhor jumento para a inseminação das éguas.

Em um estudo envolvendo o sêmen de cinco jumentos da raça Pêga, Rossi (2008) observou diferenças significativas no que diz respeito às características seminais, entre os jumentos, quanto ao volume de sêmen, concentração espermática por mL, concentração de espermatozoides móveis por mL, número total de espermatozoides por ejaculado e número total de espermatozoides móveis por ejaculado para o sêmen fresco diluído. Quando as coletas foram destinadas ao resfriamento, houve diferença, ainda, na motilidade espermática do sêmen *in natura* e após diluição e resfriamento. Neste experimento, observou-se, ainda, que a fertilidade diferiu entre os jumentos quando da utilização do sêmen fresco diluído, com taxas de gestação por ciclo variando de 35,71% a 71,43%, sendo esta diferença acentuada quando as éguas foram inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5°C por até 12 horas (36,21 a 74,47). Neste experimento, utilizou-se 77 ciclos para inseminação de éguas com sêmen fresco diluído e 195 quando o sêmen foi resfriado.

Carvalho (2011) realizou a coleta dos três primeiros jatos do ejaculado de cinco jumentos da raça Pêga e observou diferenças significativas entre os machos quanto às características físicas do sêmen. Houve, neste estudo, diferenças quanto a motilidade espermática do sêmen *in natura* e após a diluição, vigor espermático do sêmen *in natura*, número de espermatozoides totais e móveis por mL e número de espermatozoides totais e móveis por ejaculado. No entanto, tais diferenças não influenciaram as taxas de gestação obtidas ( $p>0,05$ ), que não diferiram entre os reprodutores. Segundo a autora, entretanto, diferenças entre as taxas de gestação podem não ter sido observadas devido ao pequeno número de ciclos utilizados por jumento.

5.2.2.2 Número de ciclos estrais submetidos à tratamentos (antibióticos,  $\text{PGF}_2\alpha$ , oxitocina), considerando-se o jumento, independentemente do diluidor.

Algumas éguas do experimento foram tratadas com antibióticos,  $\text{PGF}_2\alpha$  e oxitocina antes da inseminação, pois apresentavam líquido intrauterino. O número de éguas tratadas por jumento está apresentado na Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Número de ciclos estrais submetidos à tratamentos (antibióticos,  $\text{PGF}_2\alpha$ , oxitocina) considerando-se o jumento, independentemente do diluidor

Tratamento durante o ciclo estral	Jumento		Total
	J1	J2	
Sim	5/39 (12,82%)	2/39 (5,13%)	7/39 (17,95%)
Não	16/39 (41,03%)	16/39 (41,03%)	32/39 (82,05%)
Total	21/39 (53,85%)	18/39 (46,15%)	39/39 (100,00%)

$P>0,05$

5.2.2.3. Características do sêmen após o descongelamento, no momento da inseminação, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor

Dentre os fatores que podem alterar a eficiência reprodutiva de um rebanho, a qualidade seminal merece uma consideração especial. Neste sentido, foram avaliados a motilidade (0-100%) e o

vigor (0-5) do sêmen após o descongelamento, caracterizados como muito bom, médio ou ruim (Tab. 5.10). Na Tabela 8.2 dos anexos, estão representadas as características seminais e a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado de jumentos, por diluidor e jumento. O número de palhetas utilizadas em cada inseminação não variou entre os tratamentos, sendo utilizadas dez palhetas por inseminação. Entretanto, o número de espermatozoides móveis/dose inseminante, no momento da inseminação artificial variou entre os diluidores e jumentos, em virtude das variações detectadas quanto à motilidade e vigor espermáticos ao descongelamento.

Tabela 5.10. Características do sêmen após o descongelamento, no momento da inseminação, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor

Características do sêmen	Jumento		Total
	J1	J2	
Muito bom	13/33 (39,39%)	18/33 (54,55%)	31/33 (93,94%)
Médio	1/33 (3,03%)	0/33 (0,00%)	1/33 (3,03%)
Ruim	1/33 (3,03%)	0/33 (0,00%)	1/33 (3,03%)
Total	15/33 (45,45%)	18/33 (54,55%)	33/33 (100,00%)

### 5.3. Características do estro e da indução da ovulação de éguas inseminadas

5.3.1. Características do estro e da indução da ovulação de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento.

As características do cio e da indução da ovulação de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga apresentadas na Tabela 5.11, não diferiram ( $p>0,05$ ) entre os diluidores, caracterizando uma homogeneidade adequada entre os tratamentos.

Tabela 5.11. Características do cio e da indução da ovulação de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento

Variáveis	Tratamentos	
	Diluidor 1	Diluidor 2
Intervalo parto/ovulação (dias)	41,15±7,65	57,00±10,34
Tamanho do folículo à indução (mm)	37,91±0,80	37,50±0,69
Escore do edema na indução (1-3)	2,27±0,18	2,33±0,17
Número de controles foliculares da indução à ovulação	4,81±0,61	4,78±0,21
Tamanho do folículo no último controle folicular (mm)	37,62±0,82	38,00±0,91
Escore do edema uterino no último controle folicular (1-3)	1,63±0,52	1,97±0,20
Intervalo da aplicação da hCG à ovulação (horas)	40,20±4,42	38,72±1,47
Intervalo da aplicação da hCG à inseminação artificial (horas)	40,50±4,43	39,00±1,45
Intervalo da detecção da ovulação à inseminação artificial (minutos)	19,95±1,33	18,88±1,69

A indução da ovulação, no presente trabalho, foi realizada somente quando se observou a presença de um folículo com no mínimo 34mm de diâmetro e de edema uterino intramural. Desta forma, o número de controles foliculares da indução à ocorrência da ovulação foi em média de  $4,78 \pm 0,21$  a  $4,81 \pm 0,61$  controles por ciclo.

### 5.3.2. Características do cio e da indução da ovulação de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor

Às características do cio e da indução da ovulação de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor, estão apresentadas na Tabela 5.12. Pode-se observar algumas diferenças entre os indivíduos, no que se refere ao escore do edema na indução ( $2,03 \pm 0,18$  e  $2,60 \pm 0,12$ mm, respectivamente, para os jumentos 1 e 2), ao número de controles foliculares da indução à ovulação ( $4,61 \pm 0,57$  e  $5,00 \pm 0,09$ , respectivamente, para os jumentos 1 e 2), e ao tamanho do folículo no último controle folicular ( $39,10 \pm 0,87$  e  $36,28 \pm 0,69$ mm, respectivamente, para os jumentos 1 e 2). Entretanto, essas diferenças não influenciaram nas taxas de concepção/ciclo, obtidas no presente estudo (Tab. 5.8).

Tabela 5.12. Características do cio e da indução da ovulação de éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor

Parâmetros avaliados	Jumentos	
	Jumento 1	Jumento 2
Intervalo parto/ovulação (dias)	$39,92 \pm 6,45$	$58,60 \pm 11,41$
Tamanho do folículo à indução da ovulação (mm)	$38,33 \pm 0,88$	$36,97 \pm 0,46$
Escore do edema na indução (mm)	$2,03 \pm 0,18^b$	$2,60 \pm 0,12^a$
Número de controles foliculares da indução à ovulação	$4,61 \pm 0,57^b$	$5,00 \pm 0,09^a$
Tamanho do folículo no último controle folicular (mm)	$39,10 \pm 0,87^a$	$36,28 \pm 0,69^b$
Escore do edema uterino no último controle folicular (1-3)	$1,50 \pm 0,16$	$2,11 \pm 0,18$
Intervalo da aplicação da hCG à ovulação (horas)	$39,29 \pm 4,15$	$39,55 \pm 0,63$
Intervalo da aplicação da hCG à inseminação artificial (horas)	$39,59 \pm 4,15$	$39,84 \pm 0,62$
Intervalo da detecção da ovulação à inseminação artificial (minutos)	$21,00 \pm 1,76$	$17,78 \pm 0,92$

### 5.3.3 Momento da indução da ovulação

A indução da ovulação, no presente estudo, foi realizada somente na presença de um folículo com no mínimo 34mm de diâmetro e de edema uterino intramural (Tab. 8.3 dos anexos). O tamanho do folículo à indução obedeceu ao preconizado na literatura, por vários autores, os quais indicam que o momento mais oportuno para induzir a ovulação com hCG, requer a presença de considerável edema uterino e de um folículo entre 35 e 40mm de diâmetro, momento em que o folículo encontra-se mais responsivo ao LH (Palmer, 1993; Samper, 1997). Após a indução da ovulação, a maioria das éguas irá ovular no intervalo de tempo de 36 à 48 horas da indução, embora possa haver uma variação individual acentuada atribuída ao diâmetro ovulatório de cada animal (Samper, 1997), bem como ao tamanho do folículo dominante presente no momento da indução e do seu estágio de maturação. Assim, em um trabalho

conduzido por Samper (1997) obteve-se 95% de eficácia nos dois primeiros ciclos. Barbacini *et al.* (2000) descreveram que a administração da hCG foi capaz de induzir a ovulação dentro de 48 horas, em 80% das éguas. Entretanto, ressalta que a distribuição das ovulações pode se dar em um intervalo de zero à 72 horas. No presente experimento, 97,06% (33/34) das éguas induzidas apresentaram ovulação dentro do período esperado, ou seja, dentro de 48 horas após a indução, enquanto apenas 2,94% (1/34) das fêmeas tenha ovulado após 100 horas da indução. O intervalo médio da indução com hCG à ovulação, considerando-se apenas as éguas inseminadas com o diluidor 1, foi de  $41,21 \pm 8,00$  horas para as éguas inseminadas com o sêmen do jumento 1 e de  $39,59 \pm 1,45$  horas para as éguas inseminadas com o sêmen do jumento 2. Por outro lado, o intervalo médio da indução à ovulação, considerando-se apenas as éguas inseminadas com o diluidor 2, foi de  $37,70 \pm 2,98$  horas para as éguas inseminadas com o sêmen do jumento 1 e de  $39,74 \pm 0,21$  horas para as éguas inseminadas com o sêmen do jumento 2.

Segundo Barbacini *et al.* (2000), a hCG foi a primeira droga utilizada para induzir a ovulação de éguas, sendo, provavelmente, a mais utilizada em todo o mundo. Entretanto, apesar de muito utilizada como agente indutor da ovulação, a hCG induz a formação de anticorpos após aplicações sucessivas. Segundo McCue *et al.* (2004), Sullivan *et al.* (1973) foram os primeiros a relatar que a eficácia da hCG é reduzida quando administrada por mais de duas vezes em uma mesma estação de monta. McCue *et al.* (2004) também descreveram que repetidas doses da hCG, durante a estação de monta, responderam por uma menor eficácia da droga para a indução da ovulação, sugerindo que a mesma deve 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 exceto uma, ovularam dentro de 48 horas da aplicação da hCG.

Uma única dose da hCG tem sido utilizada para induzir a ovulação. Aparentemente, não existe uma dose padrão a ser utilizada, que tem variado, desta forma, de 1000 UI a 6000 UI ou mais, sendo que na maioria das vezes, utiliza-se doses entre 2000 e 3000 UI (Bergefelt, 2000). Neste sentido, ao administrar 5000 UI de hCG, na presença de um folículo de 36mm de diâmetro, em um dos ovários, Castejón (2005) verificou que em 18 ciclos reprodutivos de seis jumentas, todas as ovulações ocorreram no intervalo de 36 a 48 horas após a sua indução. Em um estudo realizado por Sales (2011), utilizou-se 1666 UI da hCG para a indução da ovulação, na presença de um folículo com no mínimo 34mm de diâmetro e de edema uterino intramural. Neste estudo, observou-se que 100% das éguas induzidas ovularam dentro do período esperado, que foi em média, de 40 horas após a 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 5.000 UI foi dividida igualmente e utilizada em três éguas, dose suficiente para induzir a ovulação, em 97,06% dos ciclos, dentro de 48 horas da sua aplicação.

#### 5.3.4 Distribuição das ovulações das éguas a diferentes intervalos de tempo (horas) após à aplicação da hCG

No presente experimento, a maioria das éguas 79,41% (27/34) ovularam no intervalo de 32 a 48 horas da administração da hCG, devendo-se salientar que o agente indutor da ovulação só foi aplicado quando as éguas apresentavam folículos de, no mínimo, 34mm e edema uterino (Tab. 5.13).

O momento de deposição do sêmen em relação à ovulação é de fundamental importância quando se estuda fertilidade (Silva Filho *et al.*, 1998), pois exerce forte efeito sobre as taxas de

gestação obtidas, principalmente quando se utiliza sêmen congelado. Quando a inseminação é realizada previamente à ovulação, a fertilização dependerá da viabilidade espermática no sistema genital da fêmea (Woods *et al.*, 1990), que pode ser de 24 horas a sete dias para o sêmen fresco (Woods *et al.*, 1990; Sieme *et al.*, 2003), de 24 a 48 horas para o sêmen equino resfriado (Silva Filho *et al.*, 1998; Sieme *et al.*, 2003) e de apenas 12 horas quando se utiliza o sêmen congelado (Sieme *et al.*, 2003), dependendo do reprodutor utilizado. Vale salientar, neste momento, que a vida média dos espermatozoides submetidos ao congelamento é bem mais curta que a dos espermatozoides oriundos do sêmen fresco (Leite, 1994), para a maioria dos reprodutores equídeos. Por outro lado, quando a inseminação é realizada após a ovulação, a viabilidade do oócito será o fator de maior influência sobre o sucesso ou não da fertilização (Woods *et al.*, 1990), viabilidade que pode variar de 8 a 10 horas (Chang, 1951; Hunter, 1990). A partir de 12 horas após a liberação do oócito, ocorrerá um processo de degeneração nuclear, acompanhado por um pareamento imperfeito dos cromossomos na placa metafisária, bem como pela ausência do denominado bloqueio vitelínico advindo do funcionamento imperfeito dos grânulos corticais, que podem levar à morte do embrião. Assim, a inseminação artificial deve ser realizada no momento adequado, de forma que tanto o gameta masculino quanto o feminino estejam viáveis no momento da fertilização (Jacob *et al.*, 2000).

No presente experimento, empregou-se o protocolo de inseminações artificiais dentro de, no máximo, 8 horas pós-ovulação em virtude das éguas serem submetidas a controles foliculares de 8 em 8 horas, a partir da aplicação do hormônio indutor da ovulação. Assim, as inseminações foram realizadas em média, de  $37,98 \pm 2,94$  a  $41,21 \pm 8,00$  horas após a administração da hCG (Tab. 8.3 dos anexos). Desta forma, o período médio da ovulação à inseminação ocorreu dentro do considerado ideal por diversos autores, compreendendo o intervalo de até 8 horas pós-ovulação (Hunter, 1990). Se realizada apenas uma inseminação artificial em tempo fixo (IATF), às 32 horas após a indução da ovulação pela hCG, 67,76% (21/34) das éguas teriam sido inseminadas dentro de um período de  $\pm 8$  horas da ovulação, considerado aceitável pela maioria dos pesquisadores para obtenção de bons resultados de fertilização. Considerando-se um período de 16 horas antes da ovulação até 8 horas depois dela, verifica-se que 91,18% (31/34) das éguas teriam sido inseminadas dentro deste período, considerado comercialmente utilizável diante da reduzida viabilidade do oócito (Hunter, 1990; Sieme *et al.*, 2003) e de um maior período de sobrevivência das células espermáticas descongeladas, de até 24 horas (Kloppe *et al.*, 1998) no sistema genital das éguas. Observa-se, entanto, que tal viabilidade dos espermatozoides apresenta grande variação entre os reprodutores da espécie asinina.

Entretanto, Sieme (2003) recomenda a inseminação dentro de no máximo 12 horas, após a ocorrência da ovulação. Vale enfatizar, neste sentido, que quanto maior o período entre a ovulação e a inseminação com sêmen congelado maior será a taxa de perda embrionária (Woods *et al.*, 1990), em virtude das alterações degenerativas que acontecem no oócito a partir de 8-10 horas após a ovulação (Hunter, 1990).

Em um estudo conduzido por Kloppe *et al.* (1988), avaliou-se o efeito do momento da inseminação em relação à ovulação sobre a fertilidade de éguas, utilizando-se o sêmen a fresco ou congelado de um garanhão. Quando utilizou-se o sêmen a fresco, as inseminações foram realizadas a cada dois dias, até a ovulação, a partir da detecção de um folículo de 35mm de diâmetro. As inseminações com sêmen congelado foram realizadas diariamente durante o estro, a partir da detecção de um folículo de 35mm de diâmetro, até a ovulação ou apenas uma única vez, dentro de seis horas após a detecção da mesma. Com ênfase nos resultados do sêmen congelado, observou-se, neste estudo, que inseminações diárias até a ovulação, ou uma única

inseminação, dentro de seis horas após a sua ocorrência, responderam por taxas de gestação aceitáveis (60 e 55%, respectivamente).

Oliveira (2005) inseminou dez éguas pós-ovulação com sêmen congelado asinino. As inseminações foram realizadas até seis horas após a detecção da ovulação, quando obteve-se taxa de gestação de 40% (4/10). No mesmo sentido, Canisso (2008) estudou a fertilidade do sêmen congelado de asinino, tendo como ponto final a taxa de gestação de fêmeas equinas. Neste estudo, o autor realizou as inseminações dentro de 6 horas após a detecção da ovulação, quando obteve taxas de gestação variando de 50% (15/30) a 53,33% (16/30), dependendo do diluidor utilizado.

Em um trabalho realizado por Gama Ker (2009), utilizou-se o sêmen asinino congelado para inseminar fêmeas equinas, distribuídas em dois grupos. Assim, após a detecção de um folículo de 35-40mm, as éguas foram distribuídas em dois grupos, a saber: G1 - controle folicular realizado a intervalos de 6 em 6 horas, sendo a inseminação realizada após a ovulação (n=25); G2 - aplicação de 2000UI de hCG por via intramuscular e controle folicular a intervalos de 12 em 12 horas, sendo as inseminações realizadas 24 horas após a aplicação da hCG e repetidas 24 horas depois, na ausência de uma ovulação detectada dentro de 48 horas após a aplicação da hCG (n=23). As taxas de gestação, aos 13 dias pós-inseminação, foram de 40% (10/25), para G1, em que as éguas foram inseminadas pós-ovulação e de 26% (6/23), para as inseminações realizadas pré-ovulação (G2), não sendo encontradas diferenças ( $p>0,05$ ), quanto às taxas de gestação, entre os grupos.

Jepsen *et al.* (2010) utilizaram duas inseminações por ciclo, sendo a primeira 6 horas pré-ovulação e a segunda, 6 horas pós-ovulação. De 24 éguas inseminadas com o sêmen congelado de jumento, 14 tornaram-se gestantes (58,3%).

Tabela 5.13. Distribuição das ovulações à diferentes intervalos de tempo (horas), após à aplicação da hCG

Intervalo de tempo (horas)	Número de ovulações	Percentual de ovulações	Percentual acumulativo de ovulações	Média de ocorrência das ovulações (horas)	Amplitude de ocorrência das ovulações (horas)
0 a < 8	0	0,00	0,00	0,00	–
8 a < 16	1	2,94	2,94	15,77	15,77
16 a < 24	1	2,94	5,88	17,25	17,25
24 a < 32	4	11,76	17,65	29,44±1,67	24,45 – 31,42
32 a < 40	17	50,00	67,65	39,30±0,12	38,32 – 39,95
40 a < 48	10	29,41	97,06	42,06±0,85	40,17 - 47,05
≥ 48	1	2,94	100,00	100,67	100,67
Total	34	100,00	–	–	–

### 5.3.5 Distribuição das ovulações ao longo do dia

Quanto à distribuição das ovulações ao longo do dia, por diluidor e jumento, no presente experimento, a maioria das éguas (19/39) ovulou na parte da manhã (Tab. 5.14). Nas Tabelas 5.15 e 5.16, os dados estão apresentados de acordo com a distribuição das ovulações ao longo

do dia considerando-se o diluidor, independentemente do jumento ou o jumento, independentemente do diluidor, respectivamente. Independentemente da forma de avaliação, observou-se que a maioria das ovulações ocorreu na parte da manhã.

Tabela 5.14. Distribuição das ovulações ao longo do dia por diluidor e jumento

Momento da ovulação	Tratamentos				Total
	D1J1	D1J2	D2J1	D2J2	
Manhã (6:00 horas)	5/39 (12,82%)	5/39 (12,82%)	5/39(12,82%)	4/39 (10,26%)	19/39 (48,72)
Tarde (14:00 horas)	6/39 (15,38%)	2/39 (5,13%)	2/39(5,13%)	3/39 (7,69%)	13/39 (33,33%)
Noite (22:00 horas)	1/39 (2,56%)	2/39 (5,13%)	2/39(5,13%)	2/39 (5,13%)	7/39 (17,95%)
Total	12/39 (30,77%)	9/39 (23,08%)	9/39(23,08%)	9/39 (23,08%)	39/39 (100,00%)

P>0,05 D1 - D2 - Diluidor 1 e 2; J1 - J2- Jumentos 1 e 2

Tabela 5.15. Distribuição das ovulações ao longo do dia considerando-se o diluidor, independentemente do jumento

Momento da ovulação	Diluidor		Total
	D1	D2	
Manhã (6:00 horas)	10/39 (25,64%)	9/39 (23,08%)	19/39 (48,72%)
Tarde (14:00 horas)	8/39 (20,51%)	5/39 (12,82%)	13/39 (33,33%)
Noite (22:00 horas)	3/39 (7,69%)	4/39 (10,26%)	7/39 (17,95%)
Total	21/39 (53,85%)	18/39 (46,15%)	39/39 (100,00%)

Tabela 5.16. Distribuição das ovulações ao longo do dia, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor

Momento da ovulação	Jumento		Total
	J1	J2	
Manhã (6:00 horas)	10/39 (25,64%)	9/39 (23,08%)	19/39 (48,72%)
Tarde (14:00 horas)	8/39 (20,51%)	5/39 (12,82%)	13/39 (33,33%)
Noite (22:00 horas)	3/39 (7,69%)	4/39 (10,26%)	7/39 (17,95%)
Total	21/39 (53,85%)	18/39 (46,15%)	39/39 (100,00%)

P>0,05

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

Os dados referentes à distribuição das éguas de acordo com o escore de edema uterino, no momento da administração da hCG, estão apresentados nas tabelas 5.17, 5.18 e 5.19. Já a distribuição do escore de edema uterino quando do último controle folicular estão apresentados nas tabelas 5.20, 5.21 e 5.22.

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

Tabela 5.17. Distribuição do escore de edema uterino quando da indução da ovulação por diluidor e jumento

Escore de edema uterino	Tratamentos				Total
	D1J1	D1J2	D2J1	D2J2	
1,0	1/31 (3,23%)	0/31 (0,00%)	2/31 (6,45%)	0/31 (0,00%)	3/31 (9,68%)
1,5	1/31 (3,23%)	0/31 (0,00%)	1/31 (3,23%)	0/31 (0,00%)	2/31 (6,45%)
2,0	2/31 (6,45%)	3/31 (9,68%)	4/31 (12,90%)	2/31 (6,45%)	11/31 (35,48%)
2,5	1/31 (3,23%)	1/31 (3,23%)	0/31 (0,00%)	1/31 (3,23%)	3/31 (9,68%)
3,0	2/31 (6,45%)	2/31 (6,45%)	2/31 (6,45%)	6/31 (19,35%)	12/31 (38,71%)
Total	7/31 (22,58%)	6/31 (19,35%)	9/31 (29,03%)	9/31 (29,03%)	31/31 (100,00%)

p>0,05

Tabela 5.18. Distribuição do escore de edema uterino quando da indução da ovulação, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento

Escore de edema uterino	Tratamentos		Total
	D1	D2	
1,0	1/31 (3,23%)	2/31 (6,45%)	3/31 (9,68%)
1,5	1/31 (3,23%)	1/31 (3,23%)	2/31 (6,45%)
2,0	5/31 (16,13%)	6/31 (19,35%)	11/31 (35,48%)
2,5	2/31 (6,45%)	1/31 (3,23%)	3/31 (9,68%)
3,0	4/31 (12,90%)	8/31 (25,81%)	12/31 (38,71%)
Total	13/31 (41,94%)	18/31 (58,06%)	31/31 (100,00%)

Tabela 5.19. Distribuição do escore de edema uterino quando da indução da ovulação, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor

Escore do edema uterino	Jumento		Total
	J1	J2	
1,0	3/31 (9,68%)	0/31 (0,00%)	3/31 (9,68%)
1,5	2/31 (6,45%)	0/31 (0,00%)	2/31 (6,45%)
2,0	6/31 (19,35%)	5/31 (16,13%)	11/31 (35,48%)
2,5	1/31 (3,23%)	2/31 (6,45%)	3/31 (9,68%)
3,0	4/31 (12,90%)	8/31 (25,81%)	12/31 (38,71%)
Total	16/31 (51,61%)	15/31 (48,39%)	31/31 (100,00%)

Tabela 5.20. Distribuição do escore de edema uterino quando do último controle folicular por diluidor e jumento

Escore de edema uterino	Tratamentos				Total
	D1J1	D1J2	D2J1	D2J2	
0,0	0/37 (0,00%)	0/37 (0,00%)	1/37 (2,70%)	0/37 (0,00%)	1/37 (2,70%)
1,0	5/37 (13,51%)	3/37 (8,11%)	2/37 (5,41%)	1/37 (2,70%)	11/37 (29,73%)
1,5	2/37 (5,41%)	0/37 (0,00%)	2/37 (5,41%)	0/37 (0,00%)	4/37 (10,81%)
2,0	3/37 (8,11%)	4/37 (10,81%)	2/37 (5,41%)	4/37 (10,81%)	13/37 (35,14%)
2,5	0/37 (0,00%)	0/37 (0,00%)	1/37 (2,70%)	0/37 (0,00%)	1/37 (2,70%)
3,0	0/37 (0,00%)	2/37 (5,41%)	1/37 (2,70%)	4/37 (10,81%)	7/37 (18,92%)
Total	10/37 (27,03%)	9/37 (24,32%)	9/37 (24,32%)	9/37 (24,32%)	37/37 (100,00%)

p>0,05

Tabela 5.21. Distribuição do escore de edema uterino quando do último controle folicular, considerando-se o diluidor, independentemente do jumento

Escore de edema uterino	Tratamentos		Total
	D1	D2	
0	0/37 (0,00%)	1/37 (2,7%)	1/37 (2,7%)
1,0	8/37 (21,62%)	3/37 (8,11%)	11/37 (29,73%)
1,5	2/37 (5,41%)	2/37 (5,41%)	4/37 (10,81%)
2,0	7/37 (18,92%)	6/37 (16,22%)	13/37 (35,14%)
2,5	0/37 (0,00%)	1/37 (2,7%)	1/37 (2,7%)
3,0	2/37 (5,41%)	5/37 (13,51%)	7/37 (18,92%)
Total	19/37 (51,35%)	18/37 (48,65%)	37/37 (100,00%)

Tabela 5.22. Distribuição do escore de edema uterino quando do último controle folicular, considerando-se o jumento, independentemente do diluidor

Escore de edema uterino	Jumento		Total
	J1	J2	
0,0	1/37 (2,70%)	0/37 (0,00%)	1/37 (2,70%)
1,0	7/37 (18,92%)	4/37 (10,81%)	11/37 (29,73%)
1,5	4/37 (10,81%)	0/37 (0,00%)	4/37 (10,81%)
2,0	5/37 (13,51%)	8/37 (21,62%)	13/37 (35,14%)
2,5	1/37 (2,70%)	0/37 (0,00%)	1/37 (2,70%)
3,0	1/37 (2,70%)	6/37 (16,22%)	7/37 (18,92%)
Total	19/37 (51,35%)	18/37 (48,65%)	37/37 (100,00%)

## 6. CONCLUSÕES

Observou-se neste estudo grande variação individual entre os dois reprodutores da espécie asinina utilizados, quanto às características físicas do sêmen, ao número de doses produzidas por ejaculado e às taxas de gestação obtidas das éguas inseminadas com o sêmen congelado, embora nem sempre as diferenças tenham sido comprovadas estatisticamente;

O protocolo de congelamento utilizado mostrou-se adequado; a sua eficiência foi comprovada pela taxa de gestação das éguas inseminadas (55,56% - 10/18);

O diluidor PIVO, proposto e utilizado no presente estudo, é uma opção viável para o congelamento do sêmen de asininos, principalmente pela taxa de gestação obtida;

A indução da ovulação em éguas pela aplicação de 1666 UI da hCG foi eficiente na presença de um folículo dominante de 37,50 a 37,91mm de diâmetro em um dos ovários, e de edema uterino intra mural variando de 2,27 a 2,33, sendo que 97,06% (33/34) das ovulações ocorreram dentro de 48 horas após a sua indução.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENURINO, A. *et al.* Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, v.53, n.5, p. 1053-1061, 2000.
- ALLEN, W.R.; WILSHER, S.; MORRIS, L. *et al.* Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 94, n.1-4, p. 242-243, 2006.
- ALVARENGA, M.A.; LEÃO, K.M.; PAPA, F.O. *et al.* The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: WORKSHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 12., 2003, Brewster, Massachusetts, USA. *Proceedings...* Brewster, Massachusetts: Havemeyer Foundation, 2003. p. 74-76. (Havemeyer Foundation Monograph Series, 12).
- 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, n.1-4, p.105-113, 2005.
- ALVAREZ, A.L.; SERRES, C.; TORRES, P. *et al.* Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v.94, n.1-4, p.89-91, 2006.
- AMANN, R.P.; CRISTANELLI, M.J.; SQUIRES, E.L. Proteins in stallion seminal plasma. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 35, p. 113-120, 1987.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.R. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.). *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, n.3, p.145-173, 1987.
- 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 (Livre Docência em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- ASADPOUR, R.; JAFARI, R.; TAYEFI-NASRABADI, H. Effect of various levels of catalase antioxidant in semen extenders on lipid peroxidation and semen quality after the freeze-thawing Bull semen. *Vet. Res. Forum*, v.2, n.4, p.218-221, 2011.
- AURICH, C. Seminal extenders for cooled semen (Europe). In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E. *et al.* (Eds.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 2011. p. 1336-1340.
- AURICH, C.; SPERGSER, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.67, n.5, p.912-918, 2007.
- AZEVEDO, R.P.; MENDONÇA, L.A.; LANZA, J.C. *et al.* Eficiência reprodutiva em transferência de embriões equinos utilizando receptoras no cio do potro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.37, n.4, p.365-370, 2013.
- BADER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 32, p. 59-64, 1982.
- BAKAS, L.S.; DISALVO, E.A. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*, v. 28, n.4, p. 347-353, 1991.
- BALL, A.B.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am.J. Vet. Res.*, v.62, n.4, p.508-515, 2011.
- 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*. 2000. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 10 de abril. 2011.

- BARBACCINI, 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, n.6, p. 404-410, 2000.
- BARROS, M.S.R.M. A. *Avaliação in vitro do sêmen caprino criopreservado em diluente acrescido de superóxido dismutase e catalase em diferentes concentrações.* 2010. 69f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Rural de Pernambuco, Recife, PE.
- BASQUES, F.W.A. *A água como reagente.* Labtest, outubro, 2010. Disponível em <www.labtest.com.br >. Acesso em: 12 de maio. 2014
- BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J. *et al.* Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.48, n.3, p.391– 417, 1997.
- BERGEFELT, D.R. Estrous synchronization. mare. In: EQUINE breeding management and artificial insemination. Philadelphia: Saunders, 2000, p.195-228.
- BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P. *et al.* Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.*, v.77, n.1, p.120-126, 2007.
- 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.
- BERLINGUER, F.; LEONI, G.G.; SUCCU, S. *et al.* Cryopreservation of European Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) semen during the non-breeding season is enhanced by the use of trehalose. *Reprod. Domest. Anim.*, v.42, n.2, p.202-207, 2007.
- BERLINER, V.R. Dilutors for stallion and jack semen. *J. Anim. Sci.*, v.1, n.4, p.314-319, 1942.
- BLANCHARD TL, MACPHERSONmL. Breeding mares on foal heat. In: MCKINNON AO, SQUIRES EL, VAALA WE, VARNER DD (Eds.). *Equine reproduction.* 2.ed. Ames, IA: Blackwell, 2011. p.2294-2301.
- 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, n.1, p.67-69, 2000.
- BOGART, R.; MAYER, D.T. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. *J. Anim. Sci.*, v.9, n.2, p.143-152, 1950.
- BORGES, J.C. *Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação in vitro.* 2008. 94f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Uiversidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, SP.
- BORG, K.; COLENDER, B.; FAZELI, A. *et al.* Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morfology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.48, n. 4, p.531-536, 1997.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E *et al.* Processamento e armazenamento das doses inseminantes. In: INSEMINAÇÃO artificial na suinocultura tecnificada. Porto Alegre: Palloti, 2005. 185p.
- 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.* 2007. 198f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- BRANDÃO, F.Z.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S. *et al.* Efeito da concentração espermática e do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído.

Arq. Bras. Vet. Zootec., v. 55, n.1, p.61-67, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acessado em: 20 de maio, 2014.

BRANDÃO, F. Z.; SILVA FILHO, J. M.; SATURNINO, H.MI. *et al.* Efecto de La edad sobre La fertilidad de yeguas inseminadas com sêmen fresco diluído. *Arq. Cienc. Vet. Zool. UNIPAR*, v.5, n.2, p. 193-199, 2002.

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, n.2, 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, n.1, p.129-136, 2000.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.) *Equine reproduction*. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1993. p. 790-797.

BRUGUÉ, E.T. *Reproductive strategies applied for Catalonian donkey conservation*. 2010. 142f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Departamento de Medicina e Cirurgia Animal, Universidade Autônoma de Barcelona, Barcelona.

BUCHANAN, B.R.; SEIDEL, G.E.Jr.; MCCUE, P.M. *et al.* Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*, v. 53, n. 6, p. 1333-1344, 2000.

BURNS, P.J.; REASNER, D.S. Computerized analysis of sperm motion: effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, v.15, p.377-380, 1995.

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 non foaling mares. *J. Equine Vet. Sci.*, v.17, n.11, 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 (Magister Scientiae em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CARLUCCIO, A.; PANZANI, S.; CONTRI, A. *et al.* Influence of season on testicular morphometry and semen characteristics in Martina Franca jackasses. *Theriogenology*, v. 79, n.3, p. 502-507, 2013.

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, n.3-4, p.287-299, 1993.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationship of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*, v.37, n.5, p.1101-1115, 1992.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Reproductive function in old mares. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, ANNUAL CONVENTION, 37., 1991, Vancouver. *Proceedings...* Vancouver: American Association of Equine Practitioners, 1994. p. 15.

CARVALHO, L.E. *Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fracionado de jumentos da raça Pêga, diluído, resfriado e estocado a 5°C em contêiner especial*. 2011. 193f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

CASTEJÓN, F.C. *Estudio de la congelación del semen e inseminación artificial en el asno zamorano-leonés*. 2005. 173f. Tese (Doctor em Veterinária) - Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

CHANG, M.C. Fertilization capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. *Nature*, v. 168, n. 4277, p. 997-998, 1951.

COCCHIA, N.; PASOLINIA, M.P.; MANCINIB, R. *et al.* Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-

- regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.75, n.7, p.1201–1210, 2011.
- 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, n.1, p.25-38, 1984.
- CONTRI, A.; GLORIA, A., ROBBE, D. *et al.* Effect of sperm concentration on characteristics of frozen-thawed semen in donkeys. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 136, n.1-2, p. 74– 80, 2012.
- CRISTANELLI, M.J., SQUIRES, E.L., AMANN, R.P. *et al.* Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology*, v.22, n.1, p.39-45, 1984.
- CROCKETT, E.C.; GRAHAM, J.K.; BRUEMMER, J.E. *et al.* Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology*, v.55, n.3, p. 793-803, 2001.
- 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, n.1, p.32-44, 1993.
- DHAMI, A. J.; KODAGALI, S. B. Correlation between biochemical and enzymatic constituents of semen of Surti buffalo bulls. *Indian Journal of Animal Science*, v. 57, n. 12, p. 1283-1286, 1987.
- 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, n.2, p.65-67, 2009.
- DORADO, J.; ACHA, D.; ORTIZ, I. *et al.* Relationship between conventional semen characteristics, sperm motility patterns and fertility of Andalusian donkeys (*Equus asinus*). *Anim. Reprod. Sci.*, v. 143, n.1-4, p. 64-71, 2013.
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G. *et al.* A Field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, v.22, n.3, p.291-304, 1984.
- ERIKSSON, B.M. *Cryopreservation of boar semen* : studies on sperm viability in vitro and fertility. 2000. 47f. Thesis (Doctoral) – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- 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, n.3-4, p.205–220, 2000.
- EL WISHY, A.B. Morphology of epididymal spermatozoa in the ass (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*). *Z. Tierz. Zuchtungsbiolog.*, v.92, n.1-2, p.67-72, 1975.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, v.23, n.1, p.1-13, 1986.
- FARMACOPEIA Brasileira, Brasília: Anvisa, 2010. Vol. 1, 546p., 1v/il.
- 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.
- FERNANDES, C.E., PIMENTEL, C.A. Características seminais e da fertilidade em garanhões. *Ciência Rural*, v.32, n. 5, p. 829-834, 2002.
- FERRAZ, L.E.S., VICENTE, W.R.R. Influência do momento da cobrição, em relação à ovulação, na fertilidade e na ocorrência de morte embrionária precoce em equinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.4, p.537-543, 2006
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, v.43, n.1, p.1-16, 1997.

- 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.
- FLORES, E.; TABERNER, E.; RIVERA, M.M. *et al.* Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology*, v.70, n.6, p. 936-945, 2008.
- FOOTE, R. H. Within-Herd use of boar semen at 5°C, with a note electronic monitoring of oestrus. *Reprod. Domest. Anim.*, v.37, n.1, p. 61-63, 2002.
- 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, MG.
- GADEA, J. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish J. Agric. Res.*, v.1, n.2, p.17-27, 2003.
- GAMA KER, P. *Fertilidade do sêmen congelado de jumentos (Equus asinus)*. 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- GASTAL, M.M.F.O. *Estudo das características seminais e do comportamento sexual de jumentos*. 1991. 105f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- GASTAL, O.M.; HENRY, A.R.; BEKER, A.R. *et al.* Effect of ejaculation frequency and season on donkey jack semen. *Theriogenology*, v.47, n.3, p. 627-638, 1997.
- GINTHER, O.J. *Reproductive biology of the mare (basic and applied aspects)*. 2. ed. Cross Plains: Equiservices, 1992. 642p.
- GONCZAROWSKA, A.T. *Diferentes Aspectos da Fecundidade do Sêmen de Jumentos e da Gestação de Éguas Submetidas à Cruzamentos Inter-Espécie*. 2011. 329f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Reprod. Techsol.*, v.12, n.1, p. 131–147, 1996.
- GUASTI, P.N., MONTEIRO, G.A., PAPA, F.A. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. *Vet. Zootec.*, v.19, n.2, p. 169-180, 2012.
- 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, n.1, p.26-38, 1992.
- HAMMES, A.M.; PIMENTEL, C.A.; FERNANDES, C.E. Fertilidade em garanhões avaliada através do exame andrológico. *Ciênc. Rural*, v.26, n.2, p.277-283, 1996.
- HARTWIG, F.P.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA, J.A.J. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozoides na espécie equina: uma revisão. *Vet. Zootec.*, v. 19, n. 2, p. 157-168, 2012.
- HEIDLER, B.; PARVIZI, N.; SAUERWEIN, H. *et al.* Effects of lactation on metabolic and reproductive hormones in lipizzaner mares. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.25, n.1, 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, n.1, p.47-53, 1996.
- HUNTER, R.H.F. Gamete lifespan in the mare's genital tract. Editorials. *Equine Vet. J.*, v.22, n.6, p.378-379, 1990.
- JACOB, J.C.F.; ALBUQUERQUE, F.T.; DOMINGUES, M.B. *et al.* Taxa de gestação em éguas Mangalarga Marchador inseminadas pós-ovulação. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.24, n.1, p.51-55, 2000.

- JASKO, D.J.; BEDFORD, S.J.; COOK, N.L. *et al.* Effects of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.40, n.5, p.885-893, 1993.
- 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, n.11, p.651-656, 2010.
- JEPSEN, R.J. *The effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and egg yolk concentration on cryopreservation and post-thaw parameters of jack and stallion semen.* 2007. 93f. Tese (Doutorado) – Iowa State University.
- JEPSEN, R.M.; EVANS, L.E.; YOUNGS, C.R. The effect of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on post-thaw parameters of cryopreserved jack and stallion semen. *J. Equine Vet. Sci.*, v.33, n.4, p. 1-7, 2012.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P. *et al.* Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, n.1-3, p.142-173, 2000.
- 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, n.5, p.1354-1365, 2005.
- KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion sperm. *Theriogenology*, v.48, n.7, p. 1217-1227, 1997.
- KATILA T, SANKARI S, MÄKELÄ O. Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.56, p.571-578, 2000.
- KENNEY, R. M., BERGAGMAN, R.V., COOPER, W.L. *et al.* Minimal contamination techniques for breeding mares. Technique and preliminary findings. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, v.21, p. 327-336, 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.
- 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, n.2, p.429-439, 1988.
- KRAUSE, D.; GROVE, D. Deep freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form. *J. Reprod. Fert.*, v.14, n.1, p.139-141, 1967.
- KURTZ FILHO, M.; ALDA, J.L.; DEPRÁ, N.M. *et al.* Fertilidade pós-parto em éguas Puro-Sangue de corrida. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.35, n.2, p.75-79, 1998.
- LEÃO, K.M.; ALVARENGA, M.A.; PUOLLI-FILHO, J.N. *Factors involved in failure of transvaginal intrafollicular insemination in mares.* In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 6., 2004, Rio de Janeiro. *Proceedings...* [s.l.]: Havemeyer Foundation, 2005. p. 64-65. (Havemeyer Foundation Monograph Series, 14).
- LEÃO, K.M. *Inseminação artificial por endoscopia com número reduzido de espermatozoides utilizando sêmen fresco e congelado de garanhões.* 2002. 105f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- LEBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; JONES, L. *et al.* Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology*, v. 50, n.1, p.49-54, 1998.
- LEBLANC, M. M. *Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment.* International Veterinary Information Service, 2003. Disponível em: <[www.ivia.org](http://www.ivia.org)>. Acessado em: 4 de junho de 2014.
- LEGHA, R.A.; YASH PAL. A comparative study of freezing techniques of jack semen. *Vet. Prac.*, v. 13, n. 1, p. 88-89, 2012.

- LEGHA, R.A.; YASH PAL.; SINGH, J. Superior mule production in field using frozen semen of Poitou jacks. *Vet. Pract.*, v. 13, n. 1, p. 86-87, 2012
- LEGHA, R.A.; YASH PAL, S.K.; RAVI, R.K. *et al.* Physical and biochemical properties of indian Jack semen. *Anim. Sci. Rep.*, v. 7, n.4, p. 153-160, 2013.
- LEITE, S.V.F. *Influência do numero de espermatozoides de jumentos (Equus asinus) sobre a taxa de prenhez 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, n.2, p.225-231, 2010.
- 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, n.3, p.687-693, 1983.
- LUSIGNAN, M.F.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M. *et al.* The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. *Biol. Repr.*, v. 85, n.3, p. 457-464, 2011a.
- LUSIGNAN, M.F.; MANJUNATH, P.; LAFLEUR, M. Thermodynamics of the interaction between bovine binder of sperm BSP1 and low-density lipoprotein from hen's egg yolk. *Thermochim. Acta*, v. 516, p. 88-90, 2011b.
- MAIA, M. S., AZEVEDO, H.C., BICUDO, S.D. *et al.* Efeito da adição do Equex-STM ao diluente Tris-gema na motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. *Acta Sci. Vet. Suppl.*, v. 33, n. 1, p. 311, 2005.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.33, n.4, p.183-193, 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, n.4, p.1250–1258, 2002.
- 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.
- MARCHETTI, A.N. Qualidade da água utilizada em laboratórios de centrais de inseminação artificial. In: CURSO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS. Porto Alegre: Minitub e UFRGS, 2008.
- 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.
- MAZUR, P. Basic concepts in freezing cells. In: JOHNSON, L.A.; LARSSON, K. (Eds.). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN. 1985. Proceedings... Uppsala, Sweden, Swedish University of Agricultural Sciences, 1985. p. 91-111.
- 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.
- MCKINNON, A.O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Aust. Equine Vet.*, v. 14, n. 4, p.156-174, 1996.
- 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, n.3, p.350-353, 1988.
- 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, n.1, p. 327-344, 2002.

- MELLO, F.G.C. *Avaliação in vitro da adição fracionada da dimetilformamida na criopreservação de sêmen equino*. 2005. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- 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, n.4, p.372-378, 2000.
- MELO, C.M.; PAPA, F.O.; PUOLI FILHO, J.N.P. *et al.* Eficiência do acetate de deslorelina e do extrato de pituitária equina na indução da ovulação em éguas. *Vet. Zootec.*, v.19, n. 3, p. 392-398, 2012.
- MIRÓ, J.; LOBO, V.; QUINTERO-MORENO, A. *et al.* Sperm motility patterns and metabolism in Catalonian donkey semen. *Theriogenology*, v.63, n.6, p.1706-1716, 2005.
- MIRÓ, J.; TABERNER, E.; RIVERA, M. *et al.* Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalonian donkey semen. *Theriogenology*, v.72, n.8, p.1017-1022, 2009.
- MOCÉ, E.; TOMÁS, C.; BLANCH, E. *et al.* Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on bull and goat sperm processed with fast or slow cryopreservation protocols. *Animal*, v.8, n.5, p. 771, 2014.
- 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, 2005.
- MORAIS, R. N.; MUCCIOLO, R. G.; VIANA, W. G. Biologia reprodutiva de jumentos. III. pH, osmolaridade e níveis de eletrólitos no sêmen. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.31, n.2, p. 145-151, 1994.
- 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, n.6, 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. 72f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- MORREL, J.M, PIHL, J., DALIN, A.M. *et al.* Restoration of seminal plasma to stallion spermatozoa selected by colloid centrifugation increases sperm progressive motility but is detrimental to chromatin integrity. *Theriogenology*, v.78, n.2, p. 345–352, 2012.
- 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, n.2, p.197-201, 2003.
- NAGASE, H.; NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5., 1964, Trento *Proceedings...* Trento; 1964. p.410-415.
- NETO, C.R., MONTEIRO, G.A., SOARES, R.F. *et al.* Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 33, n.1, p. 40-43, 2013.
- NEVO, A.C.; POLGE, C.; FREDERICK, G. Aerobic anaerobic metabolism of boar spermatozoa in relation to their motility. *J. Reprod. Fert.*, v. 22, n.1, p. 109-118, 1970.
- NISHIKAWA, Y. *Studies on reproduction in horses*. Tokyo: Japan Racing Association, 1959. 340p.
- 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, n.1-4, p. 82-84, 2006.
- OLIVEIRA, C.H.; VASCONCELOS, A.B.; SOUZA, F.A. *et al.* Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 118, n.2, p. 194-200, 2010.
- OLIVEIRA, J.V. *Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumento (equus asinus) por meio de testes laboratoriais e fertilidade*. 2005. 110f. Dissertação (Mestrado em Medicina

Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

OLIVEIRA, M.A.M. *Senilidade em éguas*. 2010. 34f. Monografia (Especialização Lato Sensu em Reprodução de Equinos) - Faculdade de Jaguariúna; Instituto Brasileiro de Formação Profissional, São Paulo, SP.

OSÓRIO, J.P.; CANISSO, I.F.; SOUZA, F.A. *et al.* Princípios do congelamento de sêmen do garmhão. *Cienc. Biol. Saúde*, v.10, n.2, p. 15-22, 2008.

OSÓRIO, J.P. *Efeito da adição fracionada de dimetil formamida e das curvas de congelamento na viabilidade in vitro pós-descongelamento do espermatozoide equino*. 2006. 61f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

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.

PALHARES, M. S. *Influência de um novo container para o transporte do sêmen equino diluído e resfriado: I-Características termodinâmicas e funcionais, II-Desempenho reprodutivo de éguas inseminadas*. 1997.245f. Dissertação (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, n.3, 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. *Proceedings...* Urbana: University of Illionois, 1984, v.3 ( Abstract., 377).

PALMER, E. Induction of ovulation. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine reproduction* . Pennsylvania. 1993.

PANZANI, D.; ROTA, A.; PACINI, M. *et al.* One year old fillies can be successfully used as embryo donors. *Theriogenology*, v.67, n.2, p.367–371, 2007.

PAPA, F.O.; DELL'AQUA JÚNIOR, J.A. Efeito do tipo de envasamento e método de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade de sêmen congelado equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.25, n.3, p.458-460, 2001.

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.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, n.2, 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.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG. Effects of equex, one-or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, n.6, p.859-875, 2000.

PEÑA, A.I.; LUGILDE, L.L.; BARRIO, M. *et al.* Effects of equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.59, n.8, p.1725-1739, 2003.

PEÑA-ALFARO, C.E.; SOUZA, N.L.; BARROS, L.O.; *et al.* Fisiologia e biotecnologia da reprodução de asininos. *Ciência Animal*, v.22, n.1, p. 207-218, 2012.

- PERES, K.G. *Emprego tópico prostaglandina da família E ou de análogo com o intuito de acelerar a migração de embriões equinos para o útero e imunolocalização dos respectivos receptores*. 2008. 91f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- 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.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *Equine Vet. Sci.*, v.7, n.5, p.289-301, 1987.
- 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.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W. *et al.* Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil. Steril.*, v. 26, n.2, p. 167-74, 1975.
- PICKETT, B.W., VOSS, J.L., JONES, R.L. Control of bacteria in stallions and their semen. *J. Equine Vet. Sci.*, v.19, n.7, p. 424-469, 1999.
- PILLET, E.; BATELLIER, F.; DUCHAMP, G. *et al.* Freezing stallion semen in INRA96-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Sci. Technol*, v.88, n.2, p. 257-265, 2008.
- PURDY PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res.*, v.63, n.3, p.215-225, 2006.
- PURSWELL, B.J.; LEY, W.B.; SRIRANGANATHAN, N. *et al.* Aerobic and anaerobic bacterial flora in the postpartum mare. *Equine Vet. Sci.*, v. 9, n.3, p.141-144, 1989.
- RAPHAEL, F.C. *Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide equino refrigerado*. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- 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: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 11., 2010, São Paulo. Disponível em: <[www.abraveq.com.br/eventos\\_prev\\_06\\_10\\_conf\\_06.php](http://www.abraveq.com.br/eventos_prev_06_10_conf_06.php)>. Acesso em: 15 de maio de 2014.
- 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.
- ROCHA, N.M.A. *Taxa de gestação em éguas inseminadas com sêmen resfriado de jumentos, utilizando diluidor à base de leite UHT desnatado – gema de ovo com duas concentrações de glicose*. 2012. 190f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- ROMUALDO, P.L.; MORAES, E.A.; TORRES, C.A.A. Efeito da adição de colesterol ou vitamina E na membrana espermática de bovinos sobre a motilidade dos espermatozoides após a criopreservação. *Zootec*, maio, 2009. Disponível em: <[www.abz.org.br](http://www.abz.org.br)>. Acesso em: 15 de abril. 2014.
- 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, R.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S. *et al.* Efeito do número de inseminações sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen asinino diluído e resfriado a 5°C por 12 horas de armazenamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 64, n. 1, p. 114-119, 2012.
- ROTA, A., MAGELLI, C., PANZANI, D. *et al.* Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiaata donkey spermatozoa. *Theriogenology*, v.69, n.2, p.176-185, 2008.

- ROTA, A., PANZANI, D., SABATINI, C. *et al.* Donkey Jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*, v. 78, n.8, p. 1846-1854, 2012.
- ROTA, A.; STRÖM, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of equex paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*, v.47, n.5, p.1093-1101, 1997.
- 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.
- SALES, A.L.R. *Criopreservação do sêmen asinino coletado de forma fracionada e envasado em flatpacks ou palhetas de 0,55mL: efeito sobre as características espermáticas e fertilidade de éguas inseminadas.* 2011. 160f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- SAMPER, J.C. *Equine breeding management and artificial insemination.* Philadelphia:W.B. Saunders Company, 2000.
- 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.
- 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.
- SARAGUSTY, J.; GACITUA, H.; PETTIT, M.T. *et al.* Directional freezing of equine sêmen in large volumes. *Reprod. Dom. Anim.*, v.42, n.6, p.610-615, 2007.
- SERRES, C.; GUTIÉRREZ-CEPEDA, L.; GÓMEZ, V. *et al.* Fertility rates in jennies by new semen processing. *J. Equine Vet. Sci*, v. 34, n.1, p. 193, 2014.
- 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.; SCHAFER, T.; STOUT, T.A. *et al.* The effects of different insemination regimens on fertility in mares. *Theriogenology*, v.60, n.6, p.1153-1164, 2003.
- SILVA, C.L.A. *Eficiência reprodutiva de fêmeas suínas inseminadas com sêmen heterospermico hiperconcentrado e rediluído após 12 horas de armazenamento a 5°C no diluidor glicina-gema de ovo.* 2011. 259f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- 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, n.5, p.563-568, 1998.
- SILVA, K.M.G.; GAMBOA, S.C.; RODRIGUES, A.S. *et al.* Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelamento de sêmen de garanhões férteis e subférteis. *Cienc. Rural*, v.38, n.8, p. 2271-2277, 2008.
- SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P.; SILVA, E.C.B. *et al.* Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides equinos após descongelamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n.1, p. 42-49, 2009.
- 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.

- SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen equino. *Arq. Bras. Vet. Zootec.*, v.59, n.1, p.56-64, 2007.
- 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.
- SOUZA, M.H.L.; ELIAS, D.O. Fisiologia da água e dos eletrólitos. In: SOUZA, M.H.L.; ELIAS, D.O. *Fundamentos da circulação extracorpórea: cirurgia cardíaca pediátrica*. 2.ed. [s.l]: Centro Editorial Alfa Rio, 2006.
- SQUIRES, E.L.; BRUBAKER, J.K.; MCCUE, P.M. *et al.* Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*, v. 49, n.4, p. 743-749, 1998.
- SQUIRES EL, KEITH SL, GRAHEM JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1056-1065, 2004.
- 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).
- STONE, R. Timing of mating relation to ovulation to achieve maximum reproductive efficiency in the horse. *Equine Vet. Educ.*, v. 6, n. 1, p. 29-31, 1994.
- STOREY, B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int. J. Dev. Biol*, v. 52, n.5-6, p. 427-437, 2008.
- 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, n.10, p.895-898, 1973.
- TERRACIANO, P.B.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; MIQUELITO, L.V. *et al.* Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. *Ciênc. Rural*, v.38, n. 7, p. 1972-1977, 2008.
- TISCHNER, M. Artificial insemination in horses: a review of current status quo. *Equine Vet. Educ.*, v. 4, n.2, p. 89-92, 1992.
- TORRES, P.; SERRES, C.; GÓMEZ-CUÉTARA, C. *et al.* Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 94, n. 1-4, p. 148-151, 2006.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LELANNOU, D. *et al.* Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. *Theriogenology*, v.45, n.5, p.1015-1027, 1996.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology*, v.50, n.5, p.793- 806, 1998.
- TURNER, R.M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertil. Develop.*, v.18, n.1-2, p.25-38, 2005.
- VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; OLIVEIRA, H.N. *et al.* Efeito da idade sobre a fertilidade de [eguas inseminadas com sêmen diluído resfriado a 14°C e transportado. *Rev. Bras. Zootec.*, v.28, n.5, p.1031-1036, 1999.
- VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S. *et al.* Efeito do Número de Inseminações Artificiais sobre a Fertilidade de Éguas Inseminadas com Sêmen Diluído, Resfriado a 14°C e Transportado. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29, n.6, p.1721-1726, 2000.

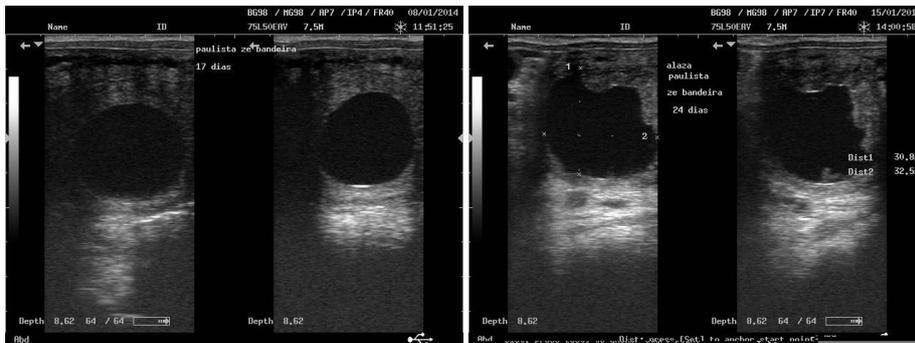
- VANDERWALL, D.K. The challenges of using frozen semen in horse breeding. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1997, Canadá. *Proceeding...* Canadá: Society for Theriogenology, 1997. p.178-179.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L. *et al.* Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoa motility parameters. *Theriogenology*, v.29, n.5, p.1043-1054, 1988.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P. *et al.* Equine frozen semen: freezability and field results. *Theriogenology*, v.48, n.6, 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, n.6, p.907-919, 2000.
- VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, n.1-4, p.115-136, 2005.
- VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; MARTIN, F.X. *et al.* Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Anim. Reprod. Sci.*, v.112, n.1, p.22-35, 2009.
- VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I. *et al.* Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, n.3-4, p.201-218, 2001.
- VIEIRA, M.J.; MATTOS, A.L.G.; MALSCHITZKY, E. *et al.* Agentes antimicrobianos do diluente de sêmen equino e seus efeitos na motilidade, na membrana acrossômica e nas taxas de prenhez. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 30, n.2, p.93-99, 2002.
- VOLKMANN, D.H.; VAN ZYL, D. Fertility of stallion semen frozen in 0,5mL straws. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*35, p.143-148, 1987.
- VON LEPEL, J. Maintenance of fertility in the horse including artificial insemination. *Equine Vet. J.*, v.7, n.2, p.97-101, 1975.
- 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.
- WEEMS, J.S.; BYERS, W. How to incorporate low-dose hysteroscopic insemination in a on-farm fresh semen program. *Am. Assoc. Equine Pract. Proc.*, v. 50, p. 399-401, 2004.
- 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.
- WILSHER, S.; ALLEN, W.R. The influences of maternal size, age and parity on placental and fetal development in the horse. *Theriogenology*, v.58, n.2-4, p. 833-835, 2002.
- WONG, W.Y.; FLIK, G.; GROENEN, P.M.W. *et al.* The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod. Toxicol.*, v. 15, n.2, p. 131-136, 2001.
- WOODS, G.L.; BAKER, C.B.; BALDWIN, J.L. Early pregnancy loss in broodmares. *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, n.6, p.410-415, 1990.
- XAVIER, I.L.G.S.; SILVA FILHO, J.M.; CARVALHO, G.R. *et al.* Efeitos do local de deposição do sêmen e do intervalo inseminação/ovulação sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. *Rev. Bras. Zootec.*, v.39, n.3, p. 512-519, 2010.
- YASH PAL. LEGHA, R.A; TANDON, S.N. Comparative assessment seminal characteristics of horse and donkey stallion. *Indian J. Anim. Sci.*, v.79, n.10, p. 1028-1029, 2009.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology*, v.55, n.6, p.922-926, 2000.

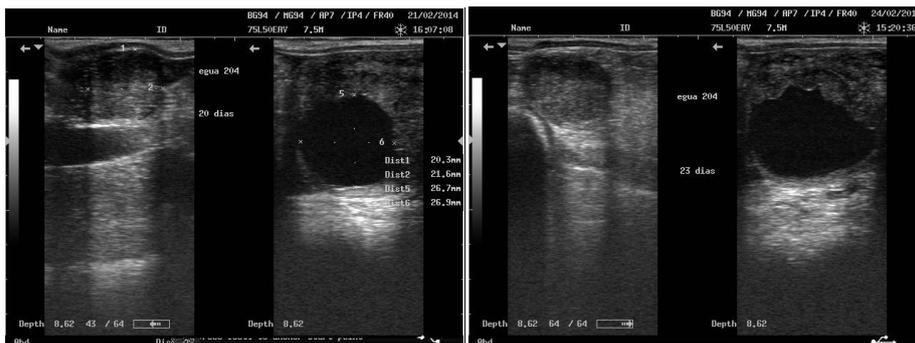
## 8. ANEXOS

Figura 8.1: Imagens ultrassonográficas de todas as gestações obtidas

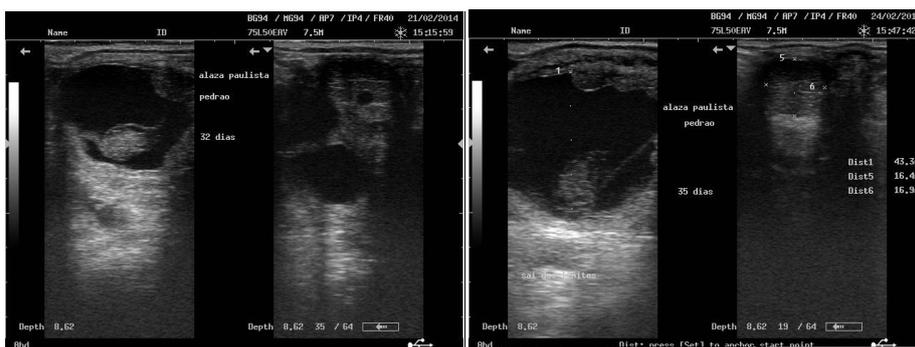
Égua 01- D1J1



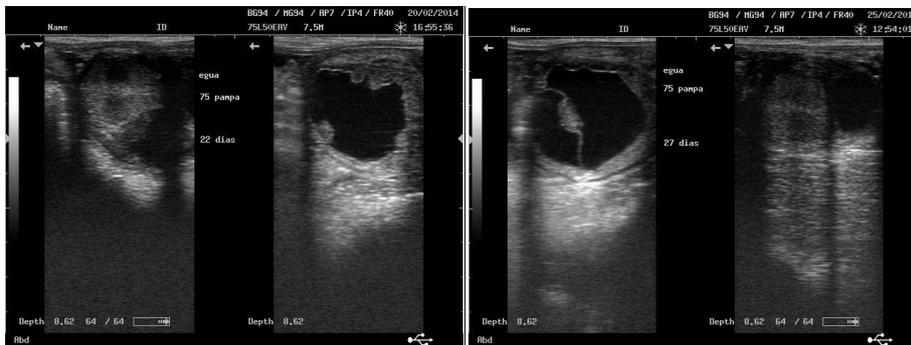
Égua 02 – D1J1



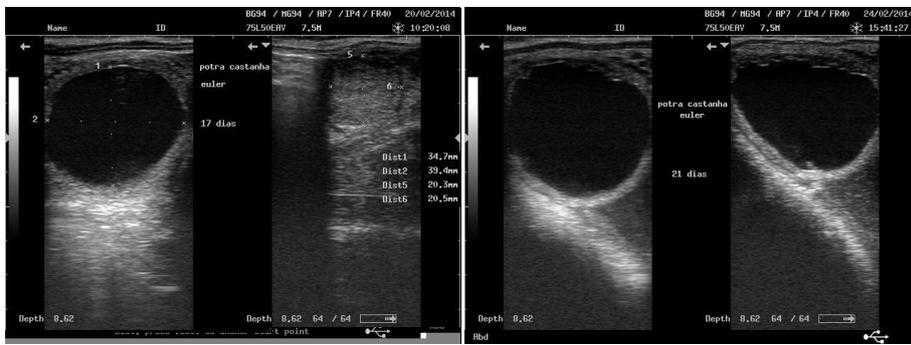
Égua 03 – D1J2



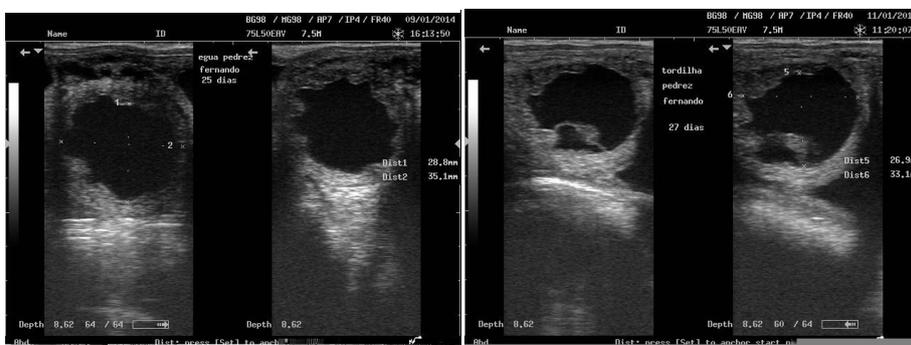
Égua 04 – D1J2



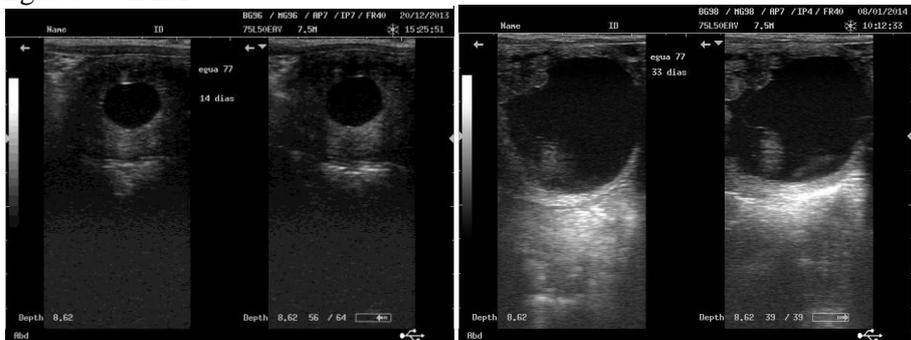
Égua 05 – D1J2



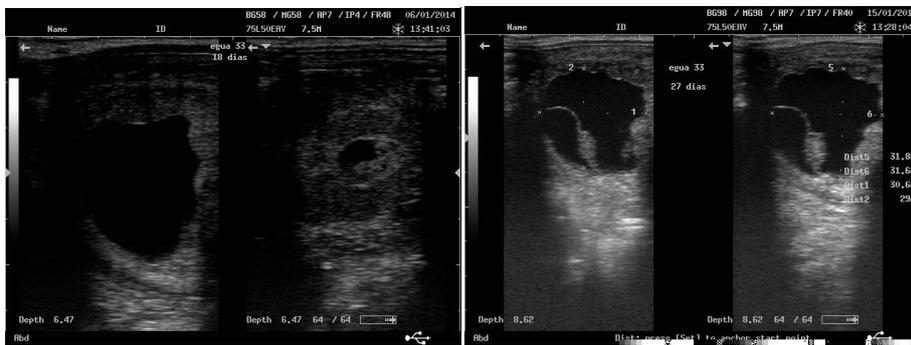
Égua 06 – D2J1



Égua 07 – D2J1



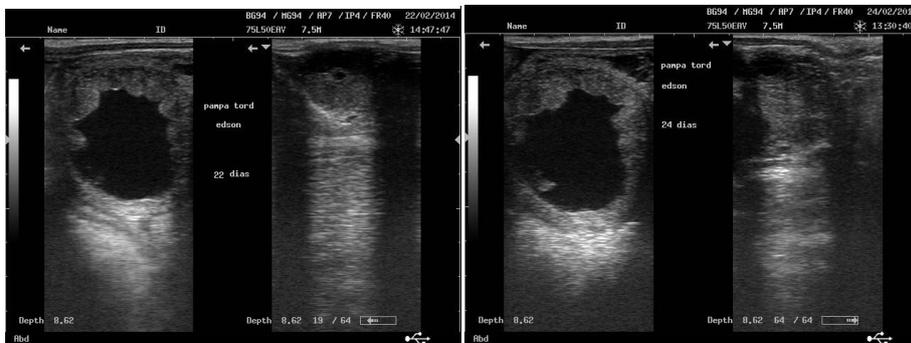
Égua 08 – D2J1



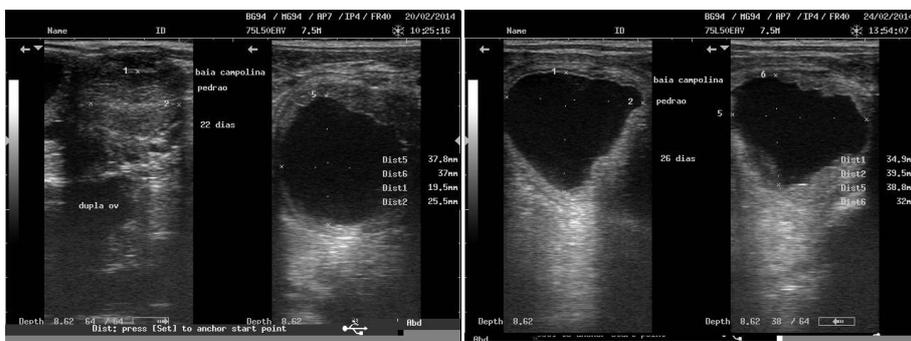
Égua 09 – D2J1



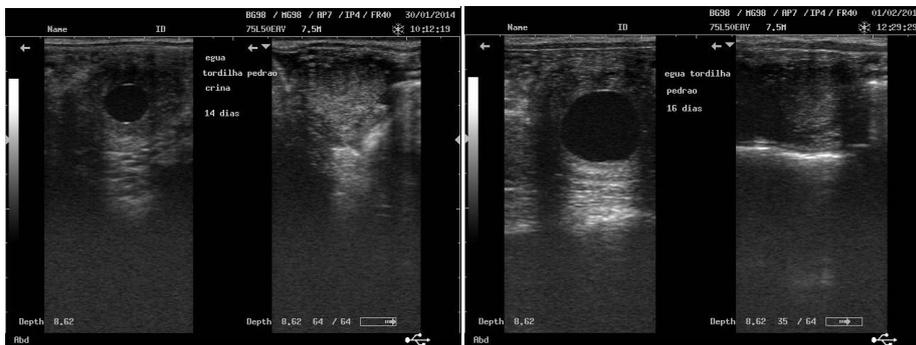
Égua 10 – D2J2



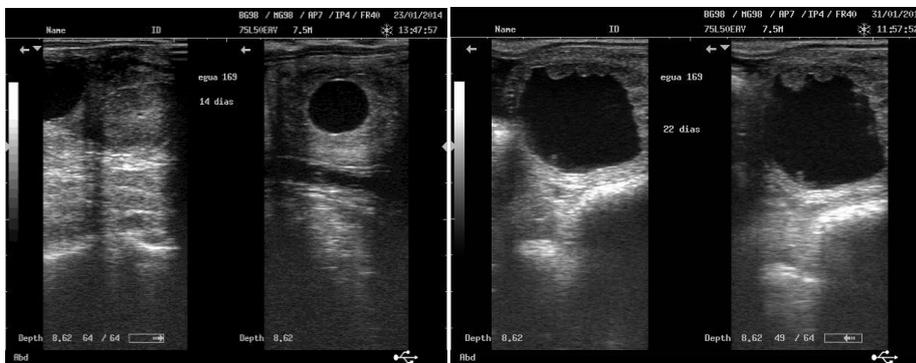
Égua 11 – D2J2



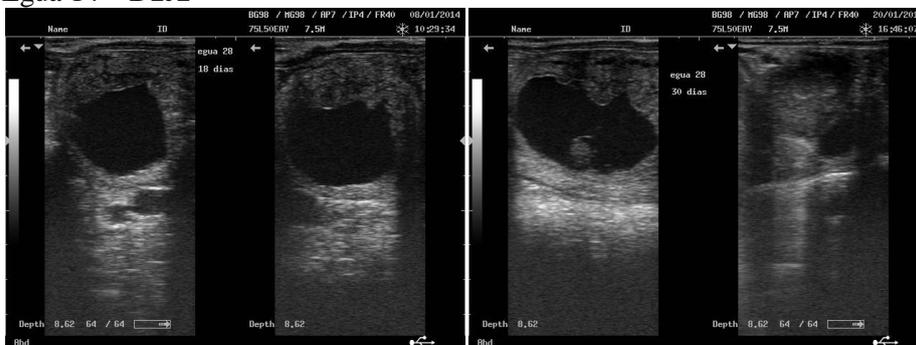
### Égua 12 – D2J2



### Égua 13 – D2J2



### Égua 14 – D2J2



### Égua 15 – D2J2

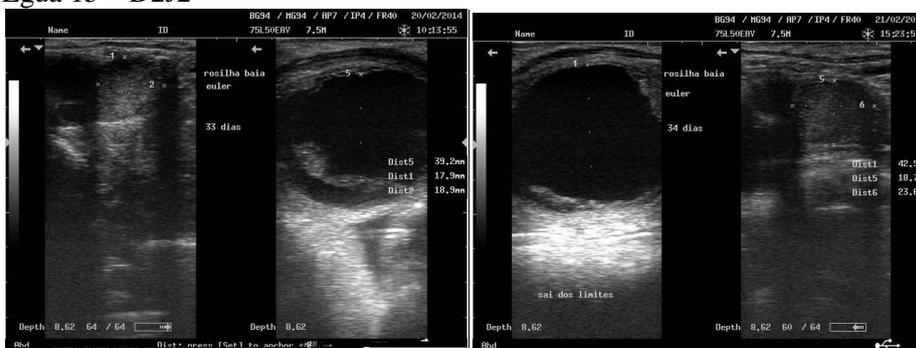


Tabela 8.1. Distribuição das fêmeas equinas por categoria reprodutiva, diluidor e jumento

Categoria reprodutiva	Tratamentos				Total
	D1J1	D1J2	D2J1	D2J2	
Potra	0/39 (0,0%)	1/39 (2,56%)	1/39 (2,56%)	1/39 (2,56%)	3/39 (7,69%)
Égua solteira	3/39 (7,69%)	3/39(7,69%)	3/39 (7,69%)	3/39 (7,69%)	12/39 (30,77%)
Égua no “cio do potro”	2/39 (5,13%)	1/39 (2,56%)	1/39 (2,56%)	0/39 (0,0%)	4/39 (10,26%)
Égua com potro ao pé	7/39 (17,95%)	4/39 (10,26%)	4/39 (10,26%)	5/39 (12,82%)	20/39 (51,28%)
Total	12/39 (30,77%)	9/39 (23,08%)	9/39 (23,08%)	9/39 (23,08%)	39/39 (100,00%)

p>0,05

Tabela 8.2. Características seminais e taxa de gestação/ciclo de fêmeas equinas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga

Variáveis	Tratamentos			
	D1J1	D1J2	D2J1	D2J2
Número de palhetas utilizadas/dose inseminante	10	10	10	10
Motilidade do sêmen ao descongelamento (%)	30,00±0,00 <sup>c</sup>	32,78±0,88 <sup>ab</sup>	31,67±0,83 <sup>b</sup>	33,89±0,73 <sup>a</sup>
Vigor do sêmen ao descongelamento (%)	3,71±0,07 <sup>b</sup>	4,11±0,07 <sup>a</sup>	3,72±0,09 <sup>b</sup>	4,17±0,14 <sup>a</sup>
Número de espermatozoides móveis/dose inseminante no momento da inseminação artificial	300,00x10 <sup>6 c</sup>	327,78±8,78x10 <sup>6 ab</sup>	316,67±8,33x10 <sup>6 b</sup>	338,89±7,35x10 <sup>6 a</sup>
Taxa de concepção/ciclo (%)	16,67(2/12)	33,33(3/9)	44,44(4/9)	66,67(6/9)

Tabela 8.3. Características do cio e da indução da ovulação de fêmeas equinas inseminadas com sêmen congelado de jumentos da raça Pêga, considerando-se o efeito do diluidor e do jumento

Variáveis	Tratamentos			
	D1J1	D1J2	D2J1	D2J2
Intervalo parto/ovulação (dias)	38,50±7,94	45,40±16,51	42,20±12,06	71,80±15,05
Tamanho do folículo à indução (mm)	38,22±1,36	37,50±0,66	38,44±1,19	36,56±0,63
Número de controles foliculares da indução à ovulação	4,67±1,09	5,00±0,22	4,56±0,41	5,00±0,00
Tamanho do folículo no último controle folicular (mm)	38,58±1,01	36,33±1,29	39,78±1,54	36,22±0,60
Intervalo da aplicação da hCG à ovulação (horas)	40,89±7,99	39,32±1,47	37,70±2,98	39,74±0,21
Intervalo da aplicação da hCG à inseminação artificial (horas)	41,21±8,00	39,59±1,45	37,98±2,94	40,03±0,21
Intervalo da detecção da ovulação à inseminação artificial (minutos)	21,50±2,00	17,89±1,46	20,25±3,39	17,67±1,20