

GUILHERME PUGLIESI

**VIABILIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN EQUINO RESFRIADO A 5 °C  
POR 24 HORAS COM DOIS DILUIDORES**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

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

T

P978v  
2009

Pugliesi, Guilherme, 1984-

Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C  
por 24 horas com dois diluidores / Guilherme Pugliesi.

– Viçosa, MG, 2009.

xvii, 103f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 73-88.

1. Equino - Inseminação artificial. 2. Sêmen -Resfriamento.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.


CDD 22.ed. 636.108245

GUILHERME PUGLIESI

**VIABILIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN EQUINO RESFRIADO A 5 °C  
POR 24 HORAS COM DOIS DILUIDORES**

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

APROVADA: 17 de fevereiro de 2009.

  
Prof. Ciro Alexandre Alves Torres  
(Coorientador)

  
Prof. José Domingos Guimarães

  
Prof. Eduardo Paulino da Costa

  
Prof. Antonio Bento Mancio

  
Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho  
(Orientador)

Aos meus pais, Dorival e Conceição,  
pelo incentivo e exemplo de dedicação,  
humildade e caráter.

Aos meus irmãos, Érica, Giovani e  
Lurdinha, pela amizade e  
compreensão.

Dedico

“A ambição é o puro senso de dever, pois a si só não produz frutos realmente importantes para a pessoa humana, pelo contrário, os frutos verdadeiros derivam do amor e da dedicação para com as pessoas e as coisas.”

*(Albert Einstein)*

“Daqui a cinco anos você estará bem próximo de ser a mesma pessoa que é hoje, exceto por duas coisas: os livros que ler e as pessoas de quem se aproximar.”

*(Charles Jones)*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pela orientação, amizade e confiança que propiciaram a realização deste estudo e o meu crescimento profissional.

Ao professor José Monteiro da Silva Filho, pela coorientação e pelos ensinamentos, que serviram como alicerce para a construção do meu aprendizado sobre a fisiopatologia da reprodução animal.

Ao professor Ciro Alexandre Alves Torres, pela coorientação e amizade e por fazer parte da banca examinadora.

Aos professores Eduardo Paulino da Costa, José Domingos Guimarães e Antônio Bento Mancio, por comporem a banca examinadora.

Ao professor Álan Maia Borges, pela grande amizade e dedicação ao longo dos anos e pelo auxílio na mensuração da osmolaridade dos diluidores utilizados neste estudo.

Ao professor Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo, por disponibilizar o laboratório e o microscópio de epifluorescência.

Aos demais professores que auxiliaram na minha formação acadêmica e conduta profissional.

À Carol, pela compreensão, pelo apoio e pelo amor, que foram fundamentais durante esses anos.

Ao amigo Fernando Antônio de Freitas, funcionário responsável pelo Setor de Equideocultura, pela amizade, pelos conselhos e pela paciência diária, que viabilizaram a execução deste trabalho.

A todos os funcionários do setor de equideocultura da UFV que possibilitaram a execução prática deste estudo.

A todos os amigos da Pós-Graduação e aos estagiários que auxiliaram de forma direta na execução e foram de suma importância para o trabalho: Pedro Ker, Daniel Rates, Renan Reis, Charles, Manuela, Sônia e Swellen.

Aos companheiros e amigos de república: Paulo Gustavo (PG), Guilherme, Bruno, Nivaldo, Nelcino, Maurício, André e Gilson, pela ótima convivência durante esse período.

Aos amigos e colegas da Pós-Graduação: Wender, Joanna, Verônica, Diogo, Polyana, Gilberto, Léo, Carolina, Vinício, Patrícia, Júlio, Gustavo, Fabrício, Ipatinga e Claudilene.

Aos amigos que o tempo não deixa esquecer: Igor, João, Erich, Philippe, Cabeça, Capixaba, Coró, Fernando (Nilson), Rebeca, Paty e Merith.

Ao empresário Lael V. Varela Filho e ao Haras La Glória, pela disponibilização de um garanhão para auxiliar na realização deste estudo.

A Dora, pelos cuidados com a casa e a logística alimentar, que proporcionaram tranquilidade e conforto para realização deste estudo.

À Celeste e à Fernanda, secretárias da Pós-Graduação em Zootecnia.

## **BIOGRAFIA**

GUILHERME PUGLIESI, filho de Dorival Pugliesi e Conceição Aparecida Pereira Pugliesi, nasceu na cidade de Franca, São Paulo, em 5 de agosto de 1984.

Em outubro de 2002, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Minas Gerais.

Em agosto de 2007, iniciou o Programa de Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia da UFV, em nível de mestrado, concentrando seus estudos na área de Fisiologia da Reprodução Animal.

Em 17 de fevereiro de 2009, submeteu-se à defesa desta dissertação.



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Ação do frio sobre a célula espermática equina.....	3
2.2. Resfriamento do sêmen equino.....	5
2.2.1. Curvas de resfriamento.....	6
2.2.2. Sistemas de resfriamento de sêmen.....	7
2.2.3. Diluidores de sêmen.....	10
2.2.3.1. Antimicrobianos.....	11
2.2.3.2. Leite desnatado.....	12
2.2.3.3. Gema de ovo.....	14
2.2.4. Taxa de diluição e qualidade seminal.....	16
2.3. Características e susceptibilidade ao frio do sêmen de raças equinas.....	17
2.4. Testes complementares.....	20
2.4.1. Morfologia espermática.....	21
2.4.2. Teste supravital.....	23
2.4.3. Teste hiposmótico.....	23
2.4.4. Corantes (sondas) fluorescentes.....	26
2.4.5. Teste de termorresistência (TTR).....	28

2.5. Taxa de prenhez do sêmen equino resfriado.....	29
3. EXPERIMENTOS.....	32
3.1. Experimento 1 - Viabilidade do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador resfriado a 5 °C por 24 horas com dois diluidores.....	32
3.1.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1.1.1. Local e período de experimentação.....	32
3.1.1.2. Animais e alimentação.....	33
3.1.1.3. Delineamento experimental.....	33
3.1.1.4. Análise estatística.....	38
3.1.2. RESULTADOS.....	38
3.1.2.1. Características do sêmen fresco dos garanhões.....	38
3.1.2.2. Taxa de diluição, concentração pós-diluição e volume da amostra.....	39
3.1.2.3. Características físicas e morfológicas e integridade da membrana do sêmen fresco diluído.....	39
3.1.2.4. Características físicas e morfológicas e integridade da membrana do sêmen resfriado.....	41
3.1.3. DISCUSSÃO.....	45
3.1.4. CONCLUSÕES.....	52
3.2. Experimento 2 - Fertilidade do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador resfriado a 5 °C com dois diluidores.....	53
3.2.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.2.1.1. Local e período de experimentação.....	53
3.2.1.2. Animais e alimentação.....	53
3.2.1.3. Delineamento experimental.....	54
3.2.1.4. Análise estatística.....	56
3.2.2. RESULTADOS.....	57
3.2.2.1. Características do sêmen fresco dos garanhões.....	57
3.2.2.2. Parâmetros reprodutivos de controle e de resultado.....	57
3.2.2.3. Características físicas do sêmen diluído e resfriado.....	59
3.2.2.4. Características morfológicas do sêmen fresco e resfriado.....	60
3.2.2.5. Fertilidade do sêmen resfriado.....	61
3.2.3. DISCUSSÃO.....	62
3.2.4. CONCLUSÕES.....	70
4. CONCLUSÃO GERAL.....	71

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
6. ANEXOS.....	89
ANEXO A – Preparo das soluções.....	90
ANEXO B – Análises estatísticas.....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características seminais de diferentes raças equinas. ....	18
Tabela 2 - Fertilidade de sêmen equideo resfriado a diferentes temperaturas e regimes de inseminação. ....	30
Tabela 3 - Composição, pH e osmolaridade dos diluidores seminais utilizados. ....	34
Tabela 4 - Características físicas do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador. ....	38
Tabela 5 - Volume da amostra acondicionada no contêiner, concentração espermática após a diluição e taxa de diluição do sêmen. ...	39
Tabela 6 - Características físicas e morfológicas do sêmen fresco diluído com os dois diluidores seminais. ....	39
Tabela 7 - Porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST) e vivos no teste supravital do sêmen fresco diluído. ....	40
Tabela 8 - Características físicas e morfológicas do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador resfriado a 5 °C por 24 horas com dois diluidores seminais. ....	42
Tabela 9 - Porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST), vivos (supravital) e íntegros (epifluorescência) no sêmen resfriado. ....	42
Tabela 10 - Motilidade espermática progressiva, vigor espermático e morfologia do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador diluído em dois diluidores seminais e resfriado a 5 °C por 24 horas. ....	44

Tabela 11 - Correlação Simples de Pearson entre a motilidade progressiva espermática e os testes de avaliação de integridade e funcionalidade da membrana plasmática.....	45
Tabela 12 - Características físicas do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador .....	57
Tabela 13 - Parâmetros de controle dos garanhões .....	58
Tabela 14 - Parâmetros de controle e de resultados dos tratamentos.....	58
Tabela 15 - Características físicas do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador diluído com dois diluidores seminais.....	59
Tabela 16 - Características físicas do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador resfriado a 5 °C com dois diluidores seminais.....	59
Tabela 17 - Características físicas do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador resfriado a 5 °C por 24 horas. ....	60
Tabela 18 - Características morfológicas do sêmen fresco e resfriado com dois diluidores seminais. ....	60
Tabela 19 - Correlação entre a temperatura do contêiner com a temperatura máxima e mínima, e umidade máxima e mínima ambiente...	61
Tabela 20 - Taxa de gestação (prenhez/ciclo) das éguas inseminadas. ...	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Uso de diferentes métodos de reprodução (em %) de cavalos Puro-Sangue Suecos no período de 1987 a 2007.....	6
Figura 2 - Tipos de enrolamento de cauda de espermatozoides equinos considerados bioquimicamente funcionais.....	25
Figura 3 - Espermatozoides íntegros (verde) e lesados (vermelho) pela coloração de fluorescência SYBR-14/PI.....	27
Figura 4 - Fluxograma dos procedimentos e das avaliações realizadas no resfriamento do experimento 1. ....	37
Figura 5 - Motilidade progressiva média do sêmen diluído de garanhões da raça Mangalarga Marchador durante o teste de termorresistência (TTR).....	40
Figura 6 - Vigor médio do sêmen diluído de garanhões da raça Mangalarga Marchador durante o teste de termorresistência (TTR) .....	41
Figura 7 - Motilidade progressiva média (%) do sêmen diluído de garanhões da raça Mangalarga Marchador durante o teste de termoresistência (TTR).....	43
Figura 8 - Vigor médio do sêmen resfriado de garanhões da raça Mangalarga Marchador durante o teste de termorresistência (TTR). ....	43
Figura 9 - Fluxograma dos procedimentos e das avaliações realizadas para o resfriamento e inseminação do experimento 2. ....	56
Figura 10 - Taxa de detecção, detecção acumulada de prenhez e diâmetro da vesícula embrionária em éguas gestantes entre o 10 <sup>o</sup> e 13 <sup>o</sup> dia após ovulação. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrômetros
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
$\text{Ca}^{2+}$	íon cálcio
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetraacético
Sptzs	espermatozoides
g	grama
GMPc	guanosina monofosfato cíclica
h	horas
IA	inseminação artificial
mg	miligrama
$\text{Mg}^{2+}$	íon magnésio
mL	mililitro
mm	milímetros
mOsmI	miliosmol
$\text{Na}^+$	íon sódio
NRC	National Research Council
P	nível de significância
pH	concentração de íons hidrogênio
ROS	espécies reativas de oxigênio
SAEG	Sistema de Análise Estatística da UFV
UI	unidade internacional

## RESUMO

PUGLIESI, Guilherme, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5 °C por 24 horas com dois diluidores.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Coorientadores: José Monteiro da Silva Filho e Ciro Alexandre Alves Torres.

Objetivou-se neste estudo avaliar a eficácia de dois diluidores – um à base de glicina-gema de ovo e outro à base de leite em pó resfriado a 5 °C por 24 horas – na preservação do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, determinada por meio de testes *in vitro* e avaliação da fertilidade *in vivo*. No experimento 1, foram utilizados cinco ejaculados de três garanhões da raça Mangalarga Marchador, que foram divididos em dois tratamentos: Kenney - diluição e resfriamento do sêmen com diluidor à base de leite (Kenney et al., 1975); Foote - diluição e resfriamento do sêmen com diluidor de glicina-gema de ovo (Foote, 2002). Amostras de 12 mL de sêmen foram diluídas numa concentração de  $30 \times 10^6$  espermatozoides viáveis/mL e, depois, armazenadas em Equitainer<sup>®</sup> por 24 horas. A qualidade seminal foi avaliada após diluição e resfriamento do sêmen. Foram avaliadas as seguintes características seminais: motilidade progressiva; vigor espermático; morfologia espermática; integridade da membrana plasmática pelo teste supravital e da epifluorescência utilizando os corantes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo; funcionalidade da membrana plasmática pelo teste hiposmótico; e motilidade progressiva e vigor espermáticos durante o teste de termorresistência por 90 minutos. O vigor espermático do sêmen diluído com



Kenney foi superior ( $P < 0,05$ ) ao do Foote na avaliação do sêmen fresco diluído. Não houve diferença estatística entre as demais características seminais avaliadas no sêmen fresco diluído. No sêmen resfriado, o Kenney propiciou a manutenção da motilidade e do vigor espermático após as 24 horas de armazenamento, porém o Foote apresentou maiores valores médios ( $P < 0,05$ ) para porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico e viáveis pelo teste de epifluorescência. Os valores médios da motilidade progressiva e do vigor espermático durante os testes de termorresistência do sêmen resfriado foram inferiores ao preconizado pelo CBRA (1998) aos 30 minutos com o diluidor de Foote e aos 60 minutos com o diluidor Kenney. No experimento 2, avaliou-se a fertilidade do sêmen resfriado com ambos os diluidores. Foram realizadas 17 coletas do sêmen do garanhão 1 e 23 coletas do garanhão 2. Após as coletas, o sêmen foi diluído com os diluidores utilizados no experimento 1 e ajustado para uma dose inseminante de 500 milhões de espermatozoides viáveis num volume final de 15 mL por dose. O sêmen foi acondicionado no Equitainer<sup>®</sup>, resfriado até 5 °C e armazenado por no mínimo 24 horas. Foram avaliadas as seguintes características seminais: motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen diluído e resfriado; e morfologia espermática do sêmen fresco e resfriado com ambos os diluidores. Foram utilizados 31 ciclos estrais de 26 éguas no primeiro período experimental e 43 ciclos de 28 éguas no segundo período experimental. Após a detecção de folículo de 30 mm, as éguas foram distribuídas ao acaso em dois grupos: grupo A (éguas inseminadas com sêmen resfriado com diluidor Kenney) e grupo B (éguas inseminadas com sêmen resfriado com diluidor Foote). O sêmen dos garanhões foi utilizado aleatoriamente entre as éguas. As inseminações foram realizadas depois de no mínimo 24 horas de armazenamento do sêmen. O sêmen foi depositado no corpo do útero, a partir da detecção de um folículo de 30-40 mm até a observação da ovulação. As inseminações foram feitas somente em dias predeterminados (terça-feira, quinta-feira e sábado) e o diagnóstico de gestação foi realizado por meio de ultrassonografia transretal. O diluidor de Kenney se mostrou superior ao Foote na manutenção da motilidade progressiva e do vigor espermático após o período de resfriamento. A taxa de gestação do grupo A, 55,26% (21/38), foi maior ( $P < 0,05$ ) que a do grupo B, 30,56% (11/36). Os testes de avaliação da

integridade e funcionalidade da membrana plasmática da célula espermática auxiliam na predição do potencial fecundante do garanhão, porém ainda não são conclusivos. O diluidor seminal à base de glicina-gema de ovo (Foote, 2002) não é eficaz em preservar as características seminais e não possibilita obter índice de fertilidade aceitável. O diluidor proposto por Kenney et al. (1975) ainda é uma ótima opção para inseminação artificial com sêmen resfriado de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

## ABSTRACT

PUGLIESI, Guilherme, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Viability and fertility of equine semen diluted with two seminal extenders and cooled at 5 °C for 24 hours.** Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-advisers: José Monteiro da Silva Filho and Ciro Alexandre Alves Torres.

The objective of this study was evaluate the effectiveness of the Mangalarga Marchador stallions semen diluted with glycine-yolk egg based extender or milk-based extender and cooled at 5 °C for 24 hours, assessed by *in vitro* tests and of fertility *in vivo*. In **Experiment 1**, were used 5 ejaculated of 3 stallions. Following semen collection, the experimental group was divided into two treatments: 1 - cooling and dilution of semen with the milk-based extender, 2 - cooling and dilution of semen with extender glycine-egg yolk based extender. Semen was packaged in samples containing 12 mL of diluted semen with  $30 \times 10^6$  viable sperm / mL concentration and then stored in Equitainer<sup>®</sup> for 24 hours. The sperm quality was evaluated after its dilution and after its cooling. The following seminal characteristics were evaluated: progressive motility, spermatic vigor, sperm morphology, integrity of the plasma membrane integrity by supravital test and epifluorescent using the dyes carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and propidium iodide (PI); plasma membrane functionality by hypoosmotic test and progressive motility and spermatic vigor during the spermatic thermo-resistance test (TTR) for 90 minutes. The vigor of semen diluted with Kenney was higher ( $p < 0.05$ ) than T2 in the assessment of fresh diluted semen. No statistical difference was observed in other seminal characteristics from the fresh diluted semen. In the cooled semen, the Kenney

extender had a better motility and spermatic vigor after the 24 hours storage, but Foote extender had higher average values for reactive spermatozoa percentage to the hypoosmotic test and the viability to the epifluorescent test ( $p < 0,05$ ). In **Experiment 2**, the objective was to evaluate the fertility of cooled semen with both extenders previously described. Seventeen semen samples of stallion 1 and twenty three samples of stallion 2 were collected. Following semen collection, the semen was diluted with two extenders used in Experiment 1, and adjusted to an insemination dose of 500 million viable sperm in a final volume of 15 mL per dose. Semen was packaged in Equitainer<sup>®</sup> and cooled down to 5° C and storage for at least 24 hours. The following seminal characteristics were evaluated: progressive motility and vigor of the diluted and cooled semen; the sperm morphology of fresh semen and cooled with both extenders. Thirty one estrous cycles of 26 mares were used in the first period and 43 cycles of 28 mares in the second period. After detection 30 mm follicle size, the mares were randomly assigned into two groups: group A (mares inseminated with semen cooled with Kenney extender) and group B (mares inseminated with semen cooled with dilutive Foote). The stallions' semen were used randomly among mares. The inseminations were done after a period of at least 24 hours of storage at 5° C. Semen was deposited in the body uterus, after the detection of a 30-40 mm follicle detection throughout ovulation. The inseminations were performed only on fixed days (Tuesday, Thursday and Saturday). The pregnancy diagnosis was performed by transrectal ultrasonography. As results, Kenney extender had higher progressive motility and spermatic vigor maintenance after cooling compared to T2 extender. The pregnancy rate was higher from treatment A than treatment B ( $p < 0,05$ ), 55,26% (21/38) and 30,56% (11/36), respectively. With this data, it is possible to conclude that: the integrity and functionality of sperm cell plasma membrane evaluation tests are considered ancillary assessments in predicting the reproductive potential of stallions, but are not yet conclusive. The glycine-egg yolk based extender was not effective in preserving the seminal characteristics, and its fertility rate was not acceptable. The milk based extender proposed by Kenney et al. (1975) is still an excellent option for use in programs of AI with cooled semen from Mangalarga Marchador breed.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo relatos, o primeiro estudo com aplicação da técnica de inseminação artificial (IA) foi realizado na espécie equina. Os árabes são considerados os primeiros a utilizar essa técnica em cavalos. O relato é de 1322, quando um chefe árabe roubou sêmen de um garanhão de seu rival para inseminar suas éguas. Atualmente, na maioria dos rebanhos equinos, a reprodução é feita com inseminação artificial. O uso da inseminação artificial acelera o ganho genético de rebanhos distantes do local onde se encontram os garanhões selecionados como reprodutores. Entre os tipos de sêmen equino utilizados na inseminação artificial, o sêmen resfriado é o mais utilizado para conservação e transporte, pois, quando utilizado até 24 horas após a coleta, possibilita maiores taxas de fertilidade em comparação ao sêmen congelado. O aumento do uso de sêmen resfriado nos últimos anos ocorreu principalmente após a liberação dessa biotecnologia pela maioria das associações de criadores e também pela alta proporção de garanhões com baixa resposta ao processo de congelação de sêmen (Vidament et al., 1997).

A equideocultura no Brasil gera anualmente R\$ 7,3 bilhões e proporciona 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos no País e o estado de Minas Gerais é o que possui a maior população, com aproximadamente 900 milhões de equinos (CNA/MAPA, 2006). Em âmbito nacional, a raça Mangalarga Marchador tem grande importância sócio-econômica, pois é a raça com maior número de animais criados em Minas Gerais, no Brasil e na América Latina. Além disso, o Brasil é considerado o segundo país que mais utiliza sêmen equino resfriado (Papa et al., 2005). A tecnologia de resfriamento do sêmen

equino tem sido estudada pelo interesse na manutenção do potencial fertilizante dos espermatozoides durante 24 a 36 horas, a qual dá maior flexibilidade ao proprietário do garanhão para colher e enviar o sêmen no momento mais oportuno. A utilização do sêmen resfriado possui vantagens, como a redução com os gastos inerentes ao transporte e à hospedagem de animais, a diminuição do estresse promovido pelo transporte dos animais e os riscos com acidentes e aquisição de doenças resultantes da exposição a patógenos de um novo ambiente (Brisko & Varner, 1992). Dessa forma, estudos e pesquisas objetivando melhor manutenção da viabilidade e da fertilidade do sêmen equino por períodos mais prolongados são de grande importância.

Vários fatores podem influenciar o resultado final da utilização do sêmen resfriado, ou seja, na fertilidade das éguas inseminadas, entre eles, a temperatura e o tempo de armazenamento; o tipo de contêiner; a curva de resfriamento; o momento e número de inseminações; o efeito individual do garanhão; e o tipo de diluidor utilizado. Os diluidores seminais propostos para diluição, centrifugação e acondicionamento do sêmen resfriado equino são, em sua maioria, à base de leite desnatado e de gema de ovo. A busca por novos diluidores ou modificações nos diluidores já existentes que promovam melhores resultados *in vitro* e *in vivo* é constante nos principais centros de pesquisas em reprodução equídea no mundo.

Nesse contexto, realizou-se este estudo com os objetivos de avaliar e comparar os efeitos de dois diluidores – um à base de glicina-gema de ovo e outro à base leite em pó desnatado – na viabilidade e fertilidade do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador resfriado a 5 °C por 24 horas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Ação do frio sobre a célula espermática equina

Ainda por volta de 1700, Spallanzani acondicionou sêmen de cavalo e cão na neve e observou diminuição da motilidade dos espermatozoides e posterior motilidade após o aquecimento (Hopkins & Medows, 2003). O primeiro relato de sucesso na criopreservação de sêmen de animais domésticos foi na década de 40, com sêmen bovino (Phillips & Lardy, 1940). Todavia, desde então, a utilização de técnicas de criopreservação tem sido estudada em diversas espécies domésticas, tendo em vista as diferenças na morfologia e composição da célula espermática entre espécies.

A redução da temperatura do sêmen diminui o metabolismo da célula espermática no caso do resfriamento e cessa o metabolismo no caso do congelamento do sêmen. Quando os espermatozoides são mantidos a 5 °C, apenas 10% de seu metabolismo é necessário para sua sobrevivência em comparação à preservação a 38 °C, o que possibilita a preservação do ejaculado por longos períodos (Squires et al., 1999).

Durante o processo de resfriamento e congelamento do sêmen, a membrana plasmática (MP), composta por dupla camada lipídica, proteínas e carboidratos e que envolve a célula espermática, sofre alterações físico-químicas e estruturais ocasionadas pelo frio (Amann & Graham, 1993). Os danos causados pelo estresse térmico são decorrentes de danos estruturais diretos, como a ruptura das membranas, ou indiretos, por alterações das funções celulares (Squires et al., 1999). Mudanças na organização do mosaico

fluido da membrana plasmática podem levar a alterações na permeabilidade, funcionalidade e no metabolismo da célula espermática, o que pode prejudicar sua motilidade e capacidade fecundante (Amann & Graham, 1993).

O alto conteúdo de ácidos graxos insaturados no espermatozoide tende a ocasionar estresse oxidativo (Kodama et al., 1996). No sêmen processado, as espécies reativas ao oxigênio (ROS) são induzidas pela respiração mitocondrial (Tosic & Walton, 1946) e principalmente pela contaminação leucocitária e peroxidação de espermatozoides com excesso de citoplasma residual (Aitken & Baker, 2004). Essas espécies podem ter efeitos positivos *in vivo* na indução da reação acrossômica (Aitken & Fisher, 1994), entretanto, a excessiva peroxidação causa danos à membrana plasmática e aos ácidos nucleicos, reduzindo a motilidade e a capacidade fertilizante do espermatozoide (Aitken & Baker, 2004). No sêmen equino, a adição de antioxidantes, como ácido ascórbico, tocoferol, hipotaurina, taurina, betacaroteno, catalase, glutathione peroxidase, superóxido desmutase, N-acetil cisteína ou piruvato, pode melhorar a manutenção da integridade da membrana e a motilidade do espermatozoide (Aurich et al., 1997; Bruemmer et al., 2002; Pagl et al., 2006).

O frio também altera as proteínas intracelulares, ou seja, afeta as funções enzimáticas e o transporte por proteínas transmembrana (Amann & Graham, 1993). A redução da temperatura altera o padrão de fluidez da membrana plasmática, que passa de um estado fluido para um estado gel, no qual as cadeias de ácidos graxos são rígidas e paralelas, fase chamada transição. A fase de transição no sêmen equino ocorre por volta dos 20,7 °C (Amann & Graham, 1993). A transcrição de DNA é interrompida no espermatozoide maturo, com isso, os mecanismos de reparo não estão disponíveis e danos à membrana plasmática resultam em perdas irreversíveis das funções da célula espermática (Eddy & O'Brein, 1994).

O choque térmico, o estresse osmótico, a formação de cristais de gelo (sêmen congelado) e o dano oxidativo são os principais fatores que ocasionam injúrias na célula espermática decorrentes do frio, causando perda da viabilidade e da capacidade fertilizante do espermatozoide (Mazur, 1984; Alvarez & Storey, 1992; Amirat et al., 2004; Li et al., 2005).

Algumas espécies (galo, bovino) são mais resistentes ao choque térmico e esta resistência está relacionada principalmente à alta concentração de



colesterol na membrana plasmática. O colesterol estabiliza a membrana plasmática e reduz a temperatura na qual a membrana passa pela fase de transição e, em altas concentrações, pode eliminar essa fase (Stryer, 1992; Alberts et al., 1999). Em comparação a outras espécies, como a suína, a membrana plasmática de garanhões possui alto conteúdo de colesterol (37%), o qual difere não apenas entre espécies, mas também entre indivíduos e entre ejaculados (Gadella et al., 2001).

Desse modo, se as membranas espermáticas estiverem devidamente protegidas no processo de resfriamento e armazenamento e as funções celulares forem preservadas até o momento da inseminação, espera-se aumento da longevidade dos espermatozoides relacionado à redução da utilização das reservas de ATP, o que possibilita que o ejaculado seja utilizado por longos períodos após a coleta (Varner et al., 1989).

## **2.2. Resfriamento do sêmen equino**

A tendência mundial de utilização de inseminação artificial é crescente e, de acordo com a Associação de cavalos Puro-Sangue Suecos (2007) e a Associação Sueca de registro de cavalos (2005), o uso do sêmen resfriado tem aumentado nas últimas décadas (Figura 1). Uma das causas desse aumento é a alta proporção de garanhões (20-40%) com resposta insatisfatória ao congelamento do sêmen (Vidament et al., 1997).

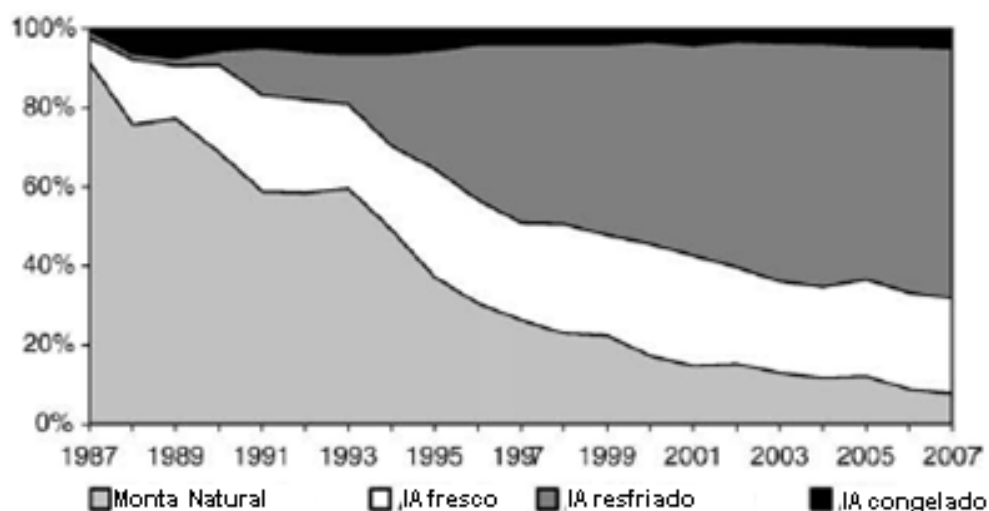


Figura 1 - Uso de diversos métodos de reprodução (em %) de cavalos Puro-Sangue Suecos no período de 1987 a 2007. (Adaptado de Thorén Hellsten et al., 2008)

Entre as vantagens do sêmen resfriado, destacam-se a menor alocação de garanhões na propriedade; a redução dos custos, do estresse e dos danos à égua e ao potro ocasionados pelo transporte; a ausência de contágio com doenças; e o aumento da habilidade para seleção de garanhão (Brisko et al., 1992; Varner et al., 1992).

De qualquer modo, a tecnologia de resfriamento do sêmen é interessante quando o sêmen mantém sua capacidade fertilizante por 1 a 2 dias. Infelizmente, a fertilidade obtida com a inseminação artificial com sêmen resfriado varia entre garanhões e laboratórios (Pickett, 1994; Katila, 1997). O sucesso do uso do sêmen resfriado/estocado depende de muitos fatores, que se confundem, como: temperatura de armazenamento, composição do meio extensor (diluidor), dose inseminante, número de inseminações, qualidade do sêmen a fresco e manuseio do sêmen (Malmgren, 1998; Batelier et al., 2001).

### 2.2.1. Curvas de resfriamento

Os fatores mais críticos no resfriamento do espermatozoide são a velocidade e a temperatura a qual o sêmen será resfriado. O sêmen diluído de garanhões pode ser resfriado rapidamente de 37 °C a 20 °C sem causar danos

aos espermatozoides (Kayser et al., 1991). Varner et al. (1989) verificaram que taxas de resfriamento mais lentas ( $0,240 \pm 0,042$  °C/min), durante os primeiros 15 minutos proporcionam os melhores valores de motilidade em comparação a taxas muito rápidas ( $1,091 \pm 0,003$  °C/min;  $P < 0,05$ ). O resfriamento de 37 a 8 °C utilizando temperaturas superiores a 0,3 °C/min pode resultar em “choque térmico”, caracterizado principalmente por movimentos anormais, rápida perda de motilidade durante o armazenamento e por danos à membrana acrossomal, ocasionados pela perda de enzimas e conteúdo intracelular (Moran et al., 1992).

O espermatozoide equino é mais sensível ao choque térmico entre 19 e 8 °C (Moran et al., 1992). Taxas de resfriamento mais lentas são recomendadas abaixo de 20 °C para evitar a ocorrência de choque térmico (Varner et al., 1988). Kayser (1991) também reportaram que taxa de resfriamento de 0,05 °C/min entre 20 e 5 °C mantém a porcentagem máxima de espermatozoides móveis. Adicionalmente, Granham (1986) e Heisnaken et al. (1987) verificaram que taxas de resfriamento lentas (0,02 e 0,04 °C/min) resultam em taxas de fertilidade aceitáveis.

O resfriamento do sêmen diluído sob condições de anaerobiose reduz a taxa metabólica dos espermatozoides e as vias metabólicas aeróbicas (Batellier et al., 2001), aumentando o tempo de manutenção da viabilidade e motilidade espermática.

### **2.2.2. Sistemas de resfriamento de sêmen**

Os sistemas de resfriamento de sêmen equino podem ser ativos ou passivos. Os sistemas ativos possuem taxas de refrigeração predeterminadas, mas são caros e de pouca utilidade prática em condições de campo, enquanto os sistemas passivos são mais baratos, porém mais susceptíveis a alterações nas taxas de resfriamento decorrentes de variações na temperatura ambiente, no volume e na temperatura inicial da amostra (Valle et al., 1999).

O sistema passivo é o mais utilizado para resfriamento de sêmen equino. É realizado em dispositivos (contêineres) de refrigeração, que devem atender às seguintes exigências: completo isolamento térmico do meio exterior; obtenção de taxa de resfriamento lenta; manutenção da temperatura pelo maior

tempo possível após a estabilização; proteção do sêmen; estrutura forte que permita o uso de diferentes meios de transportes; viabilidade econômica; leveza e facilidade de manuseio (Silva Filho et al., 1994). Sistemas de resfriamento passivo são desenvolvidos para proporcionar taxas de resfriamento lentas, em torno de 0,05 °C/min (Brinsko et al., 2000), e manter a temperatura entre 4 e 6 °C (Moran et al., 1992; Varner et al., 1988).

O período de armazenamento necessário até a inseminação determina o tipo e a temperatura final do contêiner. Para períodos de armazenamento de até 12 horas após a coleta, o sêmen pode ser armazenado a 20 °C ou a 4-6 °C. Entretanto, para estocagem por tempo superior, o sêmen deve ser refrigerado entre 4 e 6 °C. O armazenamento nesta temperatura mantém a viabilidade das células espermáticas melhor que a temperaturas mais baixas, entre 0 e 2 °C (Squires et al., 1999).

O primeiro sistema comercial de resfriamento de sêmen equino foi o Equitainer<sup>®</sup> (Douglas-Hamilton et al., 1984). Desde então, vários outros contêineres têm sido desenvolvidos. Segundo Silva Filho (1998a), podem ser identificadas as metodologias japonesa, holandesa, americana, francesa, alemã e brasileira, a qual inclui formas mais econômicas e igualmente eficientes de transporte de sêmen para as condições tropicais. Esses equipamentos possuem sistema de refrigeração passiva com diversas taxas de refrigeração e temperatura final de estocagem. A temperatura ambiente à qual os contêineres são expostos tem impacto sobre as taxas de refrigeração e temperatura final de estocagem da amostra em seu interior, influenciando algumas características seminais (Malmgren, 1998). Esses contêineres, em sua maioria, são muito resistentes e podem ser reutilizados, todavia o alto custo para sua aquisição e a necessidade de retorno ao haras de origem desencorajam alguns criadores a utilizá-los (Brinsko et al., 2000).

De acordo com Douglas-Hamilton et al. (1984), o Equitainer<sup>®</sup> promove taxa de resfriamento inicial de 0,3 °C/min e temperatura final de 4 a 6 °C, que pode ser mantida por até 72 horas. Esses autores demonstraram que é possível utilizar sêmen resfriado no Equitainer<sup>®</sup> e obter alta taxa de concepção (91% ao terceiro ciclo). Avanzi et al. (2006) compararam alguns sistemas de refrigeração passiva disponíveis no mercado – Equitainer<sup>®</sup>, Botutainer<sup>®</sup>, Max-Semen<sup>®</sup> e Botu-Box<sup>®</sup> – e também não observaram diferenças entre eles

quando mantidos a temperatura ambiente de 24 °C. Entretanto, esses autores relataram que apenas os sistemas Equitainer<sup>®</sup> e Botutainer<sup>®</sup> foram eficazes na manutenção da viabilidade espermática quando expostos à temperatura ambiente de 40 °C durante 24 horas.

Malmgren et al. (1998) verificaram superioridade ( $P < 0.001$ ) do Equitainer<sup>®</sup> em relação ao Salsbro Box<sup>®</sup> quando utilizados em temperatura ambiente de 37 °C; no Salsbro Box<sup>®</sup>, a viabilidade manteve-se na temperatura de  $19,3 \pm 3,9$  °C e, no Equitainer<sup>®</sup>, na temperatura de  $12,2 \pm 1$  °C. Brinsko et al. (2000), utilizando sete contêineres, estudaram o efeito de três temperaturas ambientes, -20 °C, 22 °C e 37 °C, sobre as características do sêmen e, apesar de terem observado respostas distintas, verificaram maior impacto da temperatura de -20 °C sobre as características de refrigeração e preservação da motilidade da amostra, enquanto as demais temperaturas não diferiram entre si. No entanto, Valle et al. (1999) utilizaram o contêiner Celle modificado e observaram que a temperatura ambiente influenciou as taxas iniciais de refrigeração, as quais eram mais rápidas em condições laboratoriais, em torno de 22 °C, que aquelas obtidas após transporte rodoviário quando havia insolação direta sobre o contêiner, cujos valores eram de -0,25 °C e -0,11 °C, respectivamente. Atualmente, no Brasil, existem alguns modelos de contêiner comercialmente disponíveis: Botu-Box<sup>®</sup> (mantém a 15 °C) e Botutainer<sup>®</sup> (mantém a 5°C), fabricados pela Biotech Botucatu; Max-Sêmen Express<sup>®</sup> revendido pela E.H.G. Agrofarma; Cia Semen<sup>®</sup> (Cia do Sertão). Outros contêineres podem ser encontrados no exterior, como: Equitainer I<sup>®</sup>, Equitainer II<sup>®</sup>, Equitainer III<sup>®</sup>, ExpectaFoil<sup>®</sup>, Bio-Flite<sup>®</sup>, Lane STS<sup>®</sup>, Equine Express<sup>®</sup>, Foal Flight<sup>®</sup>, Celle<sup>®</sup>, Sarstedt<sup>®</sup> e Salsbro box<sup>®</sup>.

Nunes et al. (2008) desenvolveram contêineres de baixo custo, CP1 e CP2 (US\$ 10,00), e observaram boa manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen resfriado por 24 horas nestes contêineres e validaram a utilização do sistema CP para áreas tropicais.

Melo et al. (2006) verificaram superioridade do Equitainer<sup>®</sup> em relação ao Max-sêmen Express<sup>®</sup> na manutenção da motilidade total e progressiva de sêmen equino resfriado por 24 horas. Essa superioridade pode estar relacionada à menor temperatura de manutenção do Equitainer<sup>®</sup> (6 °C) em relação ao Max-Sêmen Express<sup>®</sup> (16 °C), o que diminui o metabolismo da

célula espermática. Entretanto, esses autores não notaram diferença na integridade da membrana plasmática do sêmen acondicionado nesses dois contêineres.

### **2.2.3. Diluidores de sêmen**

O sêmen é composto de células espermáticas e plasma seminal, o qual contém substâncias benéficas ao espermatozoide, mas não é um meio ideal para o armazenamento de espermatozoides equinos (Varner et al., 1987; Jasko et al., 1991; Moore et al., 2005). Para se obter boa capacidade fertilizante do espermatozoide armazenado resfriado, é recomendada a adição de um diluidor seminal ao sêmen fresco (Varner, 1986).

Os diluidores seminais reduzem a concentração de plasma seminal, controlam o pH e a osmolaridade, suprem de nutrientes e antimicrobianos, além de proteger o espermatozoide do choque térmico durante o armazenamento. O controle do pH e da osmolaridade é importante, pois, quando esses parâmetros do sêmen equino se encontram fora dos padrões normais (pH:  $7,74 \pm 0,15$  e osmolaridade: 331 mOsm), pode haver redução da motilidade progressiva, que, no caso do pH alto e da osmolaridade inferior ou superior, se torna um processo irreversível (Griggler et al., 2001).

A adição de substâncias quelantes, como o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), que se ligam ao  $Ca^{2+}$   $Mg^{2+}$ , reduz a perda de íons intracelulares, amenizando as lesões causadas pelo choque térmico (Amann & Graham, 1993). O uso de indutores de funcionalidade, como as metilxantinas (teofilina, cafeína e pentoxifilina), pode aumentar a motilidade espermática, resultante do aumento intracelular da adenina monofosfato cíclica (AMPc) e da guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Goulart et al., 2004).

A maioria dos extensores seminais é a base de leite ou gema de ovo. O maior problema dos extensores contendo essas bases é que, por suas substâncias biológicas, podem diferir entre lotes/partidas. Outros componentes benéficos ao espermatozoide podem ser adicionados ao diluidor, como fontes energéticas, substâncias tamponantes e antibióticos. Alguns extensores com componentes mais bem definidos já foram desenvolvidos (INRA96<sup>®</sup> - IMV Technologies, França; EquiPro<sup>®</sup> - Minitub, Alemanha).

Brinsko et al. (2000) avaliaram a utilização de diluidor à base de leite (E-Z Mixin) no armazenamento do sêmen equino resfriado no Equitainer<sup>®</sup> por 24 e 48 horas e verificaram que o diluidor foi eficiente em manter o sêmen até 24 horas, porém houve grande perda de motilidade progressiva (65% de perda) depois de 48 horas de resfriamento.

A escolha do diluidor deve ser baseada no sistema de inseminação realizada, no tempo de estocagem, na temperatura de estocagem e na individualidade de resposta do garanhão ao resfriamento (Pagl et al., 2006).

### **2.2.3.1. Antimicrobianos**

A superfície do pênis e do prepúcio do garanhão é habitada por uma grande variedade de bactérias comensais e por algumas espécies patogênicas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Taylorella equigenitalis*) que podem promover endometrites na fêmea equina e redução na qualidade seminal, ocasionando subfertilidade dos garanhões (Pickett et al., 1999). A utilização de diluidores seminais contendo antimicrobianos é recomendada, tanto para o sêmen fresco como para o resfriado, já que pode controlar o crescimento de microrganismos, mantendo a qualidade seminal e evitando o desenvolvimento de infecções no trato genital da fêmea (Varner et al., 1998; Pickett et al., 1999).

Vários agentes antimicrobianos têm sido utilizados no sêmen equino: amicacina, amoxicilina, ampicilina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, ácido nalidíxico, polimixina B, estreptomicina, tircacilina, penicilina G e ceftiofur. Back et al. (1975) utilizaram um ejaculado de sete garanhões para avaliar o efeito de oito antibióticos (eritromicina, sulfato de gentamicina, ácido nalidíxico, sulfato de kanamicina, lincomicina, penicilina G sódica, polimixina B e sulfato de estreptomicina) sobre a motilidade progressiva espermática. Esses antibióticos foram avaliados sob várias concentrações (0, 250, 500, 1.000, 1.500, 2.000 e 2.500 UI ou µg/mL do diluidor) e a motilidade espermática foi avaliada após 0, 2, 4 e 6 horas a diluição do sêmen fresco e 12, 24, 48 e 72 horas de resfriamento do sêmen a 5 °C. Esses autores verificaram que o sulfato de estreptomicina teve efeito deletério no sêmen fresco quando adicionado em altas concentrações (1.500, 2.000 e 2.500 µg/mL), ao passo que

os demais tiveram efeito semelhante na manutenção da motilidade, tanto no sêmen fresco como no resfriado, mas promoveram melhores efeitos melhores quando utilizados em baixas concentrações (0 a 1.000 UI ou µg/mL).

Hoyumpa et al. (1992) e Varner et al. (1992), em estudos sobre os efeitos de antibióticos na redução do número de colônias de diversos tipos de bactérias (aeróbias obrigatórias, anaeróbias facultativas e anaeróbias), evidenciaram que a combinação de penicilina G potássica e amicacina teve efeito melhor que o uso isolado da penicilina e da amicacina no sêmen resfriado a 5 °C.

Varner et al. (1998), avaliando o sêmen de garanhões diluído com antibióticos e resfriado no Equitainer<sup>®</sup> por 12 e 24 horas a 5°C por meio de cultura bacteriana e da motilidade progressiva espermática, verificaram superioridade da amicacina e gentamicina G potássica em relação aos demais (penicilina G sódica, tircacilina dissódica, sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina, sulfato de estreptomicina e polimixina B). A polimixina B promoveu maior redução da motilidade progressiva após o resfriamento quando o sêmen foi armazenado por 24 horas.

A utilização de amicacina (1.000 UI/mL) ou penicilina G potássica (1.000 UI/mL), ou de ambas, para o controle do crescimento bacteriano no sêmen equino resfriado foi recomendada por Pickett et al. (1999). Esses autores relataram que pode haver interação entre o sêmen de diferentes garanhões e determinados tipos de antimicrobianos.

Outro constituinte que pode ser adicionado ao diluidor é a D (+) manose, que tem o efeito de reduzir a aderência bacteriana ao endométrio da fêmea, constituindo uma forma alternativa de profilaxia a endometrites causadas após a inseminação. A D (+) manose não interfere na viabilidade e fertilidade do sêmen diluído com diluidores à base de leite em pó (King et al., 2006).

#### **2.2.3.2. Leite desnatado**

Os diluidores à base de leite desnatado são usados rotineiramente na diluição, centrifugação e no resfriamento do sêmen equino. O fracionamento do leite por diversos métodos (microfiltração, ultrafiltração, diafiltração ou secagem) é realizado para purificar algumas frações do leite. O leite em pó



desnatado é desprovido de lipoproteínas, mas também protege a célula espermática durante o armazenamento. Vários estudos indicam que os componentes ativos envolvidos na proteção do espermatozoide pelo leite são as micelas de caseína, que interagem com as proteínas BSP, que, por sua vez, podem promover a retirada de fosfolipídios e colesterol da membrana plasmática (Beregeron & Manjunath, 2006). O fosfocaseinato e a  $\beta$ -lactoglobulina são os componentes com maior influência positiva sobre o espermatozoide. Entretanto, o mecanismo de ação desses componentes ainda não é conhecido (Battelier et al., 1998; 2001).

O leite desnatado pode ser beneficiado como leite UHT (*ultra-high-temperature*) ou como leite em pó. Na fração proteica do leite, há fatores tóxicos ao espermatozoide (Householder et al., 1981; Evans & Maxwell, 1987), como a lactenina, uma proteína de baixo peso molecular e bactericida para cepas de *Streptococcus* spp. no leite fresco, a qual seria inativada a +92 °C por 10 minutos (Flipse et al., 1954). De acordo com Evans & Maxwell (1987), o leite UHT não precisa ser inativado previamente quando utilizado como diluente de sêmen, ao contrário do leite em pó reconstituído.

Entretanto, Meirelles et al. (1998) compararam a utilização de diluidores à base de leite em pó e leite UHT submetidos ou não a inativação por tratamento térmico e, contrariando os achados de Evans & Maxwell (1987), não observaram diferenças na motilidade espermática progressiva, na motilidade total e na fertilidade entre o leite desnatado inativado e o leite desnatado não-inativado, o que indica que o processo de inativação não é necessário quando se utiliza leite em pó. A lactenina, fator tóxico ao espermatozoide, é inativada pelo calor, aparentemente pela liberação de grupos sulfídricos das lactoglobulinas que posteriormente se juntam à lactenina, eliminando seu fator tóxico (Johnson et al., 1955). É possível que, nos processos atuais de beneficiamento do leite em pó, ocorra inativação da lactenina (Meirelles et al., 1998). A desnecessidade do tratamento térmico do leite em pó dispensa um processo dispendioso, que pode constituir fonte de erro (Pickett & Amann, 1987) e que possibilita o rápido preparo do diluente com produtos comercialmente disponíveis (Mattos, 1994). O leite em pó desnatado reconstituído, desde que preparado com ingredientes de boa qualidade,

apresenta resultados de preservação da motilidade e da fertilidade satisfatórios e constantes (Meirelles et al., 1998).

Um diluidor contendo componentes definidos (INRA96) foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores franceses e manteve eficientemente a longevidade de espermatozoides equinos durante o período de estocagem a baixas temperaturas, o que permitiu taxas de gestação por ciclo semelhantes às obtidas com diluidores à base de leite em pó (Battelier et al., 1998; 2001).

Pagl et al. (2006) avaliaram a utilização de um diluidor contendo caseinatos, proteínas específicas do soro e vários açúcares (EquiPro<sup>®</sup>, Minitub, Tiefenbach, Germany), em comparação a um diluidor de leite em pó desnatado (Kenney et al., 1975), e não notaram diferença na viabilidade do sêmen armazenado por até 72 horas a 4 °C.

Em estudo recente, Farrás et al. (2008) avaliaram a utilização de dois diluidores comerciais à base de leite desnatado (Botu-sêmen<sup>®</sup> e Botubox<sup>®</sup>) e um diluidor à base de frações do leite (INRA96<sup>®</sup>) resfriados em dois sistemas de resfriamento nacionais (Botutainer<sup>®</sup> e Botu-turbo<sup>®</sup>) e não observaram diferença na motilidade espermática total e progressiva nem na integridade de membrana (epifluorescência) entre os três diluidores.

Comercialmente é possível encontrar alguns diluidores seminais à base de leite desnatado ou de seus constituintes, como: Botu-sêmen<sup>®</sup> (Biotech Botucatu-Brasil); Botu-turbo<sup>®</sup> (Biotech Botucatu-Brasil); Max-Sêmen Plus<sup>®</sup>; Equimix<sup>®</sup> (Nutricell); EquiPro<sup>®</sup> (Minitub-Alemanha); EZ Mixin<sup>®</sup> (CST, Animal Reproduction Systems, Chino, CA, USA); INRA82<sup>®</sup>; INRA 96<sup>®</sup>; Kenney<sup>®</sup>, entre outros.

#### **2.2.3.3. Gema de ovo**

A gema de ovo em associação a outros componentes do diluidor pode ajudar os espermatozoides a resistir ao choque térmico (Bogart & Mayer, 1950; Amirat et al., 2004). Esse efeito pode ser atribuído principalmente à lipoproteína de baixa densidade, LDL – (Pace & Graham, 1974; Watson, 1975; Quinn et al., 1980; Graham & Foote, 1987; Babiak et al., 1999; Moussa et al., 2002; Bergeron & Manjunath, 2006) –, que interage principalmente com as proteínas de membrana (proteínas BSP), constituindo o principal mecanismo de proteção

no sêmen bovino (Bergeron et al., 2004), além de incorporar-se à membrana espermática, promovendo sua maior estabilidade (Manjunath et al., 2002).

Entretanto, na sua composição, a gema de ovo possui substâncias indesejáveis e tem algumas desvantagens quando utilizada na forma integral nos diluidores – opacidade óptica, causada pelos grânulos formados, que dificultam o exame imediato à avaliação microscópica; prejuízo causado à respiração do espermatozoide (Tosic & Walton, 1946); diminuição da motilidade espermática (Pace & Graham, 1974) –, pois pode transportar microrganismos patogênicos (Bosseau et al., 1998).

Estudos mais recentes têm sido realizados com gema de ovo centrifugada ou apenas com a LDL extraída da gema de ovo. Rota et al. (2004) verificaram superioridade na motilidade progressiva e na velocidade de espermatozoides equinos resfriados por 24 horas quando adicionaram gema de ovo centrifugada (2%) a um diluidor à base de leite em pó desnatado. Rota et al. (2008) compararam esse mesmo diluidor contendo 2% de gema de ovo centrifugada (INRA 82Y) com dois diluidores à base de constituintes do leite (INRA 82 e INRA 96) no resfriamento do sêmen de jumentos até 72 horas e também verificaram superioridade na motilidade espermática total e progressiva e na velocidade dos espermatozoides utilizando o INRA82Y após 48 e 72 horas de resfriamento em relação aos outros dois diluidores. Outros autores, no entanto, verificaram desvantagem no uso de diluidores à base de gema de ovo (Province et al., 1984) ou da adição de gema de ovo em diluidores à base de leite desnatado (Bruemmer et al., 2002).

Em estudo comparando um diluidor à base de gema de ovo (meio Baken) com um diluidor à base de leite em pó (Kenney), Melo et al. (2005) concluíram, com base no teste hiposmótico, que o diluidor à base de gema de ovo preservou melhor a membrana plasmática que o diluidor à base de leite desnatado. Melo & Henry (1999), com base no teste supravital, também verificaram superioridade de um diluidor contendo gema de ovo na manutenção da integridade da membrana plasmática. Palm et al. (2006) constataram que o uso de um diluidor comercial à base de gema de ovo (Gent extender; Minitub-Alemanha), em comparação ao EquiPro<sup>®</sup> (Minitub-Alemanha), resultou em menor número de leucócitos no endométrio de éguas 12 horas após sua

infusão no útero, o que possivelmente refletiu em menor ocorrência de endometrites no útero.

#### **2.2.4. Taxa de diluição e qualidade seminal**

Uma das grandes falhas no processo de resfriamento do sêmen é a diluição. No sêmen fresco geralmente se utiliza diluição de 1:1 ou 2:1 (diluidor : sêmen), todavia, para o resfriamento, o sêmen deve ser diluído a taxas de diluição maiores para suprir energeticamente e proteger o sêmen durante o armazenamento (Varner, 1986; Jasko et al., 1991). O mais importante seria que o ejaculado fosse diluído na concentração de 25 milhões de espermatozoides/mL. Pesquisadores na Universidade do Texas A&M demonstraram superioridade da diluição do sêmen a 25 milhões em comparação à diluição a 50 ou 100 milhões de espermatozoides/mL. Grandes Diluições (menos de  $25 \times 10^6$  espermatozoides viáveis/mL) promovem baixa motilidade e fertilidade do sêmen resfriado (Varner et al., 1987).

A importância na manutenção de uma concentração de 25 a 50 milhões de espermatozoides viáveis/mL é comprovada na hora da inseminação, visto que doses inseminantes com grande volume e baixa concentração podem promover redução na fertilidade, portanto, são aconselháveis doses com volumes entre 10 e 30 mL dentro da concentração espermática recomendada (Varner et al., 1987).

Um fator importante a ser considerado ao estabelecer a taxa de diluição é que o efeito deletério do plasma pode ocasionar baixa viabilidade após o resfriamento em alguns animais (resfriadores ruins) e, neste caso, são indicadas taxas de diluição maiores (> 3:1). Entretanto, alguns animais que são oligospermos apresentam baixa motilidade e viabilidade espermática com altas taxas de diluição (efeito diluição), assim, torna-se mais recomendável a retirada de parte desse plasma por centrifugação e posteriormente do sobrenadante (Brinsko et al., 2000). O processo de centrifugação, no entanto, pode ocasionar injúrias na célula espermática, por isso, é indicado somente nestes casos.

### **2.3. Características e susceptibilidade ao frio do sêmen de diversas raças equinas**

Em comparação a algumas espécies domésticas, a espécie equina possui índices de fertilidade mais baixos em determinados sistemas de produção (Voss, 1993). Parte desses baixos índices de fertilidade relaciona-se ao fato de não haver seleção por fertilidade nesta espécie (Hugues, 1991). Além disso, há uma tendência de se atribuir à fêmea os problemas de infertilidade, o que compromete uma avaliação mais criteriosa do macho (Pimentel, 1989; Dowsett & Knott, 1996). Apesar de as características reprodutivas serem de baixa a moderada herdabilidade, a obtenção de progênie de machos subférteis poderá perpetuar na população genes de indivíduos particularmente indesejáveis sob o aspecto reprodutivo (Amann & Graham, 1993).

Entre os fatores que podem alterar os índices reprodutivos, a qualidade seminal tem efeito considerável. No entanto, essa associação tem-se mostrado questionável sob determinados aspectos. De acordo com a susceptibilidade do ejaculado à estocagem ao frio, os garanhões podem ser classificados como “bons resfriadores” ou “resfriadores ruins” (Brinsko et al., 2000; Battelier et al., 2001).

No Brasil, os garanhões da raça Mangalarga Marchador, raça com maior número de animais no País, são considerados animais de aspectos reprodutivos inferiores por técnicos e criadores. Entretanto, não há na literatura nenhum estudo comparando os aspectos reprodutivos dessa raça a outras raças nacionais ou estrangeiras. Bielanski (1951), Nishikawa (1959) e Haag (1959) foram os primeiros pesquisadores a estabelecer a variação da fertilidade entre raças e indivíduos a partir dos seus padrões seminais. As características seminais, no entanto, foram estudadas em diversas raças equinas por vários pesquisadores (Tabela 1).

Tabela 1 - Características seminais de diferentes raças equinas

Volume de sêmen (mL)	Concentração espermática (x 10 <sup>6</sup> /mL)	Motilidade (%)	Viabilidade (%)	Raça	Referência
28	114	70-72	78-80	Thoroughbred	Dowsett & Knott (1996)
30	97	78-80	84-86	Standardbreed	Dowsett & Knott (1996)
36	286	84-86	89-91	Árabe	Dowsett & Knott (1996)
33	116	77-79	82-84	Australian Stock Horse	Dowsett & Knott (1996)
24	171	73-75	75-78	Quarto de Milha	Dowsett & Knott (1996)
24	138	72-74	78-80	Palomino	Dowsett & Knott (1996)
21	104	69-71	74-76	Pônei	Dowsett & Knott (1996)
44	101	69-71	61-63	Shetland	Dowsett & Knott (1996)
23	90	72-74	83-86	Appaloosa	Dowsett & Knott (1996)
31-71	37-375	59-77	51-81	Dutch Warmblood Stallions	Parlevliet et al. (1994)
38	-	78,9	72,7	Swedish Warmblood	Einarsson et al. (2007)
49,2	304,8	88,9	91	Árabe, mestiços e Espanhol	Qintero & Moreno et al. (2003)
-	-	32-61	55-70	PSI e Crioulo	Fernandes & Pimentel (2002)
36	293,8	75	49	Warmblood Stallions	Janett et al. (2003a)
45	231	72	-	Franches-Montagnes	Janett et al. (2003b)
36,6	347	48	-	Quarto de Milha e Thoroughbred	Pickett et al. (1970)
24	233,6	63,8	54,3	Miniaturas	Paccamonti et al. (1999)
25,3	201,3	54,7	67,4	Pôneis	Neves et al. (2006)
39,7	74,5	67,8	83,6	Mangalarga Marchador	Fürst (2006)

Em estudo comparando nove raças equinas (Thoroughbred, Standardbred, Árabe, Australian Stock Horse, Quarto de Milha, Palomino, Pônei, Shetland, Appaloosa), Dowsett & Knott (1996) verificaram que a raça Árabe possui as melhores características reprodutivas, como maior número de espermatozoides totais e concentração espermática, menor porcentagem de espermatozoides mortos e menor volume de gel. Os pôneis foram os que apresentaram as piores características seminais (menor volume total, menor volume de sêmen sem gel, menor número de espermatozoides totais e maior porcentagem de espermatozoides mortos). O sêmen das raças Appaloosa e Standardbred apresentaram as menores concentrações espermáticas.

De acordo com Metcalf (1998), em alguns países europeus, os garanhões utilizados na estação de monta são selecionados considerando seus aspectos reprodutivos, além de seu desempenho esportivo. Dessa forma, a seleção prévia desses reprodutores influencia positivamente nas taxas de prenhez obtidas por inseminação artificial. Na Holanda, para que um animal de até 3 anos de idade seja registrado nas associações de criadores de cavalos, são necessários valores mínimos de  $2 \times 10^9$  espermatozoides móveis totais, 50% de espermatozoides móveis e 50% de espermatozoides morfológicamente normais (Parlevliet et al., 1994).

Alvarenga et al. (2003) verificaram variações entre algumas raças (Quarto de Milha, Warmblood, Mangalarga, Árabe, Campolina e Lusitano) quanto a certos aspectos do sêmen congelado com diferentes agentes crioprotetores. Em estudos realizados na Universidade Estadual Paulista, em Botucatu, São Paulo, com 80 garanhões de várias raças, quase a metade das raças de Hipismo (Brasileiro de Hipismo, Hannoveriano, Holsteiner e Trakehner) e Quarto de Milha apresentou sêmen com bom padrão de motilidade pós-descongelamento. Nas outras raças nacionais estudadas, como Mangalarga e Mangalarga Marchador, apenas cerca de 20% apresentaram essas características, o que comprova a existência de um fator racial relacionado à resistência do sêmen ao processo de criopreservação (Carmo & Almeida, 2006).

O acasalamento consaguíneo de algumas raças com baixa população ou algumas linhagens dentro da raça pode promover baixa fertilidade (Klemetsdal & Johnson, 1989) e qualidade seminal (Gamboa et al., 2008). Esse aspecto foi

claramente evidenciado por Gamboa et al. (2008) numa raça portuguesa (Sorraia) com baixo número de indivíduos na população, na qual a motilidade progressiva do sêmen foi inferior ( $P < 0,05$ ) à de animais Puro-Sangue Lusitanos (11,79% e 31,52%, respectivamente) após o resfriamento do sêmen a 4 °C por 24 horas, o que comprova maior susceptibilidade do sêmen dos animais pertencentes da raça Sorraia após o resfriamento.

#### **2.4. Testes complementares**

Existem muitas características inerentes à célula espermática e etapas necessárias para que o espermatozoide possa fecundar o oócito, entre elas, destacam-se: motilidade progressiva, morfologia normal, metabolismo suficiente para produção de energia, integridade das membranas plasmática e acrossomal, capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação do acrossoma, penetração no citoplasma e capacidade do núcleo se descondensar e permitir o desenvolvimento embrionário (Amann & Hammerstedt, 1993; Graham, 1996). Uma estimativa do potencial de fertilização da amostra de sêmen pode ser obtida pela identificação e avaliação dessas características, correlacionando-as com a fertilidade *in vivo* (Graham & Mocé, 2005).

Ainda não existe um teste capaz de prever a capacidade fecundante dos espermatozoides. Assim, pesquisadores têm buscado a melhor associação de testes estruturais e funcionais para estimar a integridade das células espermáticas e que apresente alta correlação com as taxas de prenhez (Januskauskas et al., 2001).

Avaliações convencionais do sêmen fresco ou processado incluem a determinação do volume do sêmen livre de gel, da concentração de espermatozoides por mL, da motilidade, do vigor (velocidade) e da morfologia espermática. Outros testes complementares, como o supravital, o hiposmótico, o de sondas fluorescentes e o de termorresistência, podem e são utilizados em laboratórios e em centrais de reprodução. Todos os testes laboratoriais são utilizados visando prever a capacidade fecundante do sêmen. Entretanto, esses parâmetros de avaliação muitas vezes não são correlacionados à fertilidade do garanhão. As avaliações laboratoriais permitem diferenciar um



sêmen de boa e de má qualidade, porém a boa qualidade de um sêmen bom não é garantia de fertilidade aceitável (Colenbrander et al., 2003).

Pressupõe-se, com base nesses estudos, que as características seminais podem determinar em muitos casos a fertilidade do garanhão e principalmente sua eficiência reprodutiva. Muitos aspectos, no entanto, ainda são contraditórios e inviabilizam o diagnóstico preciso da fertilidade de determinados garanhões (Voss et al., 1993; Rousset et al., 1987).

#### **2.4.1. Morfologia espermática**

A morfologia espermática é um dos principais parâmetros na avaliação da qualidade espermática, pois anormalidades na morfologia espermática podem afetar a capacidade fertilizante do sêmen. Diversas anormalidades da morfologia espermática podem ser aceitáveis no ejaculado de garanhões e possibilitar sua classificação como normal (Kavak et al., 2004), todavia, garanhões de alta fertilidade em uso constante têm baixa frequência de anormalidades morfológicas no sêmen (Rousset et al., 1987).

A morfologia da célula espermática pode ser avaliada por meio de preparações úmidas, associadas ou não a esfregaços corados. O método preferido pela *Society for Theriogenology* é o de fixação não-corada (Jasko, 1992), pelo qual o sêmen é fixado em solução de formol salina e, em seguida, é colocado (uma gota) entre lâmina e lamínula e observado em microscópio de contraste de fase com aumento de 1.000 vezes. Para o método de coloração, a combinação de eosina e nigrosina é a mais comum (Jasko, 1992): uma gota da solução de eosina-nigrosina é misturada com uma gota do sêmen sobre a lâmina e um esfregaço é obtido na lâmina. A morfologia é avaliada em microscópio de luz com aumento de 1.000 vezes.

Morrel et al. (2008), avaliando a morfologia espermática de vários ejaculados de 11 garanhões com fertilidade entre 22,2% e 81% de gestação por ciclo, verificaram variação de 32,3% a 77,5% de espermatozoides normais e observaram correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais e a taxa de gestação. Utilizando 64 garanhões e apenas um ejaculado, Jasko et al. (1990) observaram correlação de  $r=0,36$

( $P < 0,01$ ) entre o percentual de espermatozoides normais e a taxa de gestação por ciclo.

Em estudo no qual avaliaram diversos parâmetros relacionados à fertilidade de garanhões de alta e baixa qualidade seminal, Fernandes & Pimentel (2002) evidenciaram que a morfologia foi a única variável correlacionada positivamente com a fertilidade ( $r=0,50$ ). Apesar de a morfologia espermática afetar a fertilidade, alguns desses defeitos podem ser compensados, de modo que a fertilidade pode ser aumentada com a utilização de mais espermatozoides na inseminação, enquanto outros fatores são não-compensatórios, o que dificulta correlacionar a avaliação morfológica com a fertilidade em alguns casos (Walters et al., 2005; Saacke, 2008). Evidências suportam o conceito de que os efeitos não-compensatórios são decorrentes de aberrações na cromatina em espermatozoides morfológicamente normais (Saacke, 2008).

Atualmente, a morfometria espermática de algumas espécies animais tem sido estudada por alguns pesquisadores com auxílio de instrumentos automatizados (Colenbrander et al., 2003; Graham & Mocé, 2005). Davis et al. (1993), por exemplo, desenvolveram o método padrão para a análise automatizada da morfometria espermática em equinos. A morfometria da cabeça dos espermatozoides vem sendo padronizada, o que possibilita relacionar clinicamente as diferenças morfométricas entre animais férteis e subférteis. Gravance et al. (1996) utilizaram o método de morfometria automatizada para estudar uma população de garanhões férteis ( $n=10$ ) com taxa de concepção acima de 60% e outra população de animais subférteis ( $n=10$ ) com taxa de concepção inferior a 40%. Os valores médios das cabeças dos espermatozoides entre o grupo de garanhões férteis e subférteis foram, respectivamente, de 5,35 e 5,81  $\mu\text{m}$  de comprimento; 2,79 e 2,90  $\mu\text{m}$  de largura; 11,43 e 12,66  $\mu\text{m}^2$  de área e 13,76 e 14,68  $\mu\text{m}$  de perímetro ( $P < 0,001$ ).

A avaliação da morfologia espermática usando microscópio de contraste de fase permite a obtenção de informações importantes sobre a qualidade seminal, entretanto, a integridade estrutural da membrana plasmática e de algumas organelas é essencial para fertilização e só pode ser bem avaliada utilizando-se testes de integridade (supravital e colorações fluorescentes) e

funcionalidade de membrana (teste hiposmótico) e testes de avaliação de DNA e organelas.

#### **2.4.2. Teste supravital**

O primeiro teste desenvolvido para avaliação da integridade da membrana plasmática foi o supravital, também conhecido como teste dos vivos ou mortos. Esse teste, assim como os demais testes de integridade de membrana, se baseia no fato de que a membrana plasmática íntegra poderia prevenir a entrada do corante no citoplasma celular. A combinação da eosina-nigrosina é a mais utilizada, pois a eosina penetra pela membrana lesionada dos espermatozoides, corando o interior do núcleo e possibilitando identificar os espermatozoides mortos. É uma técnica de fácil uso e que dispensa o uso de microscópio especial.

Melo & Henry (1999) evidenciaram valores entre 73% e 82,6% de espermatozoides não-corados (vivos) após a realização da técnica de eosina-nigrosina em sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. Além disso, verificaram alto índice de correlação ( $r=0,75$ ;  $P<0,05$ ) entre a taxa de espermatozoides não-corados e a motilidade total e progressiva. Johansson et al. (2008) observaram correlações positivas ( $P<0,01$ ) entre o supravital (eosina-nigrosina) e a motilidade espermática e morfologia do sêmen de garanhões,  $r=0,72$  e  $0,57$ , respectivamente.

Nunes et al. (2008) evidenciaram 79 a 90% de espermatozoides viáveis pela coloração de eosina-nigrosina após resfriamento por 24 horas e 72 a 87% de espermatozoides viáveis após 48 horas.

#### **2.4.3. Teste hiposmótico**

O teste hiposmótico (HOST) é relativamente simples para avaliação da integridade funcional da membrana espermática. A membrana plasmática bioquimicamente ativa é requerida para que ocorram os processos de capacitação e reação do acrossoma e de ligação da célula espermática à superfície do oócito. Esse teste foi desenvolvido inicialmente para o sêmen

humano (Jeyendran et al., 1984) recentemente vem sendo usado em bovinos (Correa & Zavos, 1994; Correa et al., 1997), suínos (Vazquez et al., 1997), cães (Kumi-Diaka, 1993) e garanhões (Neild et al., 1999; Melo & Henry, 1999; Lagares et al., 2002; Fürst, 2006).

Durante o teste hiposmótico, a atividade bioquímica do espermatozoide promove o influxo de água, em decorrência da maior osmolaridade presente no interior da célula espermática, desencadeando o aumento do volume interno para o equilíbrio entre o compartimento fluido no interior do espermatozoide e o compartimento extracelular. Esse aumento no volume é associado à expansão da membrana celular que recobre a cauda, provocando seu enrolamento em situações em que o espermatozoide possui a membrana funcionalmente intacta (Figura 2). O enrolamento inicia-se na extremidade da parte distal da cauda e prossegue para a peça intermediária e a cabeça, onde a pressão osmótica é reduzida (Drevius & Eriksson, 1966; Jeyendran et al., 1984).

Pommer et al. (2002) avaliaram a resistência da célula espermática equina em diversas pressões osmóticas e observaram que osmolaridades inferiores a 150 e superiores a 900 mOsm/L podem ser prejudiciais à motilidade e à integridade da membrana plasmática.

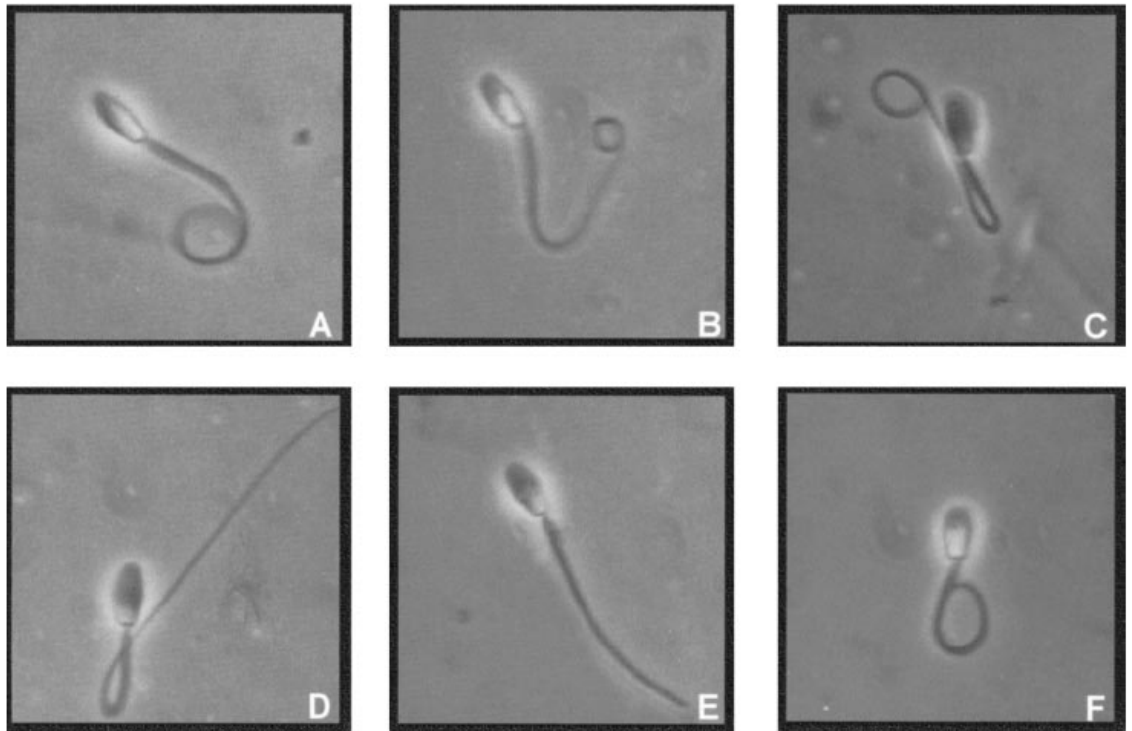


Figura 2 - Tipos de enrolamento de cauda de espermatozoides equinos considerados bioquimicamente funcionais (Neild et al., 2000).

O meio hiposmótico deve possuir uma pressão ótima que cause aumento suficiente do volume celular, mas que não seja inferior à osmolaridade para promover a lise da membrana celular. Os meios hiposmóticos contêm geralmente frutose e citrato de sódio misturados em iguais proporções (Jeyendran et al., 1984; Kumi-Diaka, 1993; Correa & Zavos, 1994; Correa et al., 1997), ou frutose, citrato de sódio, lactose e sacarose sozinhos (Neild et al., 1999). Os melhores resultados são obtidos em osmolaridades de 50 a 150 mOsm/L (Jeyendran et al., 1984; Amirat et al., 2004). Os resultados do teste hiposmótico têm boa correlação com a motilidade espermática progressiva (Jeyendran et al., 1984; Kumi-Diaka, 1993; Correa & Zavos, 1994; Neild et al., 1999; Juhazs et al., 2000).

Melo & Henry (1999), avaliando duas soluções de açúcares (frutose e sacarose), duas de eletrólitos (citrato de sódio e cloreto de sódio) e diversas osmolaridades (50, 100, 150, 200, 250 e 300) no teste hiposmótico para equinos, concluíram que a solução mais indicada para esse teste na espécie equina é aquela à base de sacarose a 100 mOsm/L.

Lagares et al. (2002) estudaram diversas osmolaridades das soluções hiposmóticas pelo volume celular no espermátocrito e, avaliando a integridade da membrana pela coloração de eosina-nigrosina, observaram correlação positiva entre o volume celular no espermátocrito e das células viáveis. Jannet et al. (2003a) evidenciaram correlação negativa ( $r = -0,4$ ) entre o enrolamento da cauda no teste hiposmótico e o número de serviços por gestação em pesquisa na qual utilizaram uma solução de 100 mOsm/L e sêmen congelado de garanhões. Neild et al. (2000) avaliaram a utilização de solução de lactose (50 mOsm/L) do sêmen fresco de 25 garanhões e observaram  $56,1\% \pm 14,2$  de reatividade ao teste hiposmótico. Esses autores verificaram também correlação de  $r = 0,82$  ( $p = 0,0001$ ) com a motilidade progressiva, de  $r = 0,53$  ( $P = 0,008$ ) com a porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais e de  $r = 0,08$  ( $P = 0,75$ ) apenas com a taxa de gestação. Neste estudo, o sêmen de 6 dos 25 animais utilizados apresentou 20-40% de motilidade espermática progressiva, porém com 50-60% de reatividade ao teste hiposmótico e mais de 80% de fertilidade.

#### **2.4.5. Corantes (sondas) fluorescentes**

As estruturas e funções espermáticas que podem ser avaliadas com corantes fluorescentes incluem integridade e viabilidade da membrana plasmática, integridade acrossomal, respiração mitocondrial e integridade do DNA (Graham et al., 1990; Garner & Johnson, 1995).

A determinação da integridade da membrana plasmática pode ser realizada por meio da utilização de corantes fluorescentes impermeáveis à membrana e que possuem afinidade ao DNA. Desse modo, as células não-coloradas são consideradas membranas plasmáticas intactas. O iodeto de propídio (PI), Hoeschst 33258 (H258), YoPro-1, brometo de etídio, homodímero de etídio-1 (EthD-1), ToPro-1 e TOTO são os exemplos mais comuns dessas sondas. Uma alternativa é o uso de sondas acetiladas, que contêm radicais acetil, passam pela membrana intacta, e imediatamente são desacetiladas por esterases intracelulares, tornando-se impermeáveis e permitindo a emissão de luz verde no microscópio de epifluorescência. Assim, as células intactas apresentam coloração, porém é possível haver ligação das sondas às células

deterioradas com membrana lesada. Exemplos dessas sondas são o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), diacetato de carboxidimetilfluoresceína (CDMFDA) e SYBR-14, que coram as células íntegras de verde. O mais rotineiramente utilizado é a combinação desses dois tipos de sondas, como SYBR-14 ou CFDA com PI ou EthD-1, que permite detectar as células com a membrana plasmática intacta e lesada (Figura 3), respectivamente (Aurich, 2005; Turner, 2005).

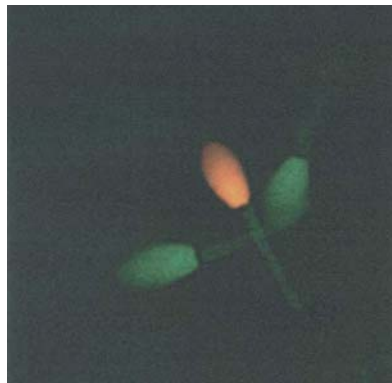


Figura 3 - Espermatozoides íntegros (verde) e lesados (vermelho) pela coloração de fluorescência SYBR-14/PI (Turner, 2005).

O iodeto de propídio possui algumas vantagens, como facilidade de preparação e aplicação e estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana corada. Além disso, é melhor que o brometo de etídio, por ser menos lipofílico e menos permeante à membrana plasmática (Jeulin et al., 1982). Assim, é bastante utilizado, tanto isoladamente como em associações a outros corantes. Esse tipo de sonda possui afinidade pelo DNA e cora em vermelho o núcleo de células com a membrana plasmática lesada (Graham et al., 1990; Arruda, 2000).

As sondas fluorescentes podem ser utilizadas na citometria de fluxo e possibilitam avaliar facilmente informações de subpopulações em uma amostra, o que é ideal para a análise de populações heterogêneas, como os espermatozoides (Gillan et al., 2005). A análise pelo citômetro de fluxo é objetiva e permite a leitura de dezenas de milhares de células espermáticas em aproximadamente um minuto e, ainda, a associação de sondas fluorescentes (Graham, 2001).

Love et al. (2003) utilizaram o iodeto de propídio e o SYBR-14 em associação com o JC-1 (avalia funcionalidade mitocondrial) para avaliação da integridade de membrana do sêmen de garanhões diluídos com o EZ-Mixin<sup>®</sup> e resfriados no Equitainer<sup>®</sup> por 24 horas. Esses autores adicionaram diversas proporções de espermatozoides mortos para avaliação e comprovação dessas duas técnicas e verificaram alta correlação ( $r=0,98$ ;  $P<0,0001$ ) entre a motilidade total avaliada pelo sistema CASA e a integridade de membrana avaliada por auxílio da citometria de fluxo. Kuisma et al. (2006) também verificaram correlação significativa entre a técnica do CFDA/PI e a de motilidade progressiva. Pagl et al. (2006) verificaram a utilização de diferentes diluidores compostos à base de leite ou frações de leite e observaram, pela coloração de fluorescência SYBR-14 e iodeto de propídio, variação de 64-90% e espermatozoides íntegros após o resfriamento do sêmen com esses diluidores a 5 °C por 24 a 72 horas. Kareskoski et al. (2006) utilizaram a associação do CFDA com o iodeto de propídio para avaliar sêmen equino diluído com o meio extensor de Kenney resfriado no Equitainer<sup>®</sup> por 24 horas e observaram que a porcentagem de espermatozoides considerados íntegros variou de 50-65% e de 20-35% no caso do sêmen congelado pela mesma técnica de fluorescência.

#### **2.4.5. Teste de termorresistência (TTR)**

O teste de termorresistência foi inicialmente proposto em 1967 por Dimitropoulos para avaliação do potencial de fertilidade do sêmen bovino congelado e posteriormente foi adaptado para as demais espécies. O teste se baseia na incubação de uma amostra de sêmen em banho-maria, em temperatura e tempo pré-determinados de acordo com a espécie animal. A temperatura e o tempo variam de acordo com o tipo de TTR realizado: no TTR lento a temperatura situa-se em torno de 37°C, enquanto no TTR rápido a temperatura é mais elevada (45°C). A motilidade e o vigor são as características normalmente avaliadas durante o TTR e que podem ser avaliadas para o sêmen equino a intervalos de 20, 30 ou 60 minutos até o final do TTR, que pode chegar até 240 minutos (CBRA, 1998; Zúccari, 1998). O teste de termorresistência possui grande aceitação entre os testes na



espécie bovina, principalmente por sua alta relação (0,78) com a fertilidade a campo (Dimitropoulos, 1967).

## **2.5. Taxa de prenhez do sêmen equino resfriado**

A fertilidade de um rebanho é resultado de vários fatores em conjunto, como: qualidade do sêmen, manejo das éguas, condição nutricional e sanitária dos animais e fatores ambientais. O acompanhamento adequado do ciclo estral das fêmeas resulta em melhores taxas de prenhez (Van der Holst, 1984, citado por Nunes, 2006). Rota et al. (2004) evidenciaram que, sob condições ideais de manejo, éguas submetidas a inseminação artificial em centrais especializadas apresentam taxas de prenhez maiores, 80,6% (n=31), que as obtidas a campo, 52% (n=25).

Jasko et al. (1992c) relataram que taxas de gestação obtidas com sêmen refrigerado por 24 horas são semelhantes às obtidas com sêmen a fresco, entretanto, quando esse período excede 48 horas, pode ocorrer redução de cerca de 50%. Douglas-Hamilton et al. (1984), utilizando sêmen equino refrigerado a 4°C armazenado por 6 a 23 horas, obtiveram taxa de gestação de 91% ao terceiro ciclo em 46 éguas de diversas categorias reprodutivas. Darenius (1998) observou bons índices de natalidade obtidos com o sêmen refrigerado, de 68,83%. Além disso, os resultados não diferiram daqueles obtidos com a monta natural ou sêmen a fresco, de 69,83 e 74,50%, respectivamente, porém foram superiores aos obtidos com sêmen congelado (56,57%).

Na literatura constam vários índices, como taxa de recuperação embrionária, taxa de gestação por ciclo, taxa de natalidade, que podem ser utilizados para expressar a fertilidade do sêmen resfriado (Tabela 2).

Tabela 2 - Fertilidade de sêmen equideo resfriado a diferentes temperaturas e regimes de inseminação

Temperatura (°C)	Tempo de estocagem (horas)	Concentração (espermatozoides viáveis/dose x10 <sup>9</sup> )	Volume/dose (mL)	Frequência da inseminação artificial (IA)	Diluidor	Índice	Referência
4	6-23	1,0-1,5	-----	1,6 IA por ciclo estral	Kenney et al. (1975)	58,33% (n=72) Taxa de prenhez / ciclo	Douglas-Hamilton et al. (1984)
5-7	24	-----	-----	-----	Kenney et al. (1975)	82% (n=11) Taxa de prenhez ao 1º ciclo	Heiskanen et al. (1987)
5-7	24	-----	-----	-----	Kenney et al. (1975) - Heps e Teofilina	70% (n=10) Taxa de prenhez ao 1º ciclo	Heiskanen et al. (1987)
5	48	0,5	20	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	40,5% (n=37) Taxa de recuperação embrionária	Zidane et al. (1991)
20	48	0,5	20	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	14,3% (n=14) Taxa de recup. embrionária	Zidane et al. (1991)
4	24	0,6	-----	Dias alternados	Leite desnatado-Glicose	65% (n=83) Taxa de prenhez ao 1º ciclo	Jasko et al. (1992c)
4-6	24	0,25	-----	Dias alternados	Gema de ovo	80% (n=30) Taxa de prenhez por ciclo	Ferreira (1993)
4-6	48	0,25	-----	Dias alternados	Gema de ovo	76% (n=29) Taxa de prenhez por ciclo	Ferreira (1993)
---	41	1,5-2,0	40	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	87% (n=15) Taxa de prenhez ao 1º ciclo	Heiskanen et al. (1994a)
---	41	1,5-2,0 (sêmen centrifugado)	40	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	60% (n=15) Taxa de prenhez ao 1º ciclo	Heiskanen et al. (1994a)

---	70-80	2,0	25-50	Única inseminação artificial pós-ovulação	Kenney et al. (1975)	65% (n=40) Taxa de prenhez/ciclo	Heiskanen et al. (1994b)
20	0,95	----- --	19	Dias alternados	Lactose - gema de ovo	62,96 % (n=54) Taxa de prenhez por ciclo	Carvalho et al. (1997)
----	1,45	----- --	45	Dias alternados	Lactose - gema de ovo	62,5% (n=40) taxa de prenhez/ciclo	Silva Filho et al. (1997)
8	2,2	----- --	25	Dias alternados	Lactose - gema de ovo	59,09% (n=88) taxa de prenhez/ciclo	Silva Filho et al. (1998a)
9	2,2	0,56	20	Dias alternados	Glicina-gema de ovo	56,36 % (n=55) taxa de prenhez/ciclo	Silva Filho et al. (1998b)
9	2,2	0,56	20	Dias alternados	Lactose - gema de ovo	47,17 (n=53) taxa de prenhez/ciclo	Silva Filho et al. (1998b)
15	24	0,2	10	-----	INRA 96	57 % (n=178) Taxa de prenhez/ciclo	Battelier et al. (1998)
4	24	0,2	10	-----	INRA 82 e Kenney	40 % (n=173) Taxa de prenhez/ciclo	Battelier et al. (1998)
14	3,6	0,4	15	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	56% (n=148) Taxa de prenhez por ciclo	Valle et al. (1999)
20	64	0,3	20	Dias alternados	Lactose - gema de ovo	54,25 % (n=32) taxa de prenhez/ciclo	Lima et al. (2000)
15-20	24	0,3	40	Única com indução da ovulação	Kenney et al. (1975)	71,42% (n=35) Taxa de prenhez ao 1º ciclo	Nunes et al. (2004)
2	24	0,65	45	Única com indução da ovulação	Kenney et al. (1975)	69,23% (n=13) taxa de prenhez ao 1º ciclo	Nunes (2006)
2	48	0,75	39	Única com indução da ovulação	Kenney et al. (1975)	69,23% (n=26) taxa de prenhez ao 1º ciclo	Nunes (2006)

Avaliando 25 trabalhos publicados nos anais do 8<sup>th</sup> *International Symposium on Equine Reproduction* e todos os artigos do volume 60 da *Theriogenology* (n=42), Amann (2005) constatou que 76% (51/67) dos trabalhos eram falhos. Esse autor alertou ainda que a interpretação de muitos estudos relacionados à fertilidade deve ser cuidadosamente avaliada, visto que, em muitos trabalhos utilizados no estudo, não foi considerada a influência da fertilidade da fêmea sobre a eficiência reprodutiva do macho, ou foi utilizado reduzido número de fêmeas ou machos, o que pode ter ocasionado não-significância estatística entre as variáveis estudadas.

Desse modo, vários fatores podem influenciar a eficiência reprodutiva do sêmen equino resfriado, desde a qualidade seminal e o efeito individual do garanhão a diluidores, temperaturas e taxas de resfriamento, tempo de estocagem, tipo de contêiner, volume e dose inseminante, momento da inseminação e a própria fertilidade da fêmea a ser inseminada até o acompanhamento do ciclo estral deste animal por técnico habilitado. A compreensão e o atendimento a esses requisitos possibilitam que o sêmen resfriado equino seja amplamente difundido e utilizado pelas associações de criadores de raças equinas, possibilitando maior difusão e ganho genético do rebanho equino nacional.

### **3. EXPERIMENTOS**

#### **3.1. Experimento 1 - Viabilidade *in vitro* do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador resfriado a 5 °C por 24 horas com dois diluidores**

##### **3.1.1. MATERIAL E MÉTODOS**

###### **3.1.1.1. Local e período de experimentação**

O experimento foi desenvolvido durante o mês de dezembro de 2008 no Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais, nas coordenadas geográficas de 20° 45' 14" Sul, 42° 52' 53" Oeste e 752,5 m de

altitude, com temperatura média anual de 20,9 °C, índice pluviométrico anual de 1.203 mm e clima predominantemente tropical seco e úmido (fonte: Instituto de Geociências Aplicadas – IGA).

### **3.1.1.2. Animais e alimentação**

Foram utilizados três garanhões da raça Mangalarga Marchador, com 8 a 14 anos de idade, selecionados antes do início do experimento por exame andrológico e histórico reprodutivo e mantidos em baia com 5 × 3 m, onde foram alimentados com capim-elefante, concentrado e sal mineral conforme recomendações do NRC (2007).

### **3.1.1.3. Delineamento experimental**

#### *Coleta e diluição do sêmen*

Foram realizadas cinco coletas de sêmen de cada garanhão três vezes por semana (domingo, terça-feira e quinta-feira), com auxílio de vagina artificial, modelo Hannover, utilizando-se éguas em estro natural como manequim. Após as coletas, o sêmen foi diluído com os dois diluidores (tratamentos): Kenney - diluidor à base de leite em pó desnatado (Kenney, 1975 – Tabela 3); e Foote - diluidor glicina-gema (Foote, 2002 – Tabela 3). Uma pré-diluição do sêmen foi realizada na proporção de 1:1 (diluidor/sêmen); em seguida, foi mensurada a concentração espermática e acrescida a quantidade de diluidor necessária para obter concentração de 30 milhões de espermatozoides viáveis por mL, em um volume total de 11,86 mL. O sêmen foi colocado em contêiner apropriado (Equitainer<sup>®</sup>), onde foi resfriado por 24 horas (Figura 4).

Tabela 3 - Composição, pH e osmolaridade dos diluidores seminais utilizados

Constituinte	Kenney (1975)	Foote (2002)
Glicose	49 g	10 g
Leite em pó desnatado	24 g	----
Glicina	----	3,3 g
Citrato de Sódio	----	3,3 g
Gema de ovo	----	200 mL
Penicilina G	1.000.000 U.I.	1.000.000 U.I.
Sulfato de Estreptomicina	----	1 g
Água destilada (q.s.p.)	1 Litro	1 Litro
-----	Osmolaridade: 329,2 mOsm/Kg	Osmolaridade: 180,4 mOsm/Kg
-----	pH: 6,74	pH: 6,60

#### *Avaliação do sêmen fresco, diluído e resfriado*

Os parâmetros físicos de motilidade progressiva e vigor do sêmen fresco e diluído e resfriado com os dois diluidores foram avaliados em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. A morfologia espermática do sêmen diluído (tempo 1) e resfriado (tempo 2) com ambos os diluidores foi avaliada após a deposição de uma gota de sêmen previamente diluído em solução de formol salina tamponada a 37 °C, entre lâmina e lamínula e após a contagem de 200 células espermáticas em microscópio óptico de contraste de fase com aumento de 1.000 vezes para classificação das células que apresentaram defeitos menores ou maiores.

#### *Teste supravital*

O teste supravital foi aplicado utilizando-se a coloração de eosina-nigrosina. Uma gota (10 µL) do sêmen foi colocada junto a uma gota (10 µL) do corante sobre uma lâmina e o esfregaço realizado após 5 minutos. Os espermatozoides classificados como vivos não são corados pela eosina, enquanto os mortos apresentam o núcleo corado de vermelho-rosado. Foram

contadas 100 células espermáticas de cada amostra sob microscopia óptica comum em aumento de 400 vezes. O sêmen diluído com ambos os diluidores testados foi analisado antes e depois do processo de resfriamento.

#### *Teste hiposmótico (HOST)*

Uma solução de 100 mOsmol à base de sacarose (Tabela 1 - Anexos) foi previamente preparada e acondicionada em geladeira até sua utilização por no máximo 15 dias. Alíquotas de 1 mL desta solução foram colocadas em *ependorf* aquecido a 37 °C, acrescidas de 20 µL de sêmen e incubadas por 50 minutos em banho-maria, a 37 °C. Posteriormente, foram analisadas realizando-se a contagem de 100 células de cada amostra em microscopia de contraste de fase com aumento de 400x.

As células foram classificadas pela presença ou ausência de cauda enrolada, segundo padrões descritos por Neild et al. (2000). O cálculo da reação hiposmótica foi realizado por meio da seguinte fórmula:  $HOST = (\% \text{ de caudas enroladas após o HOST}) - (\% \text{ de caudas enroladas antes do HOST})$  conforme descrito por Melo & Henry (1999).

#### *Teste de epifluorescência*

A avaliação da integridade de membrana do sêmen após o resfriamento também foi verificada utilizando-se a associação de dois corantes fluorescentes: o iodeto de propídeo (PI) e o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA). As células espermáticas foram identificadas como íntegras, semilesadas ou lesadas, segundo Zúccari (1998):

Íntegro: espermatozoide com membrana plasmática íntegra, corada pelo CFDA, apresentando-se verde fluorescente em toda sua extensão.

Lesado: espermatozoide com membrana plasmática e acrossomal lesada, célula corada pelo iodeto de propídeo, apresentando-se em vermelha fluorescente.

Semilesado: espermatozoide com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra, célula corada de verde pelo CFDA na região do acrossoma e núcleo corado de vermelho (iodeto de propídeo).

Foram adicionados 10  $\mu$ L do sêmen resfriado com ambos diluidores a um *ependorf* contendo 40  $\mu$ L de solução estoque (Tabela 2 - Anexos) contendo o CFDA/PI, que se encontrava em temperatura ambiente em local com o mínimo de luminosidade possível. A leitura das lâminas foi realizada no máximo 3 horas após a homogeneização do *ependorf*. As lâminas foram preparadas (preparação úmida) em temperatura ambiente e avaliadas ao abrigo de luz, em microscópio de fluorescência, utilizando-se filtros de 480 a 610 nm (fluoresceína e rodamina, respectivamente) e aumento de 1.250 vezes com objetiva de imersão.

Todas as soluções (Tabela 2 - Anexos) foram preparadas ao abrigo da luz e mantidas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise do sêmen.

#### *Teste de termorresistência*

A longevidade dos espermatozoides frescos diluídos e resfriados por 24 horas foi avaliada pelo teste de termorresistência lento, que consiste no acondicionamento de 1 mL da amostra do sêmen diluído em um *ependorf* de 1,5 mL, o qual é posteriormente incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 90 minutos para avaliações da motilidade espermática progressiva e do vigor espermático a cada 30 minutos.



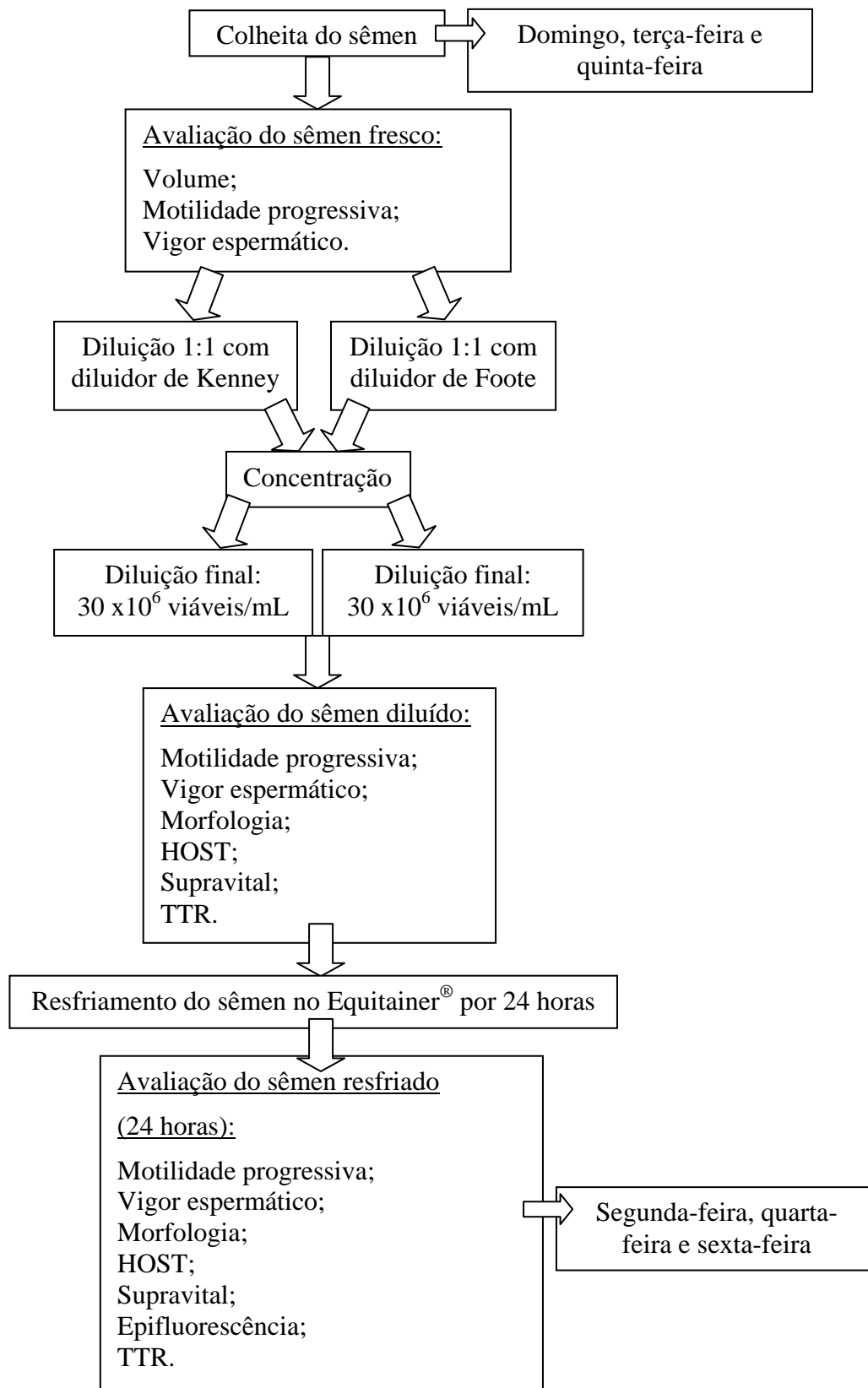


Figura 4 - Fluxograma dos procedimentos e avaliações realizadas no resfriamento do experimento 1.

#### 3.1.1.4. Análise estatística

As variáveis-dependentes consideradas foram: motilidade progressiva do sêmen, vigor espermático, morfologia espermática, reatividade ao HOST, espermatozoides vivos pela eosina-nigrosina e espermatozoides íntegros, semilesados e lesados pelo teste de epifluorescência.

Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) a 5% de significância e pelo teste de Student-Newman Keuls (SNK) para comparar as médias obtidas. A correlação simples de Pearson foi testada entre as variáveis (motilidade progressiva, reativos ao HOST, epifluorescência e vivos) para verificar possíveis relações entre as características estudadas. Foi utilizado o programa estatístico SAEG (UFV, 1997).

### 3.1.2. RESULTADOS

#### 3.1.2.1. Características do sêmen fresco dos garanhões

Os valores médios das características físicas do sêmen dos três garanhões, como volume, concentração, número total de espermatozoides viáveis, motilidade espermática progressiva e vigor estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 - Características físicas do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Garanhões	Volume (mL)	Concentração (espermatozoides $\times 10^6$ /mL)	Espermatóides viáveis ( $\times 10^9$ )	Motilidade progressiva (%)	Vigor (0-5)
G1 (n=5)	75,6 $\pm$ 10,5 <sup>A</sup>	103,5 $\pm$ 44,7 <sup>A</sup>	5,4 $\pm$ 1,8 <sup>A</sup>	72,0 $\pm$ 2,7 <sup>A</sup>	3,2 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>
G2 (n=5)	15,8 $\pm$ 6,5 <sup>C</sup>	159,0 $\pm$ 77,4 <sup>A</sup>	1,6 $\pm$ 1,1 <sup>B</sup>	61,0 $\pm$ 6,5 <sup>B</sup>	3,3 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>
G3 (n=5)	54,4 $\pm$ 12,4 <sup>B</sup>	151,1 $\pm$ 49,1 <sup>A</sup>	4,6 $\pm$ 2,4 <sup>A</sup>	55,0 $\pm$ 7,9 <sup>B</sup>	3,1 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>
Geral	48,6 $\pm$ 27,3	137,9 $\pm$ 60,1	3,9 $\pm$ 2,4	62,7 $\pm$ 9,3	3,2 $\pm$ 0,3

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste SNK.

### 3.1.2.2. Taxa de diluição, concentração pós-diluição e volume da amostra

A taxa de diluição (quantidade de diluidor: sêmen), a concentração após a diluição final e o volume da amostra acondicionada no contêiner não diferiram entre os três garanhões utilizados neste estudo ( $P>0,05$ ) (Tabela 5).

Tabela 5 - Volume da amostra acondicionada no contêiner, concentração espermática após a diluição e a taxa de diluição do sêmen

Garanhões	Volume da amostra (mL)	Concentração pós-diluição (espermatozoides/mL)	Taxa de diluição (diluidor:sêmen)
G1 (n=5)	12,0 ± 0,0	30,1 ± 7,0	1,4 ± 0,7
G2 (n=5)	11,6 ± 0,9	31,3 ± 4,4	2,1 ± 0,9
G3 (n=5)	12,0 ± 0,0	28,7 ± 6,4	1,8 ± 1,3
Geral	11,9 ± 0,5	30,0 ± 5,7	1,8 ± 1,0

( $P>0,05$ )

### 3.1.2.3. Características físicas e morfológicas e integridade de membrana do sêmen fresco diluído

Entre as características físicas e morfológicas avaliadas no sêmen fresco diluído com os dois diluidores seminais (Tabela 6), o único parâmetro que diferiu entre os sêmens foi o vigor espermático ( $P<0,05$ ), que foi maior no sêmen diluído com o diluídos Kenney em comparação ao diluído com o Foote ( $3,43 \times 3,10$ , respectivamente).

Tabela 6 - Características físicas e morfológicas do sêmen fresco diluído com os dois diluidores seminais

Tratamento	Motilidade progressiva (%)	Vigor (0-5)	Espermatozoides normais (%)	Defeitos maiores (%)	Defeitos menores (%)
Kenney (n=15)	62,3 ± 9,6	3,4 ± 0,4 <sup>A</sup>	71,3 ± 7,5 <sup>A</sup>	8,8 ± 3,8 <sup>A</sup>	20,0 ± 7,8 <sup>A</sup>
Foote (n=15)	60,0 ± 11,0	3,1 ± 0,3 <sup>B</sup>	72,0 ± 8,8 <sup>A</sup>	7,1 ± 3,0 <sup>A</sup>	22,2 ± 9,7 <sup>A</sup>

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem ( $P<0,05$ ) pelo teste F.

Os resultados obtidos com os testes hiposmótico e supravital no sêmen fresco diluído com os dois diluidores seminais estão sumariados na Tabela 7.

Tabela 7 - Porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST) e vivos no teste supravital para o sêmen fresco diluído de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Diluidor	HOST (reativos, %)	Supravital (vivos,%)
Kenney (n=15)	47,5 ± 15,7	61,6 ± 5,3
Foote (n=15)	59,2 ± 13,3	72,8 ± 8,6

(P>0,05)

Os valores médios de espermatozoides com motilidade progressiva e o vigor espermático durante o teste de termorresistência estão representados nas Figuras 5 e 6. O valor médio da motilidade progressiva não diferiu entre os diluidores, mas, como esperado, reduziu com o passar do tempo de TTR. O vigor espermático nos dois diluidores também reduziu ao longo do tempo transcorrido do teste de termorresistência.

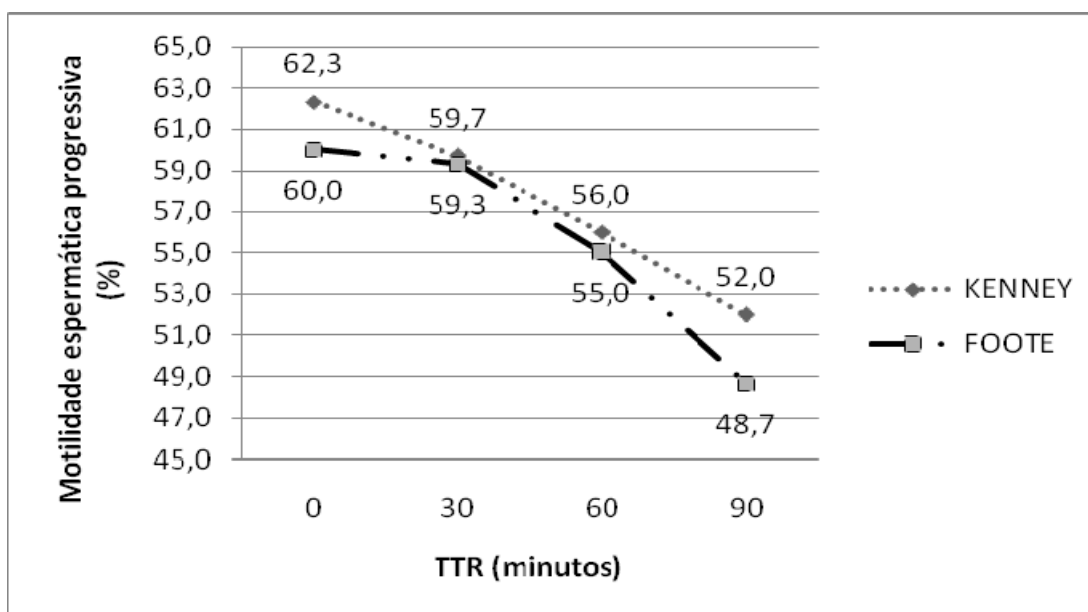


Figura 5 - Motilidade progressiva média do sêmen diluído de garanhões da raça Mangalarga Marchador durante o teste de termorresistência (TTR) (P>0,05).

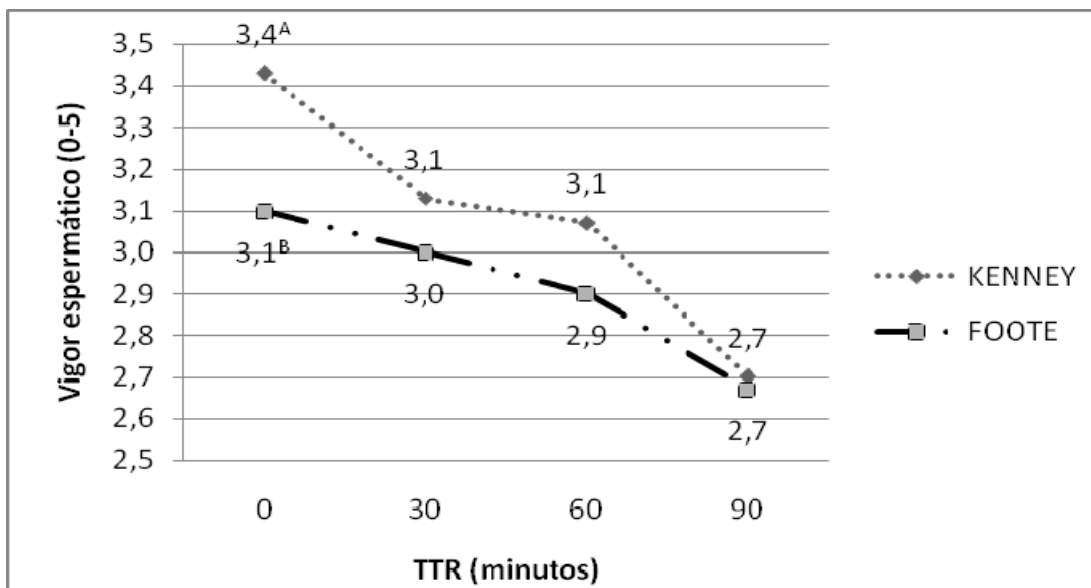


Figura 6 - Vigor médio do sêmen diluído de garanhões da raça Mangalarga Marchador durante o teste de termorresistência (TTR). Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste F.

### 3.1.2.4. Características físicas, morfológicas e da integridade de membrana do sêmen resfriado

Os valores médios das características físicas (vigor e motilidade espermática progressiva) e morfológicas do sêmen após o período de resfriamento de 24 horas estão sumariados na Tabela 8. A motilidade progressiva e o vigor espermático do sêmen diluído com Kenney foram superiores aos do sêmen diluído com Foote ( $P < 0,05$ ), entretanto, não foram evidenciadas diferenças entre os diluidores quanto à morfologia espermática ( $P > 0,05$ ).

Tabela 8 - Características físicas e morfológicas do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador resfriado a 5 °C por 24 horas com dois diluidores seminais

Tratamento	Motilidade progressiva (%)	Vigor (0-5)	Espermatozoides normais (%)	Defeitos maiores (%)	Defeitos menores (%)
Kenney (n=15)	37,0 ± 9,4 <sup>A</sup>	2,4 ± 0,3 <sup>A</sup>	65,7 ± 8,7 <sup>A</sup>	9,3 ± 5,3 <sup>A</sup>	25,0 ± 7,8 <sup>A</sup>
Foote (n=15)	30,3 ± 11,0 <sup>B</sup>	2,0 ± 0,5 <sup>B</sup>	67,7 ± 9,8 <sup>A</sup>	7,9 ± 5,0 <sup>A</sup>	24,6 ± 10,9 <sup>A</sup>

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem (P<0,05) pelo teste F.

A integridade e funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides foram avaliadas com base nos testes supravital, hiposmótico e epifluorescência e estão representados na Tabela 9. Não houve diferença (P>0,05) entre os diluidores quanto ao percentual de espermatozoides vivos avaliado com base no teste supravital (Tabela 9). Todavia, os valores médios obtidos nos testes hiposmótico e de epifluorescência do sêmen resfriado com Foote foram maiores (P<0,05) que os do sêmen resfriado com Kenney.

Tabela 9 - Porcentagem de espermatozoides reativos ao HOST, vivos (supravital) e íntegros (epifluorescência) no sêmen resfriado

Tratamento	HOST (reativos, %) n=15	Supravital (vivos, %) n=15	Epifluorescência (íntegros, %) n=12
Kenney	23,6 ± 11,3 <sup>B</sup>	34,9 ± 22,9	22,5 ± 20,3 <sup>B</sup>
Foote	39,9 ± 14,0 <sup>A</sup>	47,8 ± 21,4	61,0 ± 14,0 <sup>A</sup>

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem (P<0,05) pelo teste F.

A porcentagem média de espermatozoides com motilidade espermática progressiva e o vigor espermático médio durante o TTR do sêmen resfriado estão representados nas Figuras 7 e 8. O valor médio da motilidade progressiva diferiu entre os diluidores nos tempos 0 e 30 do teste de termorresistência. Os menores valores foram observados para ambos os diluidores no teste de TTR 90. O vigor espermático observado com o uso de ambos os diluidores também reduziu ao longo do tempo transcorrido do TTR.

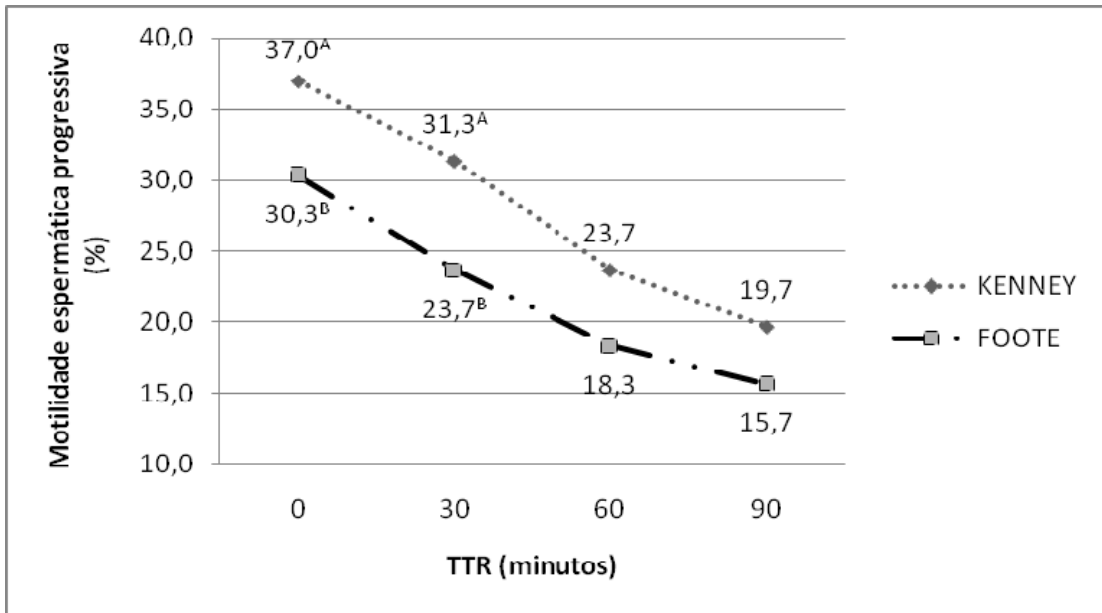


Figura 7 - Motilidade progressiva média do sêmen diluído de garanhões da raça Mangalarga Marchador durante o teste de termorresistência (TTR).  
Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste F.

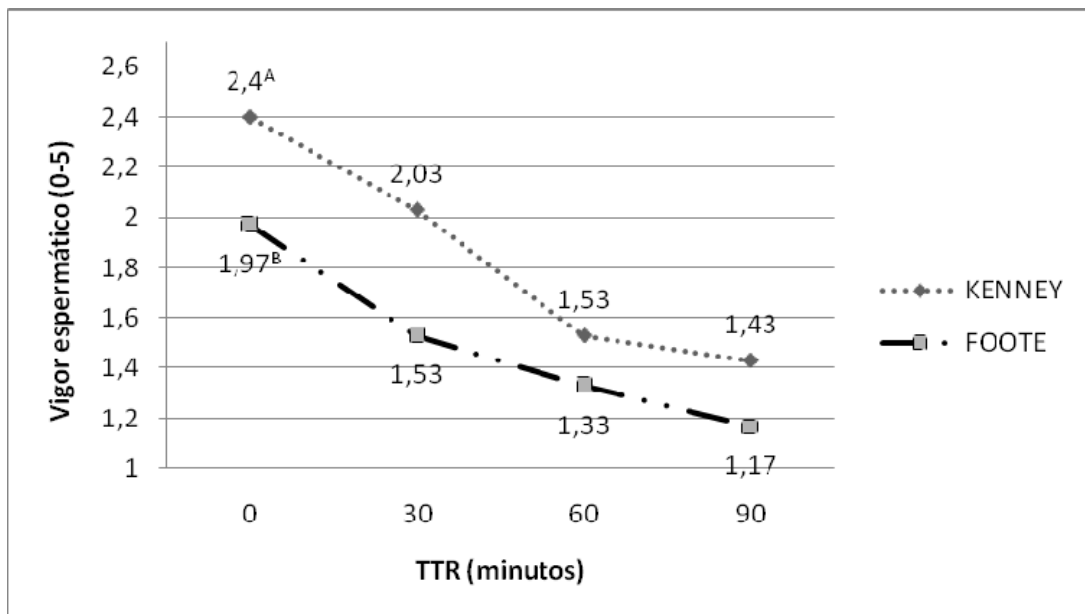


Figura 8 - Vigor médio do sêmen resfriado de garanhões da raça Mangalarga Marchador durante o teste de termorresistência (TTR).  
Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste F.

Os valores médios das características físicas (motilidade espermática progressiva e vigor) e porcentagem de espermatozoides normais morfológicamente do sêmen dos três garanhões resfriado com os dois diluidores utilizados estão expressos na Tabela 9. Não foi observada diferença ( $P>0,05$ ) na porcentagem média de espermatozoides morfológicamente normais entre os dois diluidores (65,64% x 67,70%, para Kenney e Foote, respectivamente).

Tabela 10 - Motilidade espermática progressiva, vigor espermático e morfologia do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador diluído em dois diluidores seminais e resfriado a 5 °C por 24 horas

Garanhões	Kenney			Foote		
	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Espermatozoides normais (%)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Espermatozoides normais (%)
G1 (n=5)	44,0 ± 5,5 <sup>A</sup>	2,5 ± 0,0 <sup>A</sup>	67,7 ± 6,0 <sup>A</sup>	42,0 ± 8,4 <sup>A</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>A</sup>	61,7 ± 12,0 <sup>A</sup>
G2 (n=5)	41,0 ± 2,2 <sup>A</sup>	2,6 ± 0,2 <sup>A</sup>	68,0 ± 13,5 <sup>A</sup>	28,0 ± 6,7 <sup>B</sup>	2,0 ± 0,4 <sup>A</sup>	73,0 ± 7,0 <sup>A</sup>
G3 (n=5)	26,0 ± 6,5 <sup>B</sup>	2,1 ± 0,4 <sup>B</sup>	61,3 ± 3,4 <sup>A</sup>	21,0 ± 6,5 <sup>B</sup>	1,5 ± 0,4 <sup>B</sup>	68,4 ± 7,8 <sup>A</sup>

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem ( $P<0,05$ ) pelo teste SNK.

Foi observada correlação ( $P<0,01$ ) entre os testes de integridade e funcionalidade da membrana plasmática com a motilidade progressiva apenas em dois (hiposmótico e supravital) dos três testes realizados (Tabela 11). Verificou-se também correlação do teste hiposmótico com o supravital e com o teste de epifluorescência ( $r= 0,56$  e  $r= 0,45$ , respectivamente).



Tabela 11 - Correlação Simples de Pearson entre a motilidade progressiva espermática e os testes de avaliação de integridade e funcionalidade da membrana plasmática

Parâmetro	Correlação	Valor-P
Epifluorescência × motilidade (n=24)	r=0,10	0,33
Epifluorescência × HOST (n=24)	r=0,45	0,01
Epifluorescência × supravital (n=24)	r=0,20	0,17
HOST × motilidade (n=60)	r=0,49	0,00001
HOST × supravital (n=60)	r=0,56	0,00001
Supravital × motilidade (n=60)	r=0,53	0,00001

### 3.1.3. DISCUSSÃO

A taxa de diluição do sêmen, a concentração de espermatozoides por mL e o volume da dose resfriada são fatores que interferem na qualidade do sêmen após o período de armazenamento a baixas temperaturas (Varner et al., 1987; Brinsko et al., 2000). Neste estudo, o volume e a concentração de espermatozoides na dose resfriada não diferiram entre os ganhões ( $P > 0,05$ ), fato relacionado ao delineamento experimental empregado, no qual se objetivou preparar doses com concentração de 30 a 33 milhões de espermatozoides viáveis/mL e volume de 12 mL. Esse volume não foi obtido em duas amostras devido ao baixo volume de sêmen sem gel do ejaculado do ganhão 2. O volume médio de  $11,86 \pm 0,54$  mL por dose está dentro dos valores recomendados para resfriamento e inseminação (Squires et al., 1989; Jasko et al., 1992b). A concentração média de 30,03 milhões de espermatozoides viáveis/mL neste estudo objetivou atender às recomendações propostas por Varner et al. (1989), de 25 a 50 milhões de espermatozoides viáveis por mL. Grandes diluições (menos de  $25 \times 10^6$  espermatozoides viáveis/mL) promovem baixa motilidade e fertilidade do sêmen resfriado

(Varner et al., 1987), assim como grandes concentrações espermáticas não permitem suporte energético e proteção suficientes do diluidor para as células espermáticas durante o armazenamento (Katila, 1997).

A taxa de diluição adequada é fundamental para a preservação da viabilidade espermática sob refrigeração por 24 a 72 horas. Jasko et al. (1992a) verificaram que taxas de diluição variando de 1:4 a 1:19 (sêmen : diluidor) são adequadas para a preservação do sêmen equino refrigerado a 5°C e que a presença de pelo menos 5% de plasma seminal é importante para a manutenção da viabilidade do sêmen. Neste estudo, a taxa de diluição também não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os garanhões e foi de 1,42; 2,08 e 1,82 (diluidor: sêmen) para os garanhões 1, 2 e 3 respectivamente, fato decorrente da concentração do sêmen fresco dos três garanhões, a qual foi de  $137,86 \pm 60,13$  e não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os animais.

A utilização do sêmen fresco diluído é uma técnica que permite melhor aproveitamento do garanhão dentro do haras, pois ocasiona menor desgaste do animal na estação de monta. Com essa técnica, o animal realiza menor número de saltos e ejaculações. A diluição do sêmen fresco neste experimento permitiu manter a qualidade seminal tanto com diluidor à base de leite em pó quanto com diluidor à base de glicina-gema de ovo ( $P>0,05$ ). O vigor do sêmen diluído com Kenney foi superior ao sêmen diluído com o Foote, o que pode ser explicado pela maior disponibilidade de ATP para a célula espermática advinda principalmente da utilização da glicose contida neste diluidor (4,9 g/100 mL).

O uso de testes complementares para avaliação da integridade e da funcionalidade da membrana plasmática, assim como outras estruturas e organelas da célula espermática, é uma tendência para o futuro, visto que avaliações da fertilidade *in vivo*, apesar de adequadas, são mais onerosas e a cada dia se tornam mais indisponíveis, em decorrência da escassez de locais de experimentação e de matrizes suficientes para se obter boa confiabilidade do experimento. Além disso, experimentos a campo se tornam igualmente difíceis, pois os proprietários necessitam de um respaldo para que a pesquisa não interfira nos índices reprodutivos do rebanho, o que impossibilita algumas vezes o desafio e a busca por inovações por parte dos pesquisadores. Neste contexto, alguns testes de avaliação da integridade e funcionalidade da membrana plasmática, como o hiposmótico, o supravital e o de

epifluorescência, têm sido comumente utilizados para se referir à viabilidade e prever a fertilidade do sêmen equino.

Neste estudo, a avaliação da funcionalidade da membrana plasmática da célula espermática por meio do hiposmótico não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os diluidores utilizados no sêmen fresco. Da mesma forma, o supravital não indicou diferença na porcentagem média de espermatozoides vivos entre os diluidores no sêmen antes do resfriamento. Os valores médios de viabilidade dos espermatozoides obtidos de  $47,52\% \pm 15,70$  e  $59,17\% \pm 13,33$  para o teste hiposmótico e de  $47,52\% \pm 15,70$  e  $59,17\% \pm 13,33$  para o supravital nos diluidores Kenney e Foote, respectivamente, corroboram aos registrados por Neild et al. (2000), de  $56,1\% \pm 14,2$  de células reativas ao teste hiposmótico, e os obtidos por Fürst (2006), de  $52,3\%$  de reativos no teste hiposmótico no sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

A eficiência do teste de termorresistência no sêmen de equinos ainda não foi amplamente estudada. Entretanto, estudos avaliando esse teste no sêmen equino congelado, apesar de serem escassos, recomendam de 90 a 240 minutos de realização do teste (CBRA, 1998; Zúcarí, 1998) para o sêmen congelado e o resultado da avaliação do sêmen resfriado é expresso no tempo em que o sêmen manteve motilidade igual ou superior a 30% (CBRA, 1998). Durante a avaliação da motilidade e do vigor espermático do sêmen equino diluído e submetido ao teste de termorresistência por 90 minutos, foi observada redução contínua dessas características ao longo do teste. Não houve diferença entre os diluidores e, após o período do teste (90 min.), o sêmen ainda se encontrava com boa viabilidade ( $50,34\%$  de motilidade progressiva e  $2,69$  de vigor médio), portanto, pode ser considerado viável para utilização em programas de inseminação artificial a fresco.

Não houve diferença entre a porcentagem de espermatozoides normais e defeitos menores ou maiores entre os dois diluidores após o resfriamento. No entanto, o número de patologias espermáticas aumentou com ambos os diluidores em comparação ao sêmen fresco e isso reforça o conceito de que o processo de resfriamento promove injúrias celulares irreversíveis, o que pode comprometer a fertilidade do sêmen (Graham, 1996).

A motilidade progressiva e o vigor espermático foram maiores ( $P<0,05$ ) no sêmen obtido com o diluidor Kenney, em decorrência da melhor disponibilidade

de substrato desse diluidor (à base de leite desnatado) em comparação ao diluidor de glicina-gema de ovo, uma característica que lhe confere maior suporte energético para sobrevivência e movimentação da célula espermática. A gema de ovo também pode prejudicar a respiração do espermatozoide (Tosic & Walton, 1946), promovendo redução da motilidade (Pace & Graham, 1974). Essa observação difere dos relatos de Ijaz & Ducharme (1995), em estudo no qual utilizaram o diluidor de Kenney (1995) e um diluidor diferente, também à base de glicina-gema de ovo (Dimitropoulos, 1967). Outros pesquisadores também relataram os efeitos da utilização de diluidores à base de gema de ovo para o resfriamento do sêmen equino e obtiveram resultados comparáveis ou melhores que os obtidos com diluidores à base de leite desnatado (Carvalho et al., 1997; Silva Filho et al., 1997; 1998a; 1998b; Melo et al., 2005).

Durante o teste de termorresistência do sêmen resfriado, a motilidade progressiva obtida com o diluidor Kenney foi numericamente superior nos quatro tempos de avaliação, porém foi maior ( $P < 0,05$ ) apenas no TTR 0 e TTR 30, situando-se em padrões acima dos 30% de motilidade preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal somente até o TTR 30. O diluidor de Foote promoveu o pior resultado durante o teste de termorresistência, o qual se mostrou inferior aos padrões recomendados pelo CBRA para sêmen resfriado já no TTR 30. Assim, na aplicação do teste de termorresistência, apesar de sua moderada a alta correlação com a fertilidade no sêmen bovino congelado (Dimitropoulos et al., 1967; Casagrande et al., 1979), e, considerando que na espécie equina é adotado principalmente em trabalhos experimentais, o procedimento varia consideravelmente entre autores, o que implica diferenças nos resultados e não inviabiliza a obtenção de um padrão adequado para essa característica para o sêmen resfriado e congelado na espécie equina. Isso impossibilita a comparação deste estudo com trabalhos na literatura.

O teste de termorresistência utilizado para equinos foi adaptado a partir daquele empregado para bovino. No entanto, a célula espermática equina é muito mais sensível ao efeito do frio. Portanto, esse procedimento pode não ser o método mais adequado, o que o torna pouco prático e ineficiente. Zúccari (1998) concluiu que a duração de 240 minutos para o sêmen equino congelado foi inadequada para o teste de termorresistência a 37 °C, visto que, mesmo as

doses com motilidade pós-descongelamento dentro dos padrões recomendados, praticamente todas as células apresentaram-se imóveis ao final do teste.

A redução acentuada da motilidade progressiva logo aos 30 minutos de teste pode ser ocasionada por perdas de componentes intracelulares ou lesões nas estruturas locomotoras do espermatozóide. É factível que a disponibilidade de nucleotídeos cíclicos, envolvidos na fosforilação oxidativa e na motilidade, seja insuficiente, embora a mitocôndria tenha a capacidade de produzir energia (Harrison & Vickers, 1990).

A membrana plasmática tem função de permitir o transporte seletivo de moléculas através da célula, e sua integridade é importante para que ocorram as reações necessárias à união dos gametas masculino e feminino (Jeyendran et al., 1984). Na avaliação do efeito de ambos diluidores sobre a integridade e funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides resfriados, não foi verificada diferença ( $P > 0,05$ ) entre os diluidores pelo teste supravital. Diferentemente deste estudo, Melo & Henry (1999) evidenciaram superioridade na porcentagem de espermatozoides viáveis pelo teste supravital no meio contendo gema de ovo. A viabilidade do sêmen equino resfriado avaliada pelo teste supravital (41,33% de espermatozoides vivos) em 24 horas de resfriamento foi inferior à analisada por Nunes et al. (2008), que observaram valores 79 a 90% de espermatozoides viáveis após o resfriamento por 24 horas e 72 a 87% de espermatozoides viáveis após 48 horas. Da mesma maneira, Melo & Henry (1999) evidenciaram valores entre 73% e 82,6% de espermatozoides não-corados (vivos) após a realização da técnica de eosina-nigrosina em sêmen equino resfriado com diferentes diluidores.

O diluidor de Foote apresentou superioridade ( $P < 0,05$ ), tanto no teste hiposmótico quanto no teste de epifluorescência, comprovando que, apesar de não proporcionar motilidade e vigor adequados à célula espermática, promove maior proteção à membrana plasmática. Entretanto, Harrison & Vickers (1990) não recomendam a utilização do método de associação dos corantes CFDA e PI, para a avaliação de diluidores contendo glicina ou TRIS, por conterem concentrações significativas de grupos aminas que podem interferir na atuação dos corantes. Esse fato pode explicar a grande diferença da porcentagem média de espermatozoides viáveis entre os diluidores Kenney e Foote ( $22,53 \pm$

20,30 e 60,98 ± 13,98, respectivamente), visto que o diluidor Foote possui em sua constituição 0,33 g de glicina por 100 mL.

No sêmen resfriado, a motilidade progressiva média do sêmen resfriado com Kenney apresentou valores superiores à porcentagem de espermatozoides viáveis pelos três testes de viabilidade de membrana plasmática. Esse fato pode ter sido ocasionado por lesões na membrana plasmática, que não comprometeram as funções essenciais para que a célula espermática obtivesse energia e substratos para se movimentar progressivamente. Entretanto, observou-se efeito contrário sêmen diluído com Foote, o qual apresentou os piores resultados de motilidade progressiva. Esse decréscimo da motilidade pode ser explicado por alterações na energia disponível ou danos aos elementos do axonema que podem comprometer a motilidade espermática progressiva sem promover alto índice de lesão na membrana plasmática (Watson, 1995).

Desse modo, o local e o tipo de lesão celular são fatores de extrema importância, visto que o tipo de lesão influencia diretamente na viabilidade espermática, podendo comprometer ou não características como a motilidade progressiva e o vigor espermático e afetar estruturas responsáveis pelos processos de capacitação e fecundação.

A motilidade e morfologia espermática são as características seminais que mais se correlacionam à fertilidade (Dowset et al., 1984; Daels et al., 1991; Jasko et al., 1992c). Desta maneira, espera-se associação entre a motilidade espermática e a integridade e funcionalidade de sua membrana plasmática. Entretanto, foi verificada baixa a média correlação da motilidade progressiva com apenas dois testes de membrana,  $r=0,49$  e  $r=0,53$  ( $P=0,00001$ ) para os testes hiposmótico e supravital, respectivamente. Johansson et al. (2008) também observaram correlações positivas entre o teste supravital (eosina-nigrosina) e a motilidade do sêmen de garanhões,  $r=0,72$  ( $P<0,01$ ).

Considerando o teste hiposmótico como teste para avaliação da funcionalidade da membrana plasmática, Neild et al. (2000) verificaram correlação de  $r=0,82$  ( $P=0,0001$ ) com a motilidade progressiva e de  $r=0,53$  ( $P=0,008$ ) com a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais, mas não verificaram correlação desse teste com a taxa de gestação ( $r=0,08$ ;  $P=0,75$ ). Entretanto, Jannet et al. (2003a) evidenciaram correlação negativa ( $r=$

-0,4) entre o enrolamento da cauda no teste hiposmótico e o número de serviços por gestação ao utilizarem uma solução de 100 mOsm/L para o sêmen equino congelado. As osmolaridades e os solutos utilizados nas soluções hiposmóticas podem interferir na resposta da célula espermática ao teste, promovendo assim resultados distorcidos que podem influenciar a não correlação desse teste com a fertilidade em alguns estudos. Além disso, o fato de se ter uma membrana bioquimicamente ativa não garante a movimentação e a capacidade fertilizante desta célula, pois outros fatores correlacionados a estruturas e organelas do espermatozoide podem estar comprometidos após o armazenamento, impedindo o processo de fertilização.

Não foi observada correlação do teste de epifluorescência utilizando a associação do CFDA/PI com a motilidade, porém houve baixa correlação de espermatozoides íntegros pelo método com CFDA/PI com a reatividade ao teste hiposmótico,  $r=0,45$  ( $P = 0,01$ ). O teste hiposmótico também teve correlação média ( $r=0,56$ ) com os espermatozoides viáveis pelo teste supravital ( $P = 0,00001$ ). A não-associação entre esses testes reforça a ideia de que formas e locais diferentes das lesões celulares podem ocasionar efeitos adversos na motilidade espermática e que o maior entendimento dessas lesões é necessário para prever a real fertilidade do sêmen com base na associação destes testes complementares.

Foi observado efeito individual do ganhão sobre o resfriamento com ambos os diluidores ( $P<0,05$ ). Essa variação da susceptibilidade do sêmen ao resfriamento é designada como uma variação normal entre espécies, raças, indivíduos e até mesmo ejaculados e pode estar correlacionada ao conteúdo de colesterol e fosfolípidios na membrana plasmática do espermatozoide (Gadella et al., 2001). Brisko et al. (2000) relataram que, conforme a susceptibilidade dos ejaculados à estocagem ao frio, esses ejaculados podem ser considerados como “resfriadores bons” ou “resfriadores ruins”. Todavia, o sêmen do ganhão 3, que apresentou menor motilidade e vigor após o resfriamento em relação ao ganhão 1 com ambos diluidores, já apresentava motilidade progressiva inferior antes do armazenamento a baixa temperatura.

A morfologia espermática não apresentou variação entre os animais, o que pode estar correlacionado à semelhança ( $P>0,05$ ) da porcentagem de patologias entre os ganhões antes do resfriamento. Desta forma, o

processamento térmico promoveu porcentagem similar de injúrias celulares nos três garanhões utilizados neste estudo. Jasko et al. (1990) utilizaram 64 garanhões e avaliaram apenas um ejaculado e encontraram baixa correlação de  $r=0,36$  ( $P<0,01$ ) entre o percentual de espermatozoides normais e a taxa de gestação por ciclo. Fernandes & Pimentel (2002), avaliando vários parâmetros quanto à fertilidade de garanhões de alta e baixa qualidade seminal, evidenciaram que a morfologia foi a única variável correlacionada positivamente com a fertilidade ( $r=0,50$ ). Apesar desta possível associação e de sua relevância, neste estudo, essa correlação não foi analisada, pois não foi possível a verificação da fertilidade *in vivo* do sêmen.

#### **3.1.4. CONCLUSÕES**

Ambos os diluidores podem ser empregados na inseminação artificial a fresco, o que possibilita melhor utilização do reprodutor.

O diluidor de Kenney protege melhor a célula espermática após o resfriamento a 5 °C por 24 horas, preservando a motilidade e o vigor espermático.



## **3.2. Experimento 2 - Fertilidade do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador resfriado a 5 °C com dois diluidores**

### **3.2.1. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.2.1.1. Local e período de experimentação**

O experimento foi desenvolvido no Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais, nas coordenadas geográficas de 20° 45' 14" Sul, 42° 52' 53" Oeste e 752,5 m de altitude, com temperatura média anual de 20,9 °C, índice pluviométrico anual de 1.203 mm e clima predominantemente tropical seco e úmido (fonte: Instituto de Geociências Aplicadas - IGA). O estudo compreendeu duas estações de monta consecutivas (2007/2008 e 2008/2009), durante o período de janeiro a fevereiro e outubro a dezembro de 2008.

#### **3.2.1.2. Animais e alimentação**

Foram utilizadas 38 éguas (potras, éguas paridas e solteiras) mestiças da raça Bretão-Postier com 4 a 18 anos de idade e peso vivo entre 350 e 500 kg, com bom escore de condição corporal. Os animais foram mantidos em piquetes. As éguas receberam suplementação com capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) picado, sal mineral *ad libitum* e concentrado (proteico e energético), conforme recomendações do NRC (2007) para a categoria de animais estudada.

As éguas foram selecionadas antes do início do experimento, mediante exame ginecológico completo por palpação e ultrassonografia transretal e com base no histórico reprodutivo. No período da estação de monta, a caracterização de ciclicidade reprodutiva foi baseada na presença de corpo lúteo, pela avaliação do tônus e da ecotextura uterina e pela existência de folículos  $\geq 25$  mm em crescimento. Foram utilizadas apenas as éguas que apresentaram um ciclo estral anteriormente.

Utilizaram-se dois garanhões da raça Mangalarga Marchador, com 9 (ganhão 1) e 8 anos de idade (ganhão 2), selecionados antes do início do experimento por meio de exame andrológico e histórico reprodutivo. Os animais foram mantidos em baias com 5 × 3 m e alimentados com capim-elefante, concentrado e sal mineral conforme recomendações do NRC de 2007.

### **3.2.1.3. Delineamento experimental**

#### *Coleta do sêmen*

Foram realizadas 17 coletas do sêmen do ganhão 1 e 23 coletas do sêmen do ganhão 2, três vezes por semana (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira), com auxílio de vagina artificial, modelo Hannover utilizando-se uma égua em estro natural como manequim. Após as coletas, o sêmen foi diluído com dois diluidores – um à base de leite em pó desnatado (Kenney, 1975) e outro à base glicina-gema (Foote, 2002), conforme descrito no experimento 1 – ajustados para uma dose inseminante de 500 milhões de espermatozoides viáveis num volume final de 15 mL por dose. O sêmen foi colocado em contêiner apropriado (Equitainer<sup>®</sup>), onde foi realizado o resfriamento até 5 °C por 24 horas.

#### *Avaliação do sêmen fresco, diluído e resfriado*

Os parâmetros físicos de motilidade progressiva e vigor do sêmen fresco, do sêmen diluído com os diluidores de Kenney e Foote e após o período de resfriamento com os diluidores de Kenney e Foote foram avaliados em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. A morfologia espermática do sêmen fresco e resfriado com ambos os diluidores foi avaliada após a deposição de uma gota de sêmen, previamente diluído em formol salina a 37 °C, entre lâmina e lamínula e a contagem de 200 células espermáticas em microscópio com contraste de fase com aumento de 1.000 vezes.

### *Inseminação e diagnóstico de gestação*

As éguas foram rufiadas periodicamente e aquelas que apresentavam comportamento de estro (cio) ou folículo maior que 25 mm de diâmetro, com condições uterinas desejáveis (ausência de líquido no lúmen uterino e início de edema endometrial) foram controladas diariamente por palpação transretal.

Após a detecção de folículo de 30 mm, as éguas foram distribuídas ao acaso em dois grupos: grupo A (éguas inseminadas com sêmen resfriado com diluidor Kenney) e grupo B (éguas inseminadas com sêmen resfriado com diluidor Foote). O sêmen dos garanhões foi utilizado aleatoriamente entre as éguas. As inseminações foram realizadas após um período de no mínimo 24 horas de armazenamento do sêmen a 5 °C. O sêmen foi depositado no corpo do útero a partir da detecção de um folículo de 30-40 mm até observação da ovulação. As inseminações foram feitas somente nas terças-feira, quintas-feira e nos sábados (Figura 9). Foram utilizados 31 ciclos estrais de 26 éguas no primeiro período experimental (janeiro e fevereiro de 2008) e 43 ciclos de 28 éguas no segundo período experimental (outubro a dezembro de 2008). O diagnóstico de gestação foi realizado a partir do 10<sup>o</sup> dia até o 13<sup>o</sup> dia após a ovulação por ultrassonografia transretal. Logo após a detecção da gestação, foi aplicado 1,0 mL de agente luteolítico (Lutalyse<sup>®</sup>) por via intramuscular nas éguas.

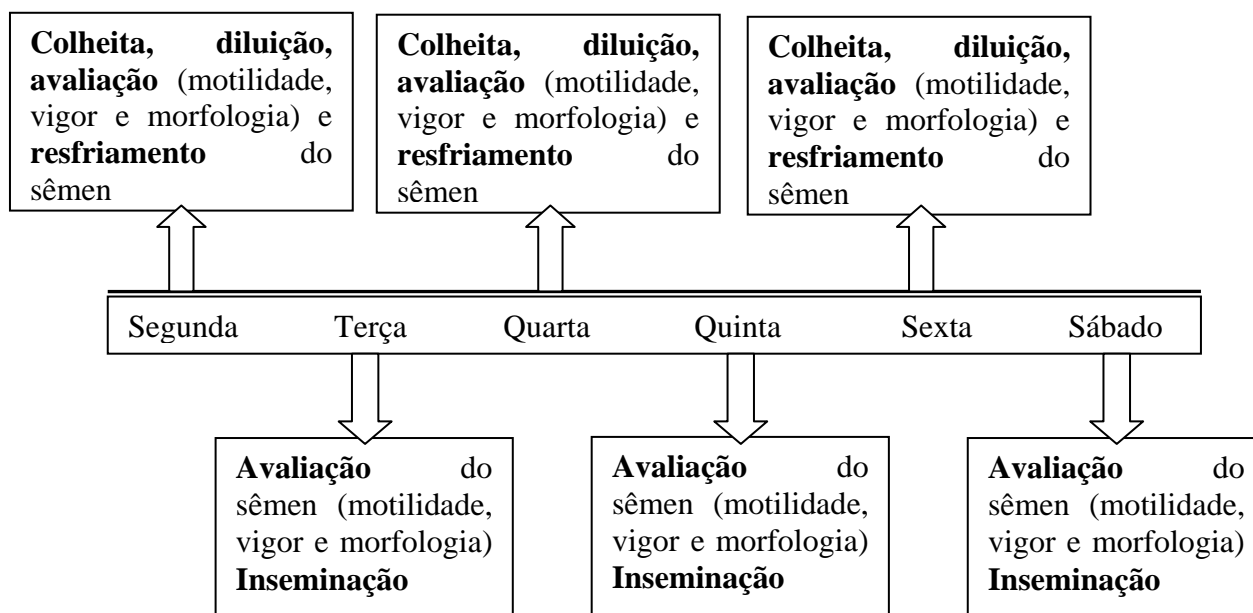


Figura 9 - Fluxograma dos procedimentos e avaliações realizadas para o resfriamento e inseminação do experimento 2.

#### 3.2.1.4. Análise estatística

As variáveis-dependentes consideradas foram: motilidade progressiva do sêmen, vigor espermático, temperatura e umidade do ambiente do local de armazenamento do sêmen, temperatura do sêmen após 24 horas de resfriamento, tempo de resfriamento, morfologia espermática do sêmen fresco e após resfriamento e taxa de gestação. A taxa de gestação foi avaliada pelo teste de dispersão de frequência Qui-Quadrado ( $X^2$ ) para verificação das possíveis diferenças entre diluidores.

Os dados quantitativos (paramétricos) foram analisados por meio de ANOVA e do teste de Student-Newman Keuls (SNK) a 5% de significância. O teste de correlação de Pearson foi aplicado para detectar a possível correlação da temperatura e umidade ambiente com a temperatura interna do contêiner. Foi utilizado o programa estatístico SAEG (UFV, 1997).

### 3.2.2. RESULTADOS

#### 3.2.2.1. Características do sêmen fresco dos garanhões

Os valores médios das características físicas do sêmen dos dois garanhões, como volume, concentração, número total de espermatozoides, espermatozoides viáveis, motilidade e vigor estão sumariados na Tabela 12.

Tabela 12 - Características físicas do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Garanhões	Volume (mL)	Concentração (Espermatozoides/mL)	Espermatozoides viáveis ( $\times 10^9$ )	Motilidade progressiva (%)	Vigor (0-5)
G1 (n=17)	34,8 $\pm$ 15,9 <sup>B</sup>	268,9 $\pm$ 90,9 <sup>A</sup>	5,6 $\pm$ 2,1 <sup>A</sup>	63,8 $\pm$ 6,0 <sup>B</sup>	3,2 $\pm$ 0,3 <sup>B</sup>
G2 (n=23)	69,4 $\pm$ 16,7 <sup>A</sup>	129,2 $\pm$ 100,9 <sup>B</sup>	5,3 $\pm$ 1,47 <sup>A</sup>	73,0 $\pm$ 4,2 <sup>A</sup>	3,6 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste F.

#### 3.2.2.2. Parâmetros reprodutivos de controle e de resultado

Considerando o que foi sugerido por Valle (1997), as características reprodutivas podem ser classificadas em dois tipos: os de controle e os de resultado. Os parâmetros de controle são aqueles que fornecem informações sobre a homogeneidade dos tratamentos e não são como os de resultados, que são respostas a determinado tratamento. As características reprodutivas avaliadas e designadas como parâmetros de controle e de resultado do experimento estão apresentadas nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13 - Parâmetros de controle dos garanhões

	Garanhão 1	Garanhão 2
Número de éguas	26	28
Número de ciclos	31	43
Taxa de diluição (diluidor:sêmen)	4,1 ± 1,6 <sup>A</sup>	1,5 ± 0,4 <sup>B</sup>
Volume da dose (mL)	15,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	16,1 ± 2,9 <sup>A</sup>
Intervalo da coleta à diluição (min.)	24,2 ± 7,0 <sup>A</sup>	19,0 ± 6,5 <sup>B</sup>
Intervalo da diluição ao resfriamento (min.)	6,5 ± 3,4 <sup>A</sup>	8,1 ± 5,7 <sup>A</sup>
Intervalo da coleta ao resfriamento (min.)	30,7 ± 8,3 <sup>A</sup>	27,1 ± 6,7 <sup>A</sup>
Intervalo do resfriamento à inseminação (horas)	24,7 ± 0,6 <sup>A</sup>	24,7 ± 0,4 <sup>A</sup>
Temperatura contêiner 24 horas (°C)	7,5 ± 0,9 <sup>A</sup>	7,8 ± 1,0 <sup>A</sup>

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem (P<0,05) pelo teste F.

Tabela 14 - Parâmetros de controle e de resultados dos tratamentos

	Kenney	Foote
Número de éguas	28	26
Número de ciclos	38	36
Intervalo da coleta ao resfriamento (min.)	28,6 ± 7,5	28,6 ± 7,5
Intervalo do resfriamento à inseminação (horas)	24,7 ± 0,5 <sup>A</sup>	24,7 ± 0,4 <sup>A</sup>
Temperatura contêiner 24 horas (°C)	7,7 ± 1,0	7,7 ± 1,0
Número de IA/ciclo	2,1 ± 0,6 <sup>A</sup>	1,9 ± 0,8 <sup>A</sup>
Número de IA/ciclo gestante	2,0 ± 0,3 <sup>A</sup>	2,0 ± 0,8 <sup>A</sup>
Número de IA/ciclo vazia	2,1 ± 0,7 <sup>A</sup>	1,9 ± 0,8 <sup>A</sup>

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem (P<0,05) pelo teste F.

### 3.2.2.3. Características físicas do sêmen diluído e resfriado

Os valores médios das características físicas (vigor e motilidade progressiva) do sêmen fresco diluído estão expressos na Tabela 15. Não houve diferença do valor médio da motilidade espermática progressiva entre os dois diluidores, porém, no sêmen diluído com Kenney, observou-se maior vigor espermático ( $P < 0,05$ ) logo após a diluição do sêmen fresco.

Tabela 15 - Características físicas do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador diluído com dois diluidores seminais

Tratamento	Motilidade progressiva (%)	Vigor (0-5)
Kenney (n=40)	69,2 ± 6,5	3,7 ± 0,3 <sup>A</sup>
Foote (n=40)	67,0 ± 8,4	3,1 ± 0,5 <sup>B</sup>

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste F.

As porcentagens médias da motilidade progressiva e do vigor espermático médio do sêmen resfriado estão expressas na Tabela 16. O vigor médio e a motilidade progressiva média foram maiores no sêmen diluído com Kenney, além disso, houve menor redução da motilidade em comparação ao sêmen diluído com Foote após o resfriamento ( $P < 0,05$ ).

Tabela 16 - Características físicas do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador resfriado a 5 °C por 24 horas com dois diluidores seminais

Tratamento	Motilidade progressiva (%)	Vigor (0-5)	Redução da motilidade (%)
Kenney (n=40)	51,0 ± 10,5 <sup>A</sup>	3,0 ± 0,4 <sup>A</sup>	18,1 ± 10,6 <sup>B</sup>
Foote (n=40)	42,5 ± 9,9 <sup>B</sup>	2,4 ± 0,5 <sup>B</sup>	25,9 ± 8,6 <sup>A</sup>

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste F.

As melhores características seminais (vigor e motilidade progressiva) foram observadas no sêmen resfriado do garanhão 2 ( $P < 0,05$ ). Entretanto, a redução da motilidade progressiva após o resfriamento não diferiu entre os dois garanhões ( $P > 0,05$ ) (Tabela 17).

Tabela 17 - Características físicas do sêmen dos garanhões da raça Mangalarga Marchador resfriado a 5 °C por 24 horas

Garanhão	Motilidade progressiva (%)	Vigor (0-5)	Redução da motilidade (%)
1 (n=34)	42,8 ± 11,5 <sup>B</sup>	2,4 ± 0,4 <sup>B</sup>	20,7 ± 13,7 <sup>A</sup>
2 (n=46)	49,7 ± 7,4 <sup>A</sup>	3,0 ± 0,3 <sup>A</sup>	22,9 ± 7,0 <sup>A</sup>

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem (P<0,05) pelo teste F.

#### 3.2.2.4. Características morfológicas do sêmen fresco e resfriado

Houve redução na porcentagem média de espermatozoides normais após o resfriamento nos dois diluidores utilizados (P<0,05). No entanto, não se evidenciou diferença (P>0,05) entre os diluidores para essa característica. Após o resfriamento, os espermatozoides apresentaram maior porcentagem de defeitos menores em comparação aos do sêmen fresco (Tabela 18).

Tabela 18 - Características morfológicas do sêmen fresco e resfriado com dois diluidores seminais

Tratamento	Espermatozoides normais (%)	Defeitos maiores (%)	Defeitos menores (%)
Sêmen fresco (n=36)	73,4 ± 4,3 <sup>A</sup>	4,7 ± 2,6	22,0 ± 4,3 <sup>B</sup>
Resfriado Kenney (n=34)	63,0 ± 11,1 <sup>B</sup>	4,1 ± 2,6	32,9 ± 11,1 <sup>A</sup>
Resfriado Foote (n=38)	64,2 ± 14,5 <sup>B</sup>	3,9 ± 2,6	32,0 ± 15,7 <sup>A</sup>

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem (P<0,05) pelo teste SNK.

Não foi observada correlação (P>0,05) entre a temperatura do contêiner e a temperatura máxima e mínima e a umidade máxima e mínima do ambiente (Tabela 19).



Tabela 19 - Correlação entre a temperatura do contêiner e a temperatura máxima e mínima e umidade máxima e a mínima ambiente

Parâmetros	Correlação	Valor-P
Temperatura contêiner × temperatura máxima (n=23)	r = -0,15	0,47
Temperatura contêiner × Temperatura mínima (n=23)	r = 0,27	0,10
Temp. contêiner × umidade máxima (n=23)	r = 0,18	0,21
Temp. contêiner × Umidade mínima (n=23)	r = 0,28	0,10

### 3.2.2.5. Fertilidade do sêmen resfriado

A taxa de gestação dos dois sêmens resfriados não diferiu entre os garanhões 1 e 2 (Tabela 20). Assim, os dados dos dois garanhões foram agrupados e a taxa de gestação (55,26%) foi maior para o diluidor Kenney que para o diluidor Foote (30,56%) pelo teste de dispersão de frequência Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) a 5% de significância.

Tabela 20 - Taxa de gestação (prenhez/ciclo) das éguas inseminadas

	Kenney (n=38)	Foote (n=36)
Garanhão 1	43,75% <sup>A</sup> (7/16)	26,67% <sup>A</sup> (4/15)
Garanhão 2	63,63 <sup>A</sup> (14/22)	33,33% <sup>A</sup> (7/21)
GERAL	55,26% <sup>A</sup> (21/38)	30,56% <sup>B</sup> (11/36)

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma linha diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Frequência Qui-quadrado.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal a partir do 10<sup>o</sup> dia após a ovulação em 20 dos 32 animais que ficaram gestantes em ambos os grupos. A detecção da gestação só foi 100% observada no 13<sup>o</sup> dia, porém já no 11<sup>o</sup> dia foi detectada gestação em 80% das éguas (Figura 10).

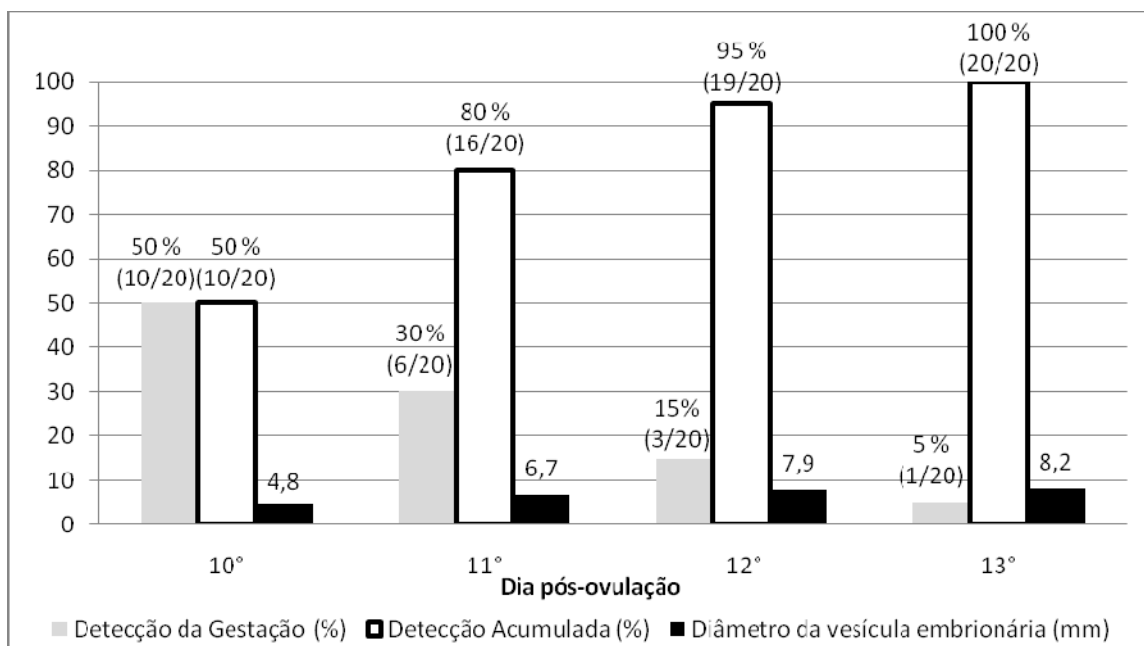


Figura 10 - Taxa de detecção e detecção acumulada de prenhez e diâmetro da vesícula embrionária em éguas gestantes entre o 10<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dia após ovulação.

### 3.2.3. DISCUSSÃO

A inseminação artificial com sêmen equino resfriado e transportado a longas distâncias se expandiu após o lançamento comercial do Equitainer<sup>®</sup>, que possui a taxa de resfriamento adequada para essa espécie (0,03 °C/min). A utilização desse contêiner esteve associada à utilização de diluidores seminais à base de leite desnatado e açúcares, como é o caso do diluidor proposto por Kenney et al. (1975). Apesar disso, muitos pesquisadores franceses, alemães, japoneses, americanos, holandeses e brasileiros buscam a formulação de diluidores que possam manter o máximo de viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado e armazenado por períodos de 1 a 2 dias, o que possibilita maior difusão do sêmen para regiões distantes e com fertilidade semelhante ao sêmen fresco (Silva Filho et al., 1987; 1994; 1998a).

As características físicas do sêmen fresco apresentaram variações entre os dois garanhões, mas não houve diferenças ( $P>0,05$ ) na quantidade de espermatozoides viáveis,  $5,64 \times 10^9$  e  $5,25 \times 10^9$  para os garanhões 1 e 2 respectivamente, o que comprova potencial reprodutivo similar dos dois

garanhões para utilização do sêmen em sistemas de inseminação artificial, situando-se dentro dos padrões médios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Essa similaridade ocorreu pelo fato de que, apesar de o garanhão 1 possuir menor volume ( $P < 0,05$ ) de sêmen livre de gel em relação ao garanhão 2 ( $34,82 \times 69,35$  mL), esse baixo volume foi compensado pela maior concentração espermática ( $268,94 \times 10^6$  espermatozoides/mL). Entretanto, a motilidade progressiva do sêmen do garanhão 2 foi cerca de 10 pontos percentuais superior à apresentada pelo garanhão 1, o que possibilita maior potencial de viabilidade no processamento térmico, credenciando-o a ser um reprodutor doador de sêmen para resfriamento e congelamento.

Por meio dos parâmetros de controle adotados neste experimento, pode-se constatar homogeneidade entre os grupos. O número de ciclo estrais designados ao garanhão 2 foi numericamente maior (43 ciclos  $\times$  31 ciclos), uma vez que a utilização desse garanhão foi posterior à do garanhão 1. Com isso, o número de ciclos dependeu da disponibilidade dos ciclos estrais até fim do período experimental. A taxa de diluição diferiu ( $P < 0,05$ ) entre os dois garanhões, fato relacionado à maior concentração espermática no sêmen do garanhão 1, com maior adição dos diluidores para que se pudesse obter a concentração final de 33 milhões de espermatozoides viáveis/mL, que foi determinada no delineamento experimental.

O controle da temperatura do contêiner resultou numa temperatura final em torno de  $7,65$  °C, o que está de acordo com o registrado por outros pesquisadores que também utilizaram o Equitainer<sup>®</sup> (Douglas-Hamilton et al., 1984; Malmgren et al., 1998; Avanzi et al., 2006; Melo et al., 2006), o que comprova a eficácia desse contêiner em manter a temperatura interna do dispositivo, sem sofrer grandes influências do ambiente externo.

Temperaturas finais de  $2$  a  $8$  °C têm sido aplicadas com sucesso para o sêmen diluído e resfriado por Nishikawa (1959), Van der Holst (1984), Douglas-Hamilton et al. (1984), Malmgren et al. (1998) e Melo et al. (2006). Ressalta-se que, neste estudo, esse contêiner não foi submetido ao transporte para outro local e permaneceu em condições laboratoriais, onde não há grandes variações térmicas. Douglas-Hamilton et al. (1984) verificaram que a temperatura final do sêmen resfriado no Equitainer<sup>®</sup> dependia da temperatura

inicial do sêmen e do volume a ser resfriado, mas não mencionaram sobre a temperatura ambiente. Todavia, Valle et al. (1999), ao utilizarem o contêiner Celle modificado, observaram que a temperatura ambiente influenciava as taxas iniciais de refrigeração e que essas taxas foram mais rápidas em condições laboratoriais, em torno de 22 °C, que aquelas obtidas quando o contêiner foi submetido ao transporte rodoviário, quando recebia insolação direta, com valores de -0,25 e -0,11 °C, respectivamente.

Malmgren et al. (1998) verificaram superioridade do Equitainer® em relação ao dispositivo Salsbro Box® quando utilizados em temperatura ambiente de 37 °C, permanecendo a 19,3 ± 3,9 °C no Salsbro Box® e 12,2 ± 1 °C no Equitainer®. Da mesma forma, Avanzi et al. (2006) avaliaram quatro dispositivos de transporte de sêmen disponíveis no mercado brasileiro (Equitainer®, Botutainer®, Max-Semen® e Botu-Box®) e relataram que apenas os sistemas Equitainer® e Botutainer® foram eficazes na manutenção da viabilidade espermática, quando expostos à temperatura ambiente de 40 °C durante 24 horas, o que condiz com as temperaturas observadas nas regiões tropicais brasileiras durante a estação de monta, o que indica que o Equitainer® é um contêiner resistente, que pode ser perfeitamente utilizado nessas circunstâncias.

Neste estudo não foi verificada nenhuma correlação entre as variáveis ambientais analisadas (temperatura ambiente máxima e mínima, umidade ambiente máxima e mínima) e a temperatura final do contêiner, fato que pode estar ligado à pequena variação desses parâmetros ambientais durante o período experimental no local de armazenamento, no caso, um laboratório que estava protegido de grandes influências, como calor intenso e insolação direta.

O número de inseminações/ciclo, de inseminações/ciclo gestante e de inseminações/ciclo vazia não diferiu entre os grupos ( $P>0,05$ ), mas foi ligeiramente inferior aos obtidos por Carvalho et al. (1997), Silva Filho et al. (1998a), Silva Filho et al. (1998b) e Valle et al. (1998). Valle et al. (2000), que, em pesquisa com sêmen refrigerado a 14 °C e concentração de  $400 \times 10^6$  espermatozoides móveis, não verificaram diferença nas taxas de prenhez ao utilizarem 1, 2, 3, 4 ou mais inseminações/ciclo ( $P>0,05$ ). Os autores ressaltaram que a redução do número de inseminações/ciclo é um fator importante na redução dos custos dentro de um programa de inseminação

artificial, principalmente quando há transporte de sêmen entre haras. Brandão et al. (2003) não verificaram aumento da taxa de prenhez quando elevaram o número inseminações/ciclo utilizando sêmen a fresco diluído. Esses autores verificaram que, considerando os dados referentes a duas e três inseminações, a taxa de concepção/ciclo foi de 55,7%, semelhante àquela com quatro ou mais inseminações, de 50,0%. Nunes et al. (2004a) obtiveram 71,42% de gestação ao primeiro ciclo utilizando inseminação artificial única/ciclo, com sêmen refrigerado a 15 °C por 24 horas.

A motilidade espermática progressiva após a diluição foi semelhante entre os grupos, porém observou-se aumento do vigor espermático do sêmen diluído com o meio Kenney ( $P < 0,05$ ), fato que pode estar correlacionado à maior disponibilidade de ATP para a célula espermática advinda principalmente da utilização da glicose contida neste diluidor (4,9 g/100 mL). Essa energia extra pode ser utilizada pelas estruturas locomotoras do espermatozóide, promovendo maior frequência e batimento do flagelo desencadeando maior velocidade (Celeghini, 2005). Além disso, os diluidores à base de gema de ovo podem dificultar a movimentação espermática, uma vez que seus constituintes promovem uma barreira física à célula espermática e dificultam a respiração do espermatozoide (Tosic & Walton, 1946), diminuindo a motilidade (Pace & Graham, 1974).

A avaliação do sêmen resfriado comprovou também superioridade do vigor espermático obtido com o diluidor de Kenney em relação ao diluidor de Foote ( $3,04 \times 2,43$ ) após as 24 horas de armazenamento. O diluidor de Kenney apresentou melhor manutenção da motilidade progressiva, com redução ( $P < 0,05$ ) de apenas 18,13% no grupo 1 (diluidor Kenney) e 25,88% de na motilidade progressiva no grupo 2 (diluidor Foote). Essa melhor manutenção do diluidor de Kenney pode ter sido resultado da melhor proteção da membrana plasmática a danos promovidos durante o resfriamento, que são decorrentes de lesões estruturais diretas, como a ruptura das membranas, ou indiretas, por alterações das funções celulares (Squires et al., 1999). Mudanças na organização do mosaico fluido da membrana plasmática podem levar a alterações na permeabilidade, na funcionalidade e no metabolismo da célula espermática, o que pode prejudicar a motilidade e a capacidade fecundante da mesma (Amann & Graham, 1993). Apesar de o mecanismo de proteção do leite

ao espermatozoide não ser claramente conhecido, acredita-se que o fosfocaseinato e a  $\beta$ -lactoglobulina são os principais constituintes do leite que promovam essa proteção (Battelier et al., 1998; 2001).

Outro fator que pode estar correlacionado à sobrevivência das células espermáticas durante o armazenamento é a quantidade de reservas energéticas contidas no diluidor e no plasma seminal, que, no caso de exaustão dessas reservas, poderia promover morte metabólica dos espermatozoides, uma vez que a motilidade é o processo que requer a maior demanda de energia e tem correlação positiva com as concentrações de ATP (Januskauskas & Rodriguez-Martinez, 1995). Esses resultados corroboram os apresentados por Province et al. (1984), que verificaram inferioridade de diluidores à base de gema de ovo, e confirmam os obtidos por Bruemmer et al. (2002), que observaram redução da motilidade progressiva após a adição de gema de ovo em diluidores a base de leite desnatado. Entretanto, Tekin et al. (1989), Rota et al. (2004; 2008) e Melo et al. (2005) verificaram superioridade dos diluidores à base de gema de ovo em relação àqueles à base de leite quanto à motilidade e viabilidade em diferentes tempos de estocagem.

Em estudos mais recentes, tem-se utilizado a gema de ovo centrifugada ou apenas a LDL extraída da gema de ovo. Rota et al. (2004) verificaram superioridade na motilidade progressiva e velocidade dos espermatozoides equinos resfriados por 24 horas quando adicionada gema de ovo centrifugada (2%) a um diluidor à base de leite em pó desnatado (INRA82Y).

A menor porcentagem de motilidade progressiva do sêmen do garanhão 1 após o resfriamento não foi acompanhada de redução da motilidade (após o resfriamento), assim, essa diferença entre os garanhões pode ser oriunda da motilidade progressiva do sêmen fresco, que, no garanhão 1, foi inferior à do garanhão 2. Desta maneira, como os garanhões 1 e 2 apresentaram número de espermatozoides viáveis totais e queda da motilidade progressiva semelhantes, ambos podem ser credenciados à utilização potencial em programas de inseminação artificial com sêmen resfriado similar, apesar de o sêmen do garanhão 2 ter apresentado motilidade progressiva e vigor espermático superiores após o resfriamento. Segundo Brinsko et al. (2000), o ejaculado dos garanhões pode ser classificado como de alta e baixa qualidade, de acordo com a suscetibilidade do sêmen frente à refrigeração. Segundo essa

classificação, os ganhões com sêmen de baixa qualidade apresentam redução superior a 40% da motilidade progressiva inicial após 24 horas de armazenamento. Neste estudo, a redução da motilidade foi em média de 20,74% e 22,93% para os ganhões 1 e 2 respectivamente, e permite classificá-los como ganhões com sêmen de alta qualidade.

Não foi observada diferença entre a porcentagem média de espermatozoides normais e defeitos menores entre os dois diluidores após o resfriamento, o que indica que ambos os diluidores são similares na proteção contra injúrias e na alteração na morfologia espermática. No entanto, ambos os ocasionaram aumento de patologias espermáticas em comparação ao sêmen fresco e isso reforça o conceito de que o processo de resfriamento promove injúrias celulares irreversíveis e pode comprometer a fertilidade do sêmen (Graham, 1996). Esse aumento na porcentagem de espermatozoides anormais morfológicamente ocorreu pelo aumento de alterações consideradas como defeitos menores, que são considerados de menor importância que os defeitos maiores quando se considera a fertilidade, visto que o aumento de defeitos menores pode ser compensado por aumento do número de espermatozoides na dose inseminante.

A avaliação da morfologia espermática usando microscópio de contraste de fase, aliada à motilidade e ao vigor espermático, permite a obtenção de informações importantes sobre a qualidade seminal. Entretanto, a integridade estrutural da membrana plasmática e de algumas organelas essenciais para fertilização só pode ser mais bem avaliada utilizando-se testes de integridade (supravital e colorações fluorescentes) e funcionalidade de membrana (teste hiposmótico) e avaliações ultraestruturais do DNA e de organelas ou utilizando-se testes de avaliação da fertilidade *in vivo*, que, apesar de mais onerosos e depender da disponibilidades de fêmeas aptas, são ainda os únicos realmente confiáveis na avaliação da real fertilidade do sêmen.

A fertilidade não diferiu entre os dois ganhões ( $P > 0,05$ ), o que permitiu o agrupamento dos dados para análise entre os dois grupos considerando os dois ganhões. Apesar da menor motilidade progressiva e do baixo vigor espermático, o ganhão 1 não apresentou comprometimento da fertilidade em comparação ao ganhão 2, fato que pode estar correlacionado à porcentagem de espermatozoides normais e ao número de espermatozoides viáveis no

momento da inseminação, valores que não diferiram entre os dois ganhões ( $P > 0,05$ ), 56,02% e 69,62% de espermatozoides normais, e  $339,28 \times 10^6$  e  $341,68 \times 10^6$  de espermatozoides viáveis, para os ganhões 1 e 2 respectivamente. O número de espermatozoides viáveis está de acordo com o preconizado pelo CBRA (1998) para sêmen resfriado, o qual é de pelo menos 200 milhões de espermatozoides viáveis no momento da inseminação artificial.

A maior porcentagem de gestação/ciclo verificada com o diluidor de Kenney (55,26% em 38 ciclos) em relação ao diluidor de Foote (30,56% em 36 ciclos) está de acordo com melhores características seminais observadas *in vitro* para o diluidor de Kenney e indica relação da motilidade e do vigor espermático com a fertilidade. Möstl et al. (2001) relataram que a gema de ovo contém progesterona, o que poderia induzir a uma capacitação espermática precoce, ocasionando redução da fertilidade, pois, conforme demonstrado por Cheng et al. (1998), a progesterona poderia ligar-se a receptores na membrana plasmática do espermatozoide equino, uma etapa importante no processo de reação do acrossomo.

O resultado obtido com o diluidor de Foote foi inferior aos obtidos por Carvalho et al. (1997), Silva Filho et al. (1997, 1998a, 1998b), Melo et al. (2005), que também utilizaram outros diluidores à base de gema de ovo. Carvalho et al. (1997), em pesquisa com diluidor de lactose-gema de ovo (Nagase & Niwa, 1964, modificado), obtiveram 62,96% (34/54) de taxa de concepção com sêmen resfriado a 20 °C e transportado durante 54,51 minutos. Silva Filho et al. (1998) utilizaram dois tipos de diluidores (glicina-gema de ovo e lactose-gema de ovo) no resfriamento e transporte do sêmen a 9 °C durante 2,2 horas com dose inseminante de 560 milhões de viáveis e obtiveram 56,36% (31/55) de gestação/ciclo no diluidor de glicina-gema de ovo e 47,17% (25/53) de gestação no diluidor de lactose-gema de ovo. Lima et al. (2000) utilizaram o mesmo diluidor de Nagase & Niwa (1964) modificado para o resfriamento do sêmen equino durante 64 horas a 20 °C e observaram taxas de gestação também superiores (54,25% de gestação/ciclo) às encontradas neste estudo. Outros pesquisadores têm preferido a gema de ovo como um dos constituintes do diluidor: Baken I (Nishikawa, 1959), glicose-gema de ovo (Wierzbowski et al., 1967) ou glicina-gema de ovo (Berghuis, 1987; De Vries, 1987). Além da inferioridade desse novo diluidor em comparação ao diluidor controle (Kenney)



utilizado neste estudo, outros estudos também demonstraram fertilidade superior à observada no diluidor de Foote quando se utiliza sêmen resfriado equino a 5 °C armazenado por 24 horas (Douglas-Hamilton et al., 1984; Heiskanen et al., 1987; Zidane et al., 1991; Jasko et al., 1992b; Battelier et al., 1998; Nunes, 2006).

A discrepância desses resultados em comparação aos deste estudo pode ser oriunda do tipo de diluidor utilizado, o qual foi desenvolvido originalmente para o sêmen suíno (Foote, 2002). Dessa forma, adaptações ou modificações dos seus constituintes ou da quantidade dos constituintes pode ser uma alternativa futura para que esse diluidor seminal possa suprir e proteger adequadamente a célula espermática equina, a qual possui morfologia, composição e metabolismo diferente a célula suína. A adição de maior quantidade de um constituinte energético como a glicose poderia ser uma opção para disponibilizar mais energia na forma de ATP e, assim, evitar a morte metabólica do espermatozoide, visto que essa é uma célula altamente catabólica após a ejaculação. Além disso, a glicose é um soluto que poderia ajustar melhor a osmolaridade desse diluidor e foi encontrada em valores inferiores aos recomendados para diluidores seminais para resfriamento de sêmen (180,4 mOsm/L).

Em comparação aos resultados de outros estudos com utilização de diluidores à base de leite e açúcares, a fertilidade obtida nesta pesquisa com o diluidor controle (Kenney) foi semelhante à obtida por Douglas Hamilton et al. (1984) e Jasko et al. (1992b) ao utilizarem sêmen equino resfriado a 5 °C por 24 horas de armazenamento; Battelier et al. (1998), que resfriaram o sêmen com o meio INRA 96 por 24 horas a temperatura de 15 °C e obtiveram 57% de gestação/ciclo (178 ciclos); e Valle et al. (1999), que utilizaram sêmen resfriado a 14 °C por 3,6 horas. O resultado deste estudo foi superior ao registrado por Battelier et al. (1998), que utilizaram o INRA 82 e Kenney para o resfriamento do sêmen com 200 milhões de espermatozoides viáveis a 4 °C por 24 horas, obtendo 40% de gestação/ciclo (173 ciclos), e também superior ao obtido por Zidane et al. (1991), que resfriaram 20 mL de sêmen diluído com diluidor de Kenney contendo 500 milhões de viáveis por 48 horas a temperatura de 5 °C e 20 °C e obtiveram, respectivamente, 40,5% e 14,3% de recuperação embrionária. Entretanto, foi inferior aos obtidos por Heiskanen et al. (1987), que

obtiveram 82% de taxa de gestação ao primeiro ciclo com sêmen diluído no meio Kenney e resfriado a 5-7 °C por 24 horas inseminando apenas 11 animais. Nunes et al. (2004) obtiveram 71,42% de taxa de gestação ao primeiro ciclo (n=35) utilizando 300 milhões de viáveis no sêmen resfriado com Kenney por 24 horas a temperatura de 15-20 °C, porém com indução da ovulação com gonadotrofina coriônica humana (hCG). Nunes (2006), testando um novo contêiner (CP1 e CP2), verificou 69,23% (n=13) e 69,23% (n=26) de gestação ao primeiro ciclo em sêmen resfriado com o meio Kenney por 24 e 48 horas, respectivamente, também induzindo a ovulação.

Neste estudo, o diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal a partir do 10<sup>o</sup> dia para facilitar o manejo dos animais. A detecção da gestação só foi 100% no 13<sup>o</sup> dia, porém no 11<sup>o</sup> dia foi detectada gestação em 80% das éguas. O diâmetro médio da vesícula embrionária no 10<sup>o</sup> dia foi de 4,8 mm, o que condiz com outros relatos na literatura (Ginther, 1984; 1998). Dessa forma, o diagnóstico de gestação precoce por ultrassonografia (a partir do 10<sup>o</sup> dia) pode ser uma prática alternativa para facilitar o manejo em determinadas propriedades, onde é necessário detectar mais precocemente a prenhez para que as éguas sejam destinadas a locais distantes do centro de inseminação do haras ou até para outras propriedades.

#### **3.2.4. CONCLUSÕES**

O diluidor Foote desenvolvido para o sêmen suíno não possui alta eficácia na manutenção da viabilidade (motilidade progressiva e vigor espermático) e fertilidade do sêmen equino resfriado nas condições experimentais avaliadas. Esse diluidor é inferior ao diluidor Kenney, tanto na manutenção da viabilidade *in vitro* como na fertilidade *in vivo* do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

#### **4. CONCLUSÃO GERAL**

O diluidor seminal à base de glicina-gema de ovo proposto por Foote (2002) não é eficaz em preservar as características seminais (motilidade e vigor espermático) e não possibilita obter índice de fertilidade aceitável utilizando-se sêmen equino resfriado a 5 °C por 24 horas. O diluidor Kenney ainda se constitui uma ótima opção para ser utilizado em programas de inseminação artificial com sêmen resfriado de garanhões da raça Mangalarga Machador.

Os testes de avaliação da integridade e funcionalidade da membrana plasmática da célula espermática constituem avaliações complementares na predição do potencial fecundante do garanhão, porém ainda não são conclusivos. A avaliação por meio da inseminação de um grande número de fêmeas ainda é o método mais confiável de avaliação do potencial fecundante do sêmen.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, p.581-588, 2004.
- AITKEN, R. J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioessays**, v.16, p.259-67, 1994.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Estrutura da membrana. In: **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. 1999. 1.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, cap.11, p.354-378, 1999.
- ALVARENGA, M. A. et al. The use of alternative cryoprotectores for freezing stallion semn. In: Workshop on transporting gametes and embryos, Havemeyer Foundation, **Proceedings...** p.74-76, 2003.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Androloly**, v.13, p.232-241. 1992.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKinnon, A. O. & Voss, J. L. **Equine Reproduction**, 1. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, cap.80, p.715-745, 1993.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v.14, n.6, p.397-406, 1993.
- AMANN, R. P. Weaknesses in reports of “fertility” for horses and other species. **Theriogenology**, v.63, p.698715, 2005.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after

cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895-907, 2004.

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. Tese (livre docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 121p. 2000.

AURICH, J. E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.185-192, 1997.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.

AVANZI, B. R.; PAPA, F. O.; FARRÁS, M. C.; MELO, C. M.; ALVARENGA, M. A.; DELL'AQUA JR., J. A.; MEDEIROS, A. S. L.; ARAÚJO, G. H. M. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.152-154, 2006.

BABIAK, I.; GLOGOWSKI, J.; LUCZYNSKI, M. J.; LUCZYNSKI, M.; DEMIANOWICZ, W. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. **Theriogenology**, v.52, p.473-479, 1999.

BACK, D. G.; PICKETT, B. W.; VOSS, J. L.; SEIDEL, G. E. Effect of antibacterial agents on the motility of stallion spermatozoa at various storage times, temperatures and dilution ratios. **Journal Animal Science**, v.41, p.137-143. 1975.

BATELLIER, F.; DUCHAMP, G.; VIDAMENT, M.; ARNAUD, G.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15°C under aerobic conditions. **Theriogenology**, v.50, p.229-236, 1998.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.

BERGERON, A.; CRETE, M. H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins from bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.70, p.708-717, 2004.

- BERGERON, A., MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.
- BERGHUIS, G. A. Verzend sperma versus vers sperma: in relatie tot bevruchtingsresultaten. **Tijds. Dierg.**, v.112, n.24, p.1410-1412, 1987.
- BIELANSKI, W. Characteristics of the semen of stallions. Macro and microscopic investigations with estimation of fertility. **Mem. Acad. Pol. Sci.**, v.16, p.1-58, 1951.
- BOGART, R.; MAYER, D.T. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. **Journal Animal Science**, v.9, p.143-152, 1950.
- BOSSEAU, S.; BRILLARD, J. P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, C. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro, and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, p.699-706, 1998.
- BRANDÃO, F. Z.; SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; SATURNINO, H. M.; VIANA, W. S., DANTAS, M. S.; OLIVEIRA, H. N. Efeito da concentração espermática e do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, p.61-67, 2003.
- BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D. Artificial isemination. In: McKinnon, A. O.; Voss, J. L. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 790-797, 1992.
- BRINSKO, S. P.; ROWAN, K. R.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1641-1655, 2000.
- BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S. et al. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.
- BRUEMMER, J. E.; COY, R. C.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. **Journal Animal Science**, v.80, p.12-18, 2002.
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.**

2005. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.
- CARMO, M.T.; ALMEIDA, M.T. 2006. **Bioteχνologias da Reprodução aplicadas na criação de eqüinos**. Disponível em: [http://www.abqm.com.br/SecaoTecnica/bioteχνologias\\_reproducao.html](http://www.abqm.com.br/SecaoTecnica/bioteχνologias_reproducao.html). Acessado dia 17/01/2009.
- CARVALHO, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; FONSECA, F.A. Fertilidade do sêmen eqüino diluído, resfriado a 20 °C e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.3, p.473-478, 1997.
- CASAGRANDE, J. F.; PINHEIRO, L. E. L.; ALMEIDA, C. A. A influência da motilidade e da velocidade sobre a fertilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, p.31-35, 1979.
- CHENG, F. P.; FAZELI, A. R.; HAGE, W. J.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. **Biology of Reproduction**, v.59, p.733-742, 1998.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 Ed. Belo horizonte: p.25-27, 1998.
- COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.305-311, 2003.
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL - CAN/MAPA. Estudo do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil. Centro de estudos em economia aplicada da ESALQ. **Coletânea de estudos**, v.40, p.68, 2006.
- CORREA, J. R.; HEERSCHER JR.; ZAVOS, P. M. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. **Theriogenology**, v.47, p.715-721, 1997.
- CORREA, J. R.; ZAVOS, P. M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v.42, p.351-360, 1994.
- DAELS, P. F.; HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H. Reproduction in horses. In: Cupps, P. T. **Reproduction in domestic animals**. 4.ed. San Diego : Academic, p.413-444, 1991.

- DARENIUS, A. Experiences with chilled, transported equine semen. In: Stallion Reproduction Symposium, 1998, Society for Theriogenology – American Association of Equine Practitioners. **Proceedings...** p.60-70, 1998.
- DAVIS, R. O.; GRAVANCE, C. G.; CASEY, P. J. Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.1808-1811, 1993.
- De VRIES, P. J. Evaluation of the use of fresh, extender, transported stallion semen in Netherlands. **Journal Reproduction and Fertility**, (Suppl.), n.35, p.641, 1987.
- DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermoresistance dans l'appréciation de la valeur fecondant du sperma congelé. **An. Med. Vet.**, v.4, p.215-224, 1967.
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, n.3, p.291-304, 1984.
- DOWSETT, K. F.; OSBORNE, H. G. PATTIE, W. A. Morphological characteristics of stallion's spermatozoa. **Theriogenology**, v.22, n.5, p.463-472, 1984.
- DOWSETT, K. F.; KNOTT, L. M. The influence of age and breed on stallion semen. **Theriogenology**, v.46 p.397-412, 1996.
- DREVIUS, L. O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Exp. Cell Res.**, v.42, p.136-156, 1966.
- EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: Knobil, E., & J. D. Neill (eds), **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York. p. 29–77, 1994.
- EINARSSON, S.; DALIN, A-M.; LUNDEHEIM, N. Sperm production and sperm morphology of Swedish Warmblood Stallions. **Reproduction in Domestic Animal**, v.10, p.1439-1539, 2007.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Sydney: Butterworth, 194 p., 1987.
- FARRÁS, M. C.; AVANZI, B. R.; MELO, C. M.; DELL'AQUA, J. A.; PAPA, F. O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.693-699, 2008.
- FERNANDES, C. E.; PIMENTEL, C. A. Seminal characteristics and fertility in stallions. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.829-834, 2002.



- FERREIRA, M.F.L. **Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e fertilidade do sêmen de jumento.** 1993. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte- MG, 1993.
- FLIPSE, R. J.; PATTON, S.; ALQUIMST, J. O. Diluters for bovine semen. III. Effect of lactenin and of lactoperoxidase upon spermatozoa viability. **Journal Dairy Science**, v.37, p.1205-1211, 1954.
- FOOTE, R.H. Within-herd use of boar sêmen at 5 °C, with a note on eletronic monitoring of oestrus. **Reproduction Domestic Animal**, v.37, p.62-63, 2002.
- FÜRST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino.** 2006. Viçosa: Tese (doutorado), 114 p, 2006.
- GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249-265, 2001.
- GAMBOA, S.; MACHADO-FARIA, M.; RAMALHO-SANTOS, J. Seminal traits, suitability for semen preservation and fertility in the native Portuguese horse breeds Puro Sangue Lusitano and Sorraia: Implications for stallion classification and assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, 2008. (In Press)
- GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v.53, p.276-284, 1995.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445-457, 2005.
- GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the reproductive tract of the mare: the single embryo. **Journal Equine Veterinary Science**, v.4, p.75-81, 1984.
- GOULART, H. M.; SILVA, A. E. D. F.; McMANUS, C.; PAPA, F. O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade in vitro dos espermatozoides de eqüinos, após o resfriamento a 5 C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p.112-122, 2004.
- GRAHAM, J. K.; KUNZE, E. R.; HAMMERSTEDT, H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p.55-64, 1990.

- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, p.131-147, 1996.
- GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.239-247, 2001.
- GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v.24, p.42-52, 1987.
- GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed sêmen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.
- GRAVANCE, C. G.; LIU, L. K. M.; DAVIS, R. O.; HUGHES, J. P.; CASEY, P. J. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.41-46, 1996.
- GRIGGERS, S., PACCAMONTI, D. L.; THOMPSON, R. A.; EILTS, B. E. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v.56, p.613-622, 2001.
- HAAG, F. M. Evaluation of "dismount" semen in thoroughbred horse breeding. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.1, p.312-314, 1959.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.
- HEISNAKEN, M.L.; PIRHONEN, A.; KOSKINEN, E.; MAENPAA, P.H. Motility and ATP content of extended equine spermatozoa in different Storage conditions. **Journal of Reproduction and Fertility**, (Suppl.) v.35, p.103-10, 1987.
- HEISKANEN, M.L.; HUHTINEN, M.; PIRHONEN, A.; MAENPAA, P.H. Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. **Acta. Veterinaria Scandinavica**, v.35, n.3, p.257-262, 1994a.
- HEISKANEN, M. L.; HUHTINEN, M.; PIRHONEN, A.; MÄENPÄÄ, P. H. Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for 70 or 80 hours. **Theriogenology**, v.42, n.6, p.1043-1051, 1994b.
- HOPKINS, F. M.; MEADOWS, D. G. Cooled Shipped Horse Semen. In **Equifacts**. The University of Tennessee. Disponível em: <http://www.utextension.utk.edu/>. 2003. Acessado em: 6/1/2009.

- HOUSEHOLDER, D. D.; PICKETT, B. W.; VOSS, J. L. et al. Effect of extender, number of spermatozoa and HCG on equine fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, n.1, p.9-13, 1981.
- HOYUMPA, A. H.; MCLINTOSH, A. L.; VARNER, D. D.; SCANLAN, C. M. Normal bacterial flora of equine semen: Antibacterial effects of amikacin, penicillin, and an amikacina penicillin combination in a seminat extender. In: 12th Internat Congr Animal Reprod. **Proceedings...** v.3, p.1427-1429, 1992.
- HUGHES, J. P. Curso de Eqüinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, n. 9, 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte : CBRA, 1991.
- IJAZ, A.; DUCHARME, D. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C. **Theriogenology**, v.44, p.1039-1050, 1995.
- JANETT, F.; THUN, R.; NIEDERER, K.; BURGER, D.; HASSIG, M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. **Theriogenology**, v.60, p.453-461, 2003a.
- JANETT, F.; THUN, R.; BETTSCHEN, S.; BURGER, D.; HASSIG, M. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches–Montagnes stallions. **Animal Reproduction Science**, v.77, p.213-221, 2003b.
- JANUSKAUSKAS, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and moyility in frozen/thawed Bull sêmen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.36, p.571-574, 1995.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality trough fluorometry and sperm chromatin strcture assay in relation of field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenology**, v.55, p.947-981, 2001.
- JASKO, D. J.; LEIN, D. H.; FOOT, R. H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility en stallions: 66 cases (1987-1988). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.197, n.3, p.389-394, 1990.
- JASKO D.J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35, p.1059-1067, 1991.
- JASKO, D. J.; HATHAWAY, J. A.; SCHALTENBRAND, V. L.; SIMPER, W. D.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, n.6, p.1241-1252, 1992a.

- JASKO, D. J.; MARTIN, J. M.; SQUIRES, E. L. Effect of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. **Theriogenology**, v.37, n.6, p.1233-1239, 1992b.
- JASKO, D. J.; SQUIRES, E.L.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E. Comparison of pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen semen. In: International Congress Animal Reproduction, 12, 1992, **Proceedings...**1439-1441, 1992c.
- JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.8, n.1, p.129-148, 1992.
- JEULIN, C; SERRES, C; JOUANNET, P. The effects of centrifugation, various synthetic media and temperature on the motility and vitality of human spermatozoa. **Reproduction Nutrition Development**, v.22, p.81-91,1982.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN der VEN, H. H.; PEREZ-PELADEZ, M. et al. Development of na assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its ralationship to other characteristcs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.
- JOHANSSON, C. S.; MATSSON, F. C.; LEHN-JENSEN, H.; NIELSEN, J. M.; PETERSEN, M. M. Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin–nigrosin stain. **Animal Reproduction Science**, (Abstracts), 2008. (In press)
- JOHNSON, P. E.; FLIPSE, R. J.; ALMQUIST, J. O. Diluters for bovine semen. VI. The effect of cysteine hydrochloride on the liveability of bull spermatozoa in unheated skim milk. **Journal Dairy Science**, v.38, p.53-57, 1955.
- JUHASZ, J.; NAGY, P.; KULCSAR, M.; HUSZENICZA, Z. Y. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a review. **Acta Veterinaria Brunensis**, v.69, p.247-259, 2000.
- KARESKOSKI, A. M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Motility and Plasma Membrane Integrity of Spermatozoa in Fractionated Stallion Ejaculates after Storage. **Reproduction in Domestic Animal**, v.41, p.33–38, 2006.
- KATILA, T.; COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.1085-1092, 1997.
- KAVAK, A.; LUNDEHEIM, N.; AIDNIK, M.; EINARSSON, S. Sperm morphology in Estonian and Tori breed stallions. **Acta Veterinaria Scandinavica.**, v.45, p.11-18. 2004.

- KAYSER, J. P. R. **Effects of linear cooling rates on motion characteristics of stallion spermatozoa.** 1991. Dissertation. MS Thesis. Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, 1991.
- KENNEY, R. M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques and preliminary findings. In: American Association equine Practitioners, 1975, **Proceedings...** v.21, p.327-336, 1975.
- KING, S. S.; SPEISER, S. A.; JONES, K. L.; APGAR, G. A.; WESSELS, S. E. Equine spermatozoal motility and fertility associated with the incorporation of D-(+)-mannose into semen extender. **Theriogenology**, v.65, p.1171-1179, 2006.
- KLEMETSDAL, G.; JOHNSON, M. Effect of inbreeding in Norwegian trotters. **Livestock Production Science**, v.21, p.263-272. 1989.
- KODAMA, H.; KURBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **J. Androl.**, v.17, p.151-157, 1996.
- KUISMA, P.; ANDERSSON, M.; KOSKINEN, E.; KATILA, T. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.48, n.14, 2006.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v.39, p.1279-1289, 1993.
- LAGARES, M. A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Assessing equine sperm-membrane integrity. **Andrologia**, v.32, n.3, p.163-167, 2002.
- LI, Y.H.; CAI, K.J.; SU, L.; GUAN, M.; HE, X.C.; WANG, H.; KOVACS, A.; JI, W.Z. Cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa in a chemically defined extender. **Asian Journal of Andrology**, v.7, p.139-144. 2005.
- LIMA, M.C.C.; SILVA Filho, J. M.; CARVALHO, G. R.; PALHARES, M. S.; VALLE, G. R.; OLIVEIRA, H. N. Efeito do número de inseminações artificiais por ciclo sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen equino diluído, resfriado a 20°C e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, 2000.
- LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L.; BLANCHARD, T. L.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. **Theriogenology**, v.60, p.1127-1138, 2003.
- MALMGREN, L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. **Theriogenology**, v.50, p.833-839, 1998.

- MANJUNATH P, NAUC V, BERGERON A, MENARD M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67: p.1250-1258, 2002.
- MATTOS, R.C. **Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen eqüino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana**. 1994. 114 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, 1994.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v.247, p.C125–C142, 1984.
- MEIRELLES, L. S.; MALSCHITSKY, E.; NEVES, A. P.; VIEIRA, M. J.; KELLER, A.; HOTT, A. K.; MORAES, I. M. A.; GARBADE, P.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Leite em pó desnatado não inativado e leite desnatado UHT para preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.467-470 1998.
- MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.
- MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.757-763, 2005.
- MELO, C. M.; ALVARENGA, M. A.; ZAHN, F. S.; MARTIN, I.; ORLANDI, C.; TRINQUE, C. L. A.; DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F.O. Effect of the transport container and cryoprotectant on freezability of equine semen previously cooled for 24h. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.78-81, 2006.
- METCALF, E. S. Pregnancy rates with cooled equine semen received in private practice. In: American Associations Equine Practitioners, 44, 1998, Baltimore. **Proceedings...**Baltimore, p.16-18, 1998.
- MOUSSA, M.; MARINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.
- MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601-614, 1992.

- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, p.2372-2381, 2005.
- MORRELL, J. M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A-M, HAMMAR, L.; SANDEBERT, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.50, n.2, 2008.
- MÖSTL, E.; SPENDIER, H.; KOTRSCHAL, H. Concentration of immunoreactive progesterone and androgens in the yolk of hen's eggs (*Gallus domesticus*). **Wien. Tierärztl. Mschr.**, v.88, p.62-65, 2001.
- NAGASE, H.; NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. In: International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, 5. **Proceedings...** Trento, v.4, p.410-415, 1964.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2007. Nutrient requirement of horses. 6 Ed. 2007.
- NEILD, D. M.; CHAVES, M. G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.
- NEILD, D. M.; CHAVES, M. G.; FLORES, M.; MIRAGAYA, M. H.; GONZALEZ, E.; AGUERO, A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia**, v.32, p.351-355, 2000.
- NEVES, A. P.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; TREIN, C. R.; MALSCHITZKY, E.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. Reproductive parameters and sperm freezability of stallions of the Brazilian pony breed. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.67-69, 2006.
- NISHIKAWA, Y. **Studies on reproduction in horses. Singularity and artificial control in reproductive phenomena.** Tokyo, Japan : Koei Kvoto, 340p, 1959.
- NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; FERREIRA, C. S.; De PAULA, F. A. L.; COSTA e SILVA, E.V. Fertilidade do sêmen eqüino refrigerado em programa comercial utilizando inseminação artificial única por ciclo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, CD-ROM, MR035. 3p. 2004a.
- NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; FERREIRA, C. S.; De PAULA, F. A. L.; COSTA e SILVA, E. V. Fertilidade de éguas inseminadas no ápice do corno uterino utilizando baixa concentração espermática. In: REUNIÃO ANUAL

DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande.  
**Anais...** Campo Grande, CD-ROM, MR036. 3p, 2004b.

NUNES, D.B. **Container (CP) para refrigeração e preservação do sêmen equino**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS, 68p, 2006.

NUNES, D. B.; ZORZATTO, J. R.; COSTA e SILVA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Animal Reproduction Science**, v.104 , p.434-439, 2008.

PACCAMONTI, D. L.; BUITEN, A. V.; PARLEVLIET, J. M.; COLENBRANDER, B. Reproductive parameters of miniatures stallions. **Theriogenology**, v.51, p.1343-1349, 1999.

PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal Animal Science**, v.39, p.1144-1149, 1974.

PAGL, R.; AURICH, J. E.; MULLER-SCHLOSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparision of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. **Theriogenology**, v.66, p.1115-1122, 2006.

PALM, F.; WALTER, I.; BUDIK, S.; AURICH, C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on the inflammatory response of the endometrium in oestrous mares. *Animal reproduction science*, v. 94, p. 286-289, 2006.

PAPA, F. O.; MELO, C. M.; DELL'AQUA, J. A.; MACEDO, L. P.; CARVALHO, A. G.; ALVARENGA, M. A.; MEDEIROS, A. S. L. Inovações metodológicas na biotecnologia de refrigeração e congelação de sêmen equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, (Suppl.) v.33, p.19-27, 2005.

PARLEVLIET, J. M.; KEMP, B.; COLENBRANDER, B. Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.183-187. 1994.

PHILLIPS, P.H.; LARDY, H. A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal Dairy Science**, v.23, p.399-404, 1940.

PICKETT, B. W.; FAULKNER, L. C.; SUTHERLAND, T. M. Effect of Month and Stallion on Seminal Characteristics and sexual behavior. **Journal Animal Science**, v.31, p.713-728, 1970.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar - California, v.7, n.5, p.289-302, 1987.



- PICKETT, B. W., SHINER, K. A. Recent developments in artificial insemination in horses. **Livestock Production Science**, v.40, n.1, p.31-36, 1994.
- PICKETT, B. W.; VOSS, J. L.; JONES, R. L. Control of bacteria in stallions and their semen. **Journal of equine Veterinary Science**, v.19, n.7, 1999.
- PIMENTEL, C. A. Aspectos da patologia espermática e a fertilidade no garanhão. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1989, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, v.8, p.127-132. 1989.
- POMMER, A. C.; RUTLANT, J.; MEYERS, S. A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoa function. **Theriogenology**, v.58, p.1373-1384, 2002.
- PROVINCE, C. A.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**, v.22, p.409-415, 1984.
- QUINN, P. J.; CHOW, P. Y.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.60, p.403-407, 1980.
- ROTA, A.; FURZI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animal**, v.39, n.2, p.103-9, 2004.
- ROTA, A.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILO, F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiatina donkey spermatozoa. **Theriogenology**, v.69, p.176-185, 2008.
- ROUSSET, H.; CHANTELOUBE, P. H.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. J. Assessment of fertility and semen evaluations of stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, (Suppl.) v.35, p.25-31. 1987.
- SAACKE, R. G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and un-compensable traits in semen. **Theriogenology**, v.70, p.473-478, 2008.
- SAEG: Sistema para análises estatísticas, versão 7.1. Viçosa, 1997.
- SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; BERGMANN, J.A.G. Inseminação artificial em eqüinos incluindo transporte de sêmen. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, n. 7, 1987, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA. p.78, 1987.
- SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M.S., FONSECA, F.A. Transporte e inseminação artificial com sêmen de eqüino. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, n.11, p.3-112, 1994.

- SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, F. A.; PALHARES, M. S.; OLIVEIRA, H. N. Fertilidade do sêmen equino diluído, resfriado e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.6, p.1134-1141, 1997.
- SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, F. A.; PALHARES, M. S.; WANDERLEY, A. T.; OLIVEIRA, H. N. Avaliação de uma técnica de diluição e transporte de sêmen equino, para as condições brasileiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.1, p.66-74, 1998a.
- SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, F. A.; PALHARES, M. S.; VALLE FILHO, V. R.; OLIVEIRA, H. N.; RESENDE, H. H. C. Efeito de diferentes diluidores na fertilidade de éguas de diferentes Haras inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado em contêiner especial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.1, p.75-86, 1998b.
- SQUIRES, E. L.; BARNES, C. K.; ROWLEY, H. S. Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. In: Annual Convention of American Association of Equine Practitioners. **Proceedings...** Boston: American Association of Equine Practitioners, p.25-30, 1989.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCue, P. M.; BRUEMMER, J. E. Cooled and Frozen Stallion Semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**. Fort Collins, Bulletin, n.9, p.01-38, 1999.
- STRYER, L. Introdução ao estudo das membranas biológicas. 1992. In: **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12, p. 230-256, 1992.
- SU, L.; LI, X.; QUAN, J.; YANG, S.; LI, Y.; HE, X.; TANG, X. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. **Animal Reproduction Science**, v.104 p.212-219, 2008.
- SWEDISH Horse Board, Hästavel 1989–2005. Strömsholm. 2005.
- TEKIN, N.; WÖCKENER, A.; KLUG, E. Konservierungsfähigkeit von pferdesamen bei einatz zweier verdünner und Konservierungstemperaturen. **Dtsch. Tierarztl. Wschr.**, v.96, n.5, p.258-265, 1989.
- THORÉN HELLSTEN, E.; NÄSHOLM, A.; JORJANI, H.; STRANDBERG, E.; PHILIPSSON, J. Influence of foreign stallions on the Swedish Warmblood breed and its genetic evaluation. **Livestock Science**, 2008. (In press)
- TOSIC, J. A.; WALTON. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration. **Nature**, v.158, p.485–485, 1946.

- TURNER, R. M. Current techniques for evaluation of stallion fertility. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.4, p.257-268, 2005.
- VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M.; HENRY, M. R. J. M.; PALHARES, M. S.; OLIVEIRA, H. N. Efeitos da rufiação e da manipulação do sistema genital sobre a fertilidade de éguas inseminadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.5, p.547-556, 1998.
- VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; MELO, M. A., MAGNAGO, L. G. P. Utilização de um container modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.505-514, 1999.
- VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; SAMPAIO, I. B. M.; OLIVEIRA, H. N.; SANTOS, J. E. V. Efeito do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado a 14°C e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1721-1726, 2000.
- Van der HOLST. De huidige em de toekomstige ontwikkeling van de k.i. bij paarden in nederland. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v.53, p.302-307, 1984.
- VARNER, D. D. Collection and Preservation of Stallion Spermatozoa. In: Annual Meeting of the Society for Theriogenology. **Proceedings...** p.13-33, 1986.
- VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.28, p.709-723, 1987.
- VARNER, D. D. T. L.; BLANCHARD, C. L.; LOVE, M. C.; GARCIA, R. M.; KENNEY. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.29, p.1043-1054, 1988.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, P.J.; MEYERS, S.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. **Theriogenology**, v.32, n.4, p.515-525, 1989.
- VARNER, D. D.; MICINTOSH, A. L.; FORREST, D. W.; BLANCHARD, T. L.; JOHNSON, L: Potassium penicillin G, amikacin sulfate, or a combination in seminal extender for stallions: Effects on spermatozoal motility. In:12th Internat Congr Anim Reprod. **Proceedings...** v.3, p.1496-1498, 1992.
- VARNER, D. D.; SCANLAN, C. M.; THOMPSON, J. A.; BMMBAUGH, G. W.; BLANCHARD, T. L.; CARLTON, C. M.; JOHNSON, L. Bacteriology of

- preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology**, v.50, p.559-573, 1998.
- VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p.913-922, 1997.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v.48, p.907-917, 1997.
- VOSS, J. L. Breeding Efficiency. In: McKinnow, A. O., Voss, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia : Lea & Febiger. 1114p., 1993.
- WALTERS, A. H.; EYESTONE, W. E.; SAACKE, R. G.; PEARSON, R. E.; GWASZDAUSKAS, F. C. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. **Theriogenology**, v.63, p.1925-1937, 2005.
- WATSON, P. F. The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.42, p.105-111, 1975.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.
- WIERZBOWSKI, S.; KUPFERSHIMIED, H.; LEVENBERGER, H. Artificial insemination experiments on the horse. **Schweizer Arch. Tierheilk.**, v.109, p.517-524, 1967.
- ZIDANE, N.; VAILLANCOURT, P.; GUAY, P.; POITRAS, P.; BIGRAS-POULIN, M. Fertility of fresh equine semen preserved for up to 48 hours. **Journal of Reproduction and Fertility**, (suppl.44), p.644, 1991.
- ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998. 121f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu - SP, 1998.

## **6. ANEXOS**

## ANEXO A – Preparo das soluções

Tabela 1 - Preparo da solução de sacarose a 100 mOsm/L

Constituinte	Quantidade
Sacarose	10,7 g
Água destilada	300 mL

Fonte: Melo (1999).

Tabela 2 - Solução estoque e de trabalho empregadas na técnica de epifluorescência para avaliação da integridade de membrana plasmática

Solução	Constituinte	Quantidade
I- Solução estoque de CFDA	CFDA DMSO	9,2 mg 20 mL
II- Solução estoque de PI	PI NaCl 0,9%	10 mL 20 mL
III- Solução estoque de formaldeído	Formalina a 40% Solução fisiológica	Diluição 1:80
IV- Solução estoque de citrato de sódio a 3%	Citrato de sódio Solução fisiológica	3 g 100 mL
V- Solução trabalho	Solução I Solução II Solução III Solução IV	20 µL 10 µL 10 µL 960 µL
Amostras para avaliação	Sêmen Solução de trabalho	10 µL 40 µL

Fonte: Zúccari (1998).

## ANEXO B – Análises estatísticas

### a. Experimento 1

#### 1. Análise do sêmen fresco

##### Concentração

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	2	9014.033	4507.017	1.300	0.30825
Resíduo	12	41596.70	3466.392		

Coeficiente de variação = 42, 705

##### Volume

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	2	9198.961	4599.481	45.346	0.00000
Resíduo	12	1217.168	101.4307		

Coeficiente de variação = 20, 726

##### NEWMAN KEULS

Variável = VOLUME (101.4307)

GAR	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
1	5		75.6000	A
3	5		54.4000	B
2	5		15.7800	C

##### Espermatozoides totais

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	2	91.28161	45.64081	6.649	0.01139
Resíduo	12	82.37048	6.864207		

Coeficiente de variação = 45, 526

##### NEWMAN KEULS

Variável = SPTZTOT (6.864207)

GAR	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
3	5		7.9800	A
1	5		7.5380	A
2	5		2.5400	B

### Espermatozoides viáveis

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	2	40.31430	20.15715	5.830	0.01702
Resíduo	12	41.48984	3.457487		

Coefficiente de variação = 48, 226

### NEWMAN KEULS

Variável = Viáveis (3.457487)

GAR	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
1	5		5.4096	A
3	5		4.5688	A
2	5		1.5886	B

### Motilidade

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Garanhão	2	743.3333	371.6667	9.911	0.00288
Resíduo	12	450.0000	37.50000		

Coefficiente de variação = 9, 772

### NEWMAN KEULS

Variável = Motilidade (37.50000)

GAR	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
1	5		72.0000	A
2	5		61.0000	B
3	5		55.0000	B

### Vigor

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	2	0.1000000	0.5000000	0.750	*****
Resíduo	12	0.8000000	0.6666667		

Coefficiente de variação = 8, 069

## 2. Análise do sêmen diluído

### Motilidade

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	40.83333	40.83333	0.841	*****
Garanhão	2	1731.667	865.8333	17.843	0.00001
Resíduo	26	1261.667	48.52564		

Coefficiente de variação = 11, 389



### **Vigor**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	0.8333333	0.8333333	7.182	0.01261
Garanhão	2	0.5166667	0.2583333	2.227	0.12807
Resíduo	26	3.016667	0.1160256		

Coeficiente de variação = 10,427

### **Morfologia - Normais**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	125.4447	62.72233	0.876	*****
Garanhão	2	4.485333	4.485333	0.063	*****
Gar × Trat	2	31.39267	15.69633	0.219	*****
Resíduo	24	1717.952	71.58133		

Coeficiente de variação = 11,808

### **Morfologia – Defeitos maiores**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	67.31667	33.65833	3.324	0.05316
Garanhão	2	21.67500	21.67500	2.141	0.15641
Gar × Trat	2	15.05000	7.525000	0.743	*****
Resíduo	24	243.0000	10.12500		

Coeficiente de variação = 40,193

### **Morfologia – Defeitos menores**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	1	100.7547	50.37733	0.588	*****
Garanhão	2	38.30700	38.30700	0.447	*****
Gar × Trat	2	5.096000	2.548000	0.030	*****
Resíduo	24	2055.392	85.64133		

Coeficiente de variação = 43,866

### **HOST**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	1017.336	1017.336	4.878	0.03700
Garanhão	2	752.5947	376.2973	1.804	0.18621
Gar × Trat	2	181.7707	90.88533	0.436	*****
Resíduo	24	5005.272	208.5530		

Coeficiente de variação = 27,072

### Supravital

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	946.4083	946.4083	16.370	0.00047
Garanhão	2	45.97400	22.98700	0.398	*****
Gar × Trat	2	5.868667	2.934333	0.051	*****
Resíduo	24	1387.516	57.81317		

Coeficiente de variação = 11, 313

### Motilidade TTR 0

Fontes de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	40.83333	40.83333	0.382	*****
Resíduo	28	2993.333	106.9048		

Coeficiente de variação = 16, 904

### Motilidade TTR 30

Fontes de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	0.8333333	0.8333333	0.007	*****
Resíduo	28	3116.667	111.3095		

Coeficiente de variação = 17, 732

### Motilidade TTR 60

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	7.500000	7.500000	0.091	*****
Resíduo	28	2310.000	82.50000		

Coeficiente de variação = 16, 366

### Motilidade TTR 90

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	83.33333	83.33333	0.829	*****
Resíduo	28	2813.333	100.4762		

Coeficiente de variação = 19, 915

### Vigor TTR 0

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	0.8333333	0.8333333	6.604	0.01579
Resíduo	28	3.533333	0.1261905		

Coeficiente de variação = 10, 874

**Vigor TTR 30**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	0.1333333	0.1333333	1.672	0.20660
Resíduo	28	2.233333	0.7976190		

Coeficiente de variação = 9, 209

**Vigor TTR 60**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	0.2083333	0.2083333	2.869	0.10140
Resíduo	28	2.033333	0.7261905		

Coeficiente de variação = 9, 033

**Vigor TTR 90**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	0.8333333	0.8333333	0.049	*****
Resíduo	28	4.733333	0.1690476		

Coeficiente de variação = 15, 323

**3. Análise do sêmen resfriado****Motilidade**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	333.3333	333.3333	7.867	0.00941
Garanhão	2	1911.667	955.8333	22.558	0.00000
Resíduo	26	1101.667	42.37179		

Coeficiente de variação = 19, 335

**Vigor**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	1.408333	1.408333	14.550	0.00076
Garanhão	2	2.316667	1.158333	11.967	0.00021
Resíduo	26	2.516667	0.9679487		

Coeficiente de variação = 14, 250

**Morfologia - Normais**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	31.00833	31.00833	0.386	*****
Garanhão	2	217.8540	108.9270	1.355	0.27699
Gar × Trat	2	246.2087	123.1043	1.531	0.23665
Resíduo	24	1929.416	80.39233		

Coeficiente de variação = 13, 445

**Morfologia – Defeitos maiores**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	15.40833	15.40833	0.611	*****
Garanhão	2	139.0167	69.50833	2.756	0.08364
Gar × Trat	2	0.4166667	0.2083333	0.008	*****
Resíduo	24	605.2000	25.21667		

Coeficiente de variação = 58, 504

**Morfologia – Defeitos menores**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	2.700000	2.700000	0.035	*****
Garanhão	2	386.9007	193.4503	2.489	0.10416
Gar × Trat	2	259.2420	129.6210	1.668	0.20980
Resíduo	24	1865.336	77.72233		

Coeficiente de variação = 34, 718

**Epifluorescência - Viáveis**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	8870.415	8870.415	30.181	0.00003
Garanhão	2	1314.003	657.0017	2.235	0.13579
Gar × Trat	2	77.61000	38.80500	0.132	*****
Resíduo	18	5290.290	293.9050		

Coeficiente de variação = 41, 054

**HOST**

Fonte de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	1984.711	1984.711	14.954	0.00113
Garanhão	2	815.3415	407.6707	3.072	0.07117
Gar × Trat	2	439.5081	219.7541	1.656	0.21874
Resíduo	18	2388.994	132.7219		

Coeficiente de variação = 35, 934

**Supravital**

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	1	666.7604	666.7604	1.191	0.28948
Garanhão	2	676.5033	338.2517	0.604	*****
Gar × Trat	2	1477.363	738.6817	1.320	0.29186
Resíduo	18	10075.03	559.7240		

Coeficiente de variação= 62, 021

**Motilidade TTR 0**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	333.3333	333.3333	3.097	0.08934
Resíduo	28	3013.333	107.6190		

Coefficiente de variação = 30, 814

**Motilidade TTR 30**

Fontes de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	440.8333	440.8333	1.900	0.17900
Resíduo	28	6496.667	232.0238		

Coefficiente de variação = 55, 390

**Motilidade TTR 60**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	213.3333	213.3333	1.029	0.31915
Resíduo	28	5806.667	207.3810		

Coefficiente de variação = 68, 575

**Motilidade TTR 90**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	120.0000	120.0000	0.644	*****
Resíduo	28	5216.667	186.3095		

Coefficiente de variação = 77, 261

**Vigor TTR 0**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	1.408333	1.408333	8.159	0.00799
Resíduo	28	4.833333	0.1726190		

Coefficiente de variação = 19, 029

**Vigor TTR 30**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	1.875000	1.875000	2.565	0.12046
Resíduo	28	20.46667	0.7309524		

Coefficiente de variação = 47, 942

**Vigor TTR 60**

Font de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	0.3000000	0.3000000	0.349	*****
Resíduo	28	24.06667	0.8595238		

Coefficiente de variação = 64, 682

### Vigor TTR 90

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	0.5333333	0.5333333	0.628	*****
Resíduo	28	23.76667	0.8488095		

Coeficiente de variação = 70, 870

#### 4. Análise da variação do sêmen resfriado entre ganhões

### Motilidade sêmen resfriado – Tratamento 1

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Ganhão	2	930.0000	465.0000	18.000	0.00024
Resíduo	12	310.0000	25.83333		

Coeficiente de variação = 13, 737

#### NEWMAN KEULS

Variável = Motilidade (25.83333)

GAR	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
1		5	44.0000	A
2		5	41.0000	A
3		5	26.0000	B

### Vigor sêmen resfriado – Tratamento 1

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Ganhão	2	0.7000000	0.3500000	4.667	0.03168
Resíduo	12	0.9000000	0.7500000		

Coeficiente de variação = 11, 411

#### NEWMAN KEULS

Variável = Vigor (0.7500000)

GAR	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
2		5	2.6000	A
1		5	2.5000	A
3		5	2.1000	B

### Morfologia - Normais - Tratamento 1

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	2	142.3613	71.18067	0.932	*****
Resíduo	12	916.2480	76.35400		

Coeficiente de variação= 13,305

### Motilidade sêmen resfriado – Tratamento 2

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	2	1143.333	571.6667	10.889	0.00201
Resíduo	12	630.0000	52.50000		

Coeficiente de variação = 23,887

NEWMAN KEULS

Variável = Motilidade (52.50000)

GAR	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
1		5	42.0000	A
2		5	28.0000	B
3		5	21.0000	B

### Vigor sêmen resfriado – Tratamento 2

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	2	2.033333	1.016667	10.167	0.00261
Resíduo	12	1.200000	0.1000000		

Coeficiente de variação = 16,079

NEWMAN KEULS

Variável = Vigor (0.1000000)

GAR	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
1		5	2.4000	A
2		5	2.0000	A
3		5	1.5000	B

### Morfologia - Normais - Tratamento 2

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	2	321.7013	160.8507	1.905	0.19119
Resíduo	12	1013.168	84.43067		

Coeficiente de variação = 13,571

b. Experimento 2  
 1. Análise do sêmen fresco

**Concentração**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	190846.6	190846.6	20.365	0.00007
Resíduo	37	356107.2	9371.242		

Coeficiente de variação = 51, 329

**Volume**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	11651.09	11651.09	43.725	0.00000
Resíduo	38	10125.69	266.4655		

Coeficiente de variação = 29, 856

**Espermatozoides totais**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	25.03200	25.03200	4.083	0.05042
Resíduo	38	232.9789	6.131025		

Coeficiente de variação = 31, 432

**Espermatozoides viáveis**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	1.455268	1.455268	0.473	*****
Resíduo	38	116.8030	3.073763		

Coeficiente de variação = 32, 359

2. Parâmetros de controle

**Taxa de diluição**

Fontes de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	69.46223	69.46223	62.030	0.00000
Resíduo	38	42.55312	1.119819		

Coeficiente de variação = 40, 661

**Volume da dose inseminante**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	11.50276	11.50276	2.392	0.13026
Resíduo	38	182.7472	4.809136		

Coeficiente de variação = 14, 036



### **Número de inseminações**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	2.536320	2.536320	5.823	0.01840
Tratamento	1	0.4271982	0.4271982	0.981	*****
Resíduo	71	30.92314	0.4355372		

Coeficiente de variação = 33, 450

### **Intervalo coleta-inseminação**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	460.7004	460.7004	0.582	*****
Tratamento	1	28.57835	28.57835	0.036	*****
Gar × Trat	1	261.9179	261.9179	0.331	*****
Resíduo	150	118831.0	792.2068		

Coeficiente de variação = 1, 901

### **Intervalo coleta-diluição**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	251.6788	251.6788	5.552	0.02373
Resíduo	38	1722.721	45.33477		

Coeficiente de variação = 31, 760

### **Intervalo diluição-resfriamento**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	23.71362	23.71362	1.006	0.32230
Resíduo	38	896.0614	23.58056		

Coeficiente de variação = 65, 40

### **Intervalo coleta-resfriamento**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	120.8840	120.8840	2.191	0.14706
Resíduo	38	2096.491	55.17082		

Coeficiente de variação = 25, 948

## **3. Análise do sêmen resfriado**

### **Motilidade**

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	1625.221	1625.221	18.023	0.00007
Garanhão	1	925.3325	925.3325	10.262	0.00199
Gar × Trat	1	331.4706	331.4706	3.676	0.05897
Resíduo	76	6853.197	90.17364		

Coeficiente de variação = 20, 312

## Vigor

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Tratamento	1	7.817463	7.817463	74.937	0.00000
Garanhão	1	7.197898	7.197898	68.998	0.00000
Gar × Trat	1	0.3424632	0.3424632	3.283	0.07397
Resíduo	76	7.928389	0.1043209		

Coefficiente de variação = 11, 826

## Queda da motilidade

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	1	1375.754	1375.754	15.309	0.00021
Garanhão	1	94.57801	94.57801	1.052	0.30820
Gar × Trat	1	354.5045	354.5045	3.945	0.05063
Resíduo	76	6829.668	89.86405		

Coefficiente de variação = 43, 089

## Morfologia - Normais

Fonte de variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	2410.913	2410.913	24.752	0.00000
Tratamento	2	2321.450	1160.725	11.917	0.00002
Resíduo	104	10129.87	97.40258		

Coefficiente de variação = 14, 766

## NEWMAN KEULS

Variável = Normais (97.40258)

TRAT	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
1		36	72.8273	A
3		38	63.6364	B
2		34	62.3966	B

## Morfologia – Defeitos maiores

Fonte de variação	G. L.	Soma de quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	187.4298	187.4298	37.604	0.00000
Tratamento	2	12.21796	6.108979	1.226	0.29777
Resíduo	104	518.3685	4.984312		

Coefficiente de variação = 53, 098.

### Morfologia – Defeitos menores

Fonte de variação	G. L.	Soma de quadrado	Quadrado médio	F	Signif.
Garanhão	1	3953.515	3953.515	41.891	0.00000
Tratamento	2	2639.346	1319.673	13.983	0.00000
Resíduo	104	9815.181	94.37674		

Coefficiente de variação = 33, 559.

### NEWMAN KEULS

Variável = Defeitos menores (94.37674)

TRAT	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
2		34	33.6339	A
3		38	32.6382	A
1		36	22.6570	B

### 4. Fertilidade do sêmen

#### Fertilidade dos tratamentos - Garanhão 1 e 2

Frequência	T 1	T 2	Total
Prenhas	21	11	32
Vazias	17	25	42
Total	38	36	74

Teste Qui-Quadrado – 5%

Teste	Valor	G.L.	P
Qui-Quadrado	3,84	1	4,59