

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

***CONTAINER (CP) PARA REFRIGERAÇÃO E
PRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO***

Daniela Brandão Nunes

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
FEVEREIRO DE 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

CONTAINER (CP) PARA REFRIGERAÇÃO E
PRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQÜINO

Daniela Brandão Nunes

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL

2006

N972c Nunes, Daniela Brandão
Container (CP) para refrigeração e preservação do sêmen eqüino /
Daniela Brandão Nunes. -- Campo Grande, MS, 2006.
68 f. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1. Sêmen – Preservação. 2. Eqüino – Inseminação artificial. I. Zúccari,
Carmem Estefânia Serra Neto. II. Título.

CDD (22) - 636.108245

Catálogo na publicação: Divisão de Processamento Técnico da Coordenadoria de
Biblioteca Central da UFMS.

**A vocês, pai e mãe, pessoas tão especiais,
de quem me orgulho muito,
DEDICO esse trabalho**

**... "Somos sempre iguais,
braços dados ou não"
Geraldo Vandré**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas muito queridas que estiveram ao meu lado e assim, contribuíram para conclusão desse trabalho.

Fana, espero que saiba da sua importância em todos os aspectos da minha vida desde o dia em que nos conhecemos ("1995") e assim, pudemos nos tornar mais do que aluna e orientadora, muito... muito... obrigada.

Guinho e Diego, pelos momentos tão alegres que passamos juntos....

Cris e Chico, pelos desafios do crescimento como pessoa...

Arinha, obrigada por toda sua ajuda, paciência e cuidados.

Márcia e Rê, minhas grandes amigas, muito obrigada pela fiel amizade.

Camila, minha estagiária e hoje companheira de trabalho, obrigada por toda sua ajuda e feliz convivência em todos esses anos.

A todos os meus clientes, em especial ao Marcelo Iguma, Renato Eugênio de Rezende Barbosa, João Leopoldo Samways Filho, Carlos Stephanini, Manoel Érico Barreto, Osmar Dutra, Bernard De Wulf... muito obrigada pela confiança, paciência e pelo estímulo para meu crescimento como profissional.

Colegas de mestrados, sinto muito orgulho de poder fazer parte de uma turma tão determinada para melhoria do curso e muito obrigada pelo agradável convívio nestes anos.

Aos professores do curso de mestrado, em especial a Prof^a. Dr^a. Eliane (Lili), Prof. Dr. Zorzatto, Prof. Dr. Monreal e ao Dr. José Robson Bezerra Sereno, por todas as sugestões para melhorar meu trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida, e...

...Ao Rô "que teve tanta paciência comigo", obrigada por me lembrar das coisas mais simples e também mais importantes quando estava distraída... pelo amor... respeito... enfim, por estar ao meu lado e fazer parte dos meus sonhos...

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Componentes do CP1 - bombonas plásticas recicláveis, recipiente cilíndrico de vidro para armazenamento do sêmen e copo isotérmico preenchido internamente por espuma..... 49
- Figura 2. Descrição detalhada do *container* CP2 - caixa isotérmica retangular em isopor com as seguintes dimensões internas (em centímetros): comprimento 25,0; largura 17,1; altura 20,4 e parede externa com espessura de 1,6 cm. O modelo é equipado internamente com cinco unidades de gelos recicláveis contidos em bombonas plásticas com as seguintes medidas, em centímetros, comprimento 13,8; largura 9,8; espessura 5,0, dispostas de maneira a circundar uma caixa cilíndrica também de isopor, em formato de copo cujas dimensões internas, em centímetros, são as seguintes: diâmetro 7,0; e altura 9,8, sendo sua parede externa de 1,0 cm de espessura, sendo que, dentro deste copo de isopor, envolvida por uma manta de espuma, fica contido o recipiente cilíndrico de vidro, onde é armazenado o sêmen - Patente: Modelo de utilidade n. 000037, INPI/MS, 24 de Janeiro de 2003..... 50
- Figura 3. Curva de refrigeração do sêmen armazenado no *container* CP1 em função do tempo..... 54
- Figura 4. Curva de refrigeração do sêmen armazenado no *container* CP2 em função do tempo..... 56
- Figura 5. Curva de refrigeração do sêmen com volumes de 50ml e concentrações de 500 e 750×10^6 durante a estocagem no CP2 em função do tempo..... 57
- Figura 6. Curva de refrigeração do sêmen com volumes de 100ml e concentrações de 500 e 750×10^6 durante a estocagem no CP2 em função do tempo..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estatística descritiva dos valores da motilidade progressiva (%) para o sêmen nos momentos pré-refrigeração (M-0) e após 24 horas nos <i>containers</i> CP1 (CP1-M24) e EQ (EQ-M24).....	55
Tabela 2. Taxa de refrigeração em função do tempo, para o intervalo aproximado de 20°C - 8°C e momento em que foi atingida a menor temperatura, para os <i>containers</i> CP1 e CP2 sem a troca do sistema de refrigeração.....	56
Tabela 3. Taxa média de refrigeração do sêmen equino aos primeiros 30 e 60 minutos segundo diferentes volumes e concentrações	57
Tabela 4. Comparação dos valores medianos de motilidade progressiva (%) nos momentos pré-refrigeração (M-0), 24 e 48 horas pós-refrigeração segundo diferentes volumes (ml) e concentrações ($\times 10^6$) espermáticas	58
Tabela 5. Comparação dos valores medianos para o número de células íntegras nos momentos pré-refrigeração (M-0), 24 e 48 horas pós- refrigeração segundo diferentes volumes (ml) e concentrações ($\times 10^6$) espermáticas	58
Tabela 6. Valores médios (\pm desvio padrão) para as variáveis motilidade progressiva (%) e número de células íntegras durante refrigeração por 48 horas no <i>container</i> CP2.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Eficiência reprodutiva de eqüinos submetidos à inseminação artificial (IA) com sêmen a fresco, refrigerado e congelado.....	30
---	----

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. Características do Espermatozóide Equino.....	10
2.2. Fatores que Afetam a Qualidade do Sêmen Equino Refrigerado.....	11
2.2.1. Lesão celular induzida pelo frio.....	11
2.2.2. Equipamentos utilizados para a refrigeração e transporte do sêmen equino.....	12
2.2.3. Taxa de refrigeração do sêmen equino.....	14
2.2.4. Temperatura final de estocagem e tempo de preservação do sêmen equino refrigerado.....	15
2.2.5. Diluição do sêmen equino para refrigeração.....	17
2.2.6. Concentração espermática e volume da dose inseminante do sêmen equino refrigerado.....	21
2.2.7. Frequência e momento da inseminação artificial com sêmen equino refrigerado.....	23
2.2.8. Efeito de garanhão frente a refrigeração seminal.....	24
2.3. Avaliação do Sêmen Refrigerado de Equinos.....	26
2.4. Taxa de Prenhez do Sêmen Equino Refrigerado.....	28
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	43
Eficiência do <i>Container</i> CP para refrigeração e preservação do sêmen equino a 2,0°C pós 24 e 48 horas.....	43
Resumo.....	43
Abstract.....	45
Introdução.....	46
Materiais e Métodos.....	47
Resultados.....	54
Discussão.....	60
Conclusões.....	64
Referências Bibliográficas.....	64

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) com sêmen a fresco ou refrigerado é uma ferramenta que, ao ser empregada adequadamente, proporciona boa eficiência reprodutiva, com a obtenção de taxas de prenhez e nascimento similares à monta natural (MN).

O armazenamento e o transporte de sêmen, seja pela congelação ou refrigeração, permitem direcionar melhor os acasalamentos através da utilização de garanhões geneticamente superiores que, na maioria das vezes, ficam alojados nas centrais de reprodução.

A IA com sêmen congelado ainda tem questões técnicas a serem solucionadas, como a variação individual frente à criopreservação, o baixo rendimento de doses por ejaculado, o intenso manejo das éguas durante as inseminações, maior custo por prenhez, além da grande oscilação das taxas de prenhez em relação às obtidas com MN ou IA com sêmen a fresco ou refrigerado (Ball, 1998a; Backman et al., 2004). Desta forma, a IA com sêmen refrigerado vem sendo amplamente utilizada nas últimas décadas, mesmo antes de algumas associações de raça oficializarem a sua aplicação como método de acasalamento, pois muitos criadores evitam deslocar as éguas até o local onde encontram-se os garanhões.

Padilla e Foote (1991) e Amann e Graham (1993) citam que a manutenção da fertilidade dos espermatozoides é importante durante a refrigeração, transporte e até o momento da inseminação. Qualquer alteração que ocorra durante a produção, colheita e o armazenamento do gameta masculino, até o seu contato com o ovócito, poderá afetar o processo de fecundação. Assim, para a obtenção de bons resultados da IA, os espermatozoides deverão apresentar integridade funcional e estrutural, até o momento da fertilização.

A presente revisão tem como objetivo geral abordar aspectos relacionados à preservação espermática pela refrigeração que possam interferir na fertilidade *in vivo* e, como objetivo específico, testar a eficiência de dois *containers* (CP1 e CP2) para a preservação do sêmen equino e sua fertilidade após armazenamento por 24 e 48 horas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características do Espermatozóide Equino

Os espermatozóides são células complexas que têm como principal função fertilizar o ovócito, o que depende da integridade estrutural e funcional dos diferentes compartimentos celulares (Aurich, 2005).

Para ser capaz de fertilizar, o espermatozóide deve apresentar: a) potencial metabólico para produção de energia; b) motilidade progressiva; c) proteínas na membrana plasmática (MP) essenciais para sua sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea, para a supressão da imunidade local, interações com células epiteliais e ligação ao ovócito; d) distribuição de lipídeos, nas membranas acrossomais e plasmática, que as estabilize até o momento da fertilização, quando ocorrerá a fusão das membranas plasmática e acrossomal externa; e) enzimas acrossomais necessárias para a penetração através da zona pelúcida (ZP); e f) MP íntegra que permita a ocorrência da reação do acrossoma, ligação e penetração através da ZP do ovócito (Amann e Graham, 1993; Squires et al., 1999; Aurich, 2005).

Pode-se dividir o espermatozóide em diferentes regiões: cabeça, colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal (Barth e Oko, 1989). Envolvendo toda a célula existe a MP que é composta de uma dupla camada de lipídeos, proteínas e carboidratos. Em cada compartimento da membrana sua composição molecular é diferente, o que faz com que ela se comporte de forma distinta frente às variações sofridas pela célula, tais como: alterações de temperatura, osmolaridade e pH.

Os lipídios predominantes da MP são os fosfolipídios e o colesterol. Os fosfolipídios são orientados com a cabeça hidrofílica para o compartimento extracelular e a cauda hidrofóbica direcionada para o centro da membrana. A bicamada lipídica é a base universal da estrutura da membrana celular (Alberts et al., 1999).

Os carboidratos encontrados na superfície da MP têm importante papel na adesão entre as células, como por exemplo no reconhecimento do ovócito pelo espermatozóide (Alberts et al., 1999).

A MP à temperatura corporal é fluida, ou seja, seus componentes como lipídios, proteínas e carboidratos interagem continuamente (Suarez, 1998).

A incapacidade dos espermatozóides em sintetizar RNA limita sua capacidade de regeneração, conseqüentemente o gameta não é capaz de reparar danos celulares (Squires et al., 1999).

Ball (1998b) ratificaram a necessidade de cuidados especiais durante a manipulação do sêmen a fim de se preservar a integridade de todos os compartimentos da célula para maximizar o seu potencial fertilizante.

2.2. Fatores que Afetam a Qualidade do Sêmen Equino Refrigerado

2.2.1. Lesão celular induzida pelo frio

À temperatura corporal o metabolismo espermático é alto e a cada 10°C de sua queda, este se reduz em cerca de 50%. Quando os espermatozoides são mantidos a 5°C, apenas 10% de seu metabolismo é necessário para sua sobrevivência quando comparado à preservação a 38°C. Desta forma, a refrigeração reduz o catabolismo espermático, o que é necessário para a preservação do ejaculado por longos períodos (Squires et al., 1999).

Envolvendo toda a célula espermática existe a membrana plasmática (MP) que é composta por uma dupla camada de lipídeos, proteínas e carboidratos. As membranas espermáticas são as estruturas mais afetadas pelo choque térmico (Amann e 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).

Quaisquer modificações na organização em mosaico fluído da membrana, como assimetrias na bicamada lipídica e sua interação com as proteínas, podem provocar alterações nos receptores de membrana, o que altera suas funções.

A MP, afetada pelo frio, pode sofrer mudanças na permeabilidade, funcionais e metabólicas, prejudicando a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides (Amann e Graham, 1993).

As proteínas intracelulares também são afetadas pela refrigeração, ou seja, quando a temperatura é reduzida, as funções enzimáticas também o são. Proteínas envolvidas no transporte de substâncias através da membrana também têm redução de sua atividade sob baixas temperaturas (Amann e Graham, 1993).

Com a redução da temperatura os lipídios da membrana passam de um estado fluído, no qual as cadeias de ácidos graxos são relativamente desorganizadas, para um estado de gel, em que as cadeias dos ácidos graxos são rígidas e paralelas. Esta fase é chamada de transição

e para o sêmen eqüino ocorre por volta dos 20,7°C. Cada tipo de lipídio passa por esta fase a uma determinada temperatura específica (Amann e Graham, 1993).

Os espermatozóides de algumas espécies são muito resistentes ao choque térmico e estes, normalmente, possuem altas concentrações de colesterol na membrana plasmática. O colesterol estabiliza a membrana plasmática e reduz a temperatura na qual esta passa pela fase de transição e, em altas concentrações, pode eliminar esta fase (Stryer, 1992; Alberts et al., 1999). Os autores relataram uma melhora da motilidade espermática ao adicionar colesterol no meio diluidor para refrigeração de sêmen eqüino durante 24 e 48 horas. Além disso, ganhões que apresentavam sêmen com baixa resistência à refrigeração, obtiveram 50% de aumento na motilidade espermática após a adição do colesterol.

Os carboidratos encontrados na superfície da MP têm importante papel na adesão entre as células, como por exemplo, no reconhecimento do ovócito pelo espermatozóide (Alberts et al., 1999). A composição glicolipídica da membrana plasmática parece estar relacionada ao grau de suscetibilidade dos espermatozóides às taxas de refrigeração. Parks e Lynch (1992) verificaram um alto grau de resistência dos espermatozóides de galos às taxas de refrigeração rápidas e isso deve estar relacionado aos componentes glicolipídicos da membrana dos espermatozóides desta espécie.

Portanto, se as membranas celulares estiverem protegidas durante a refrigeração e as funções espermáticas forem preservadas até o momento da inseminação, se espera que ocorra um aumento da longevidade dos espermatozóides por redução na utilização das reservas de ATP, possibilitando que o ejaculado seja utilizado por longos períodos após sua colheita (Varner et al., 1989).

2.2.2. Equipamentos utilizados para a refrigeração e transporte do sêmen eqüino

Consultando a literatura, Silva Filho et al. (1994) compilaram as metodologias empregadas para a preservação do sêmen eqüino refrigerado e diferentes *containers* são citados, dentre eles: Sarstedt, Equitainer^{TM1}, Celle, MSP 1 e 2, desenvolvidos por pesquisadores holandeses, americanos, alemães e brasileiros, respectivamente.

Em relação aos *containers*, Silva Filho et al. (1994) relatam que estes devem atender às seguintes exigências: a) completo isolamento térmico do meio exterior; b) obtenção de taxa

¹ Hamilton-Thorn Research, Danvers, MA, USA.

de resfriamento lenta (ideal = $-0,33^{\circ}\text{C}/\text{min.}$); c) manutenção da temperatura pelo maior tempo possível após a estabilização ($4-8^{\circ}\text{C}$); d) proteção do sêmen; e) estrutura forte, para permitir o uso de diferentes meios de transporte e f) ser simples, barato, leve e de fácil manuseio.

Existem sistemas ativos e passivos para a preservação do sêmen, sendo que os passivos possuem a vantagem de ser mais baratos, porém possuem taxa de refrigeração dependente de fatores como a temperatura ambiente, volume e temperatura inicial da amostra. Já, os sistemas ativos, embora possuam taxas de refrigeração pré-determinadas, são caros e de pouca utilidade prática em condições de campo, onde o sêmen de um mesmo garanhão é enviado para diferentes localidades durante a estação de monta (Valle et al., 1999).

Desde a introdução do EquitainerTM no mercado (Douglas-Hamilton et al., 1984), vários outros *containers* vêm sendo desenvolvidos. Atualmente, existem diversos modelos comerciais: Equitainer ITM, Equitainer IITM, Equitainer IIITM, ExpectaFoil^{TM2}, Bio-Flite^{TM3}, Lane STS^{TM4} e Equine Express^{TM5}. Estes equipamentos possuem sistema de refrigeração passiva com diferentes taxas de refrigeração e temperatura final de estocagem. Os Equitainer I^{TM1} e II^{TM1} são muito resistentes e, desta forma, possuem recomendação para sua reutilização. Porém, o alto custo para sua aquisição e a necessidade de retorno ao haras de origem, tem desencorajado alguns criadores a utilizá-los (Brinsko et al., 2000b).

A temperatura ambiente à qual os *containers* 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).

Brinsko et al. (2000b) estudaram o efeito de diferentes temperaturas ambiente, -20°C , 22°C e 37°C , sobre sete *containers* e apesar destes terem respondido de forma distinta, todos sofreram maior impacto sobre as características de refrigeração e preservação da motilidade da amostra quando expostos ao ambiente de -20°C , não havendo diferença entre as demais temperaturas. No entanto, Valle et al. (1999) ao utilizarem o *container* Celle modificado, observaram que a temperatura ambiente influenciava as taxas iniciais de refrigeração e, estas eram mais rápidas em condições laboratoriais, em torno de 22°C , que àquelas obtidas ao submeter o *container* ao transporte rodoviário, quando havia insolação direta sobre o mesmo, com valores de $-0,25^{\circ}\text{C}$ e $-0,11^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Portanto, deve se ter cautela na utilização de equipamentos testados apenas em nível de laboratório.

² Expecta, Parker, CO, USA.

³ Anaheim Hills Equine Products, Anaheim Hills, CA, USA

⁴ Lane Manufacturing Inc., Denver, CO, USA.

⁵ MP& Associates, Des Moines, IA, USA.

Atualmente, no Brasil, já existem alguns modelos de *container* comercialmente disponíveis, sendo eles: Botu-Box[®] e Botutainer[®], fabricados pela Biotech Botucatu e Max-Sêmen Express[®] revendido pela E.H.G. Agrofarma. Os fabricantes informam que a temperatura final de armazenamento do Botu-Box[®] e Max-Sêmen Express[®] é de aproximadamente 15°C e a do Botutainer[®], de aproximadamente 5°C.

Para melhor informar os consumidores, os *containers* devem apresentar suas especificações técnicas como a taxa de refrigeração, temperatura final e tempo máximo de estocagem. Comparações entre taxas de concepção obtidas pela estocagem do sêmen em diferentes *containers* podem ser perigosas por estes apresentarem características de preservação distintas (Silva Filho et al., 1994). Desta forma, a escolha do equipamento mais adequado para refrigerar e transportar o sêmen equino é um fator importante para assegurar uma maior longevidade espermática e boa eficiência reprodutiva.

2.2.3. Taxa de refrigeração do sêmen equino

Para a manutenção da capacidade fertilizante da célula espermática, é fundamental que suas membranas estejam íntegras. Aurich (2005) define como conseqüências do choque-térmico as alterações caracterizadas por um modelo anormal de deslocamento e rápida queda da motilidade espermática, lesões nas membranas, redução do metabolismo, perda de enzimas e de outros componentes intracelulares.

Ao se resfriar o sêmen de 37°C a 5°C a taxa de refrigeração deve ser controlada, principalmente entre 19°C e 8°C, intervalo este em que pode ocorrer o choque-térmico (Moran et al., 1992), pois os lipídeos da membrana estão passando pela fase de transição, indo do estado fluido para o gel (Stryer, 1992). Os danos celulares podem ser minimizados pela adição de lipídeos (gema do ovo) ou lipoproteínas (leite) ao diluidor (Amann e Graham, 1993; Graham, 1996).

Douglas-Hamilton et al. (1984) verificaram que tanto taxas de refrigeração iniciais superiores a -1°C/min., como taxas de refrigeração muito lentas (<0,05°C/min) eram deletérias para a motilidade e morfologia espermáticas. Com isso os pesquisadores idealizaram um *container* com taxa de refrigeração inicial de aproximadamente -0,3°C/min. De fato, Province et al. (1985) verificaram uma redução significativa da motilidade espermática quando compararam a imersão direta do sêmen em água a 5°C com taxas de refrigeração de -1,0, -0,5 e -0,2°C/min. Da mesma forma, Varner et al. (1989) verificaram que taxas de refrigeração mais lentas (-0,240 ± 0,042°C/min.), durante os primeiros 15 minutos, proporcionaram

melhores valores de motilidade quando comparadas às taxas mais rápidas ($-1,091 \pm 0,003^\circ\text{C}/\text{min.}$) ($p < 0,05$). Por outro lado Mattos (1995), ao utilizar uma taxa de refrigeração inicial de $-1,0^\circ\text{C}/\text{min.}$, não observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os índices de prenhez obtidos com sêmen fresco e refrigerado por 24 horas a 4°C , sendo eles de 75,7% e 58,6%, respectivamente.

De acordo com Ferreira (1993) os componentes do diluidor modificaram o tempo de preservação do sêmen de jumentos, pois ao verificar o efeito da taxa de refrigeração sobre a longevidade espermática, aferida através da motilidade total, progressiva e vigor, não houve diferença entre as taxas de $-0,6^\circ\text{C}/\text{min.}$, $-0,3^\circ\text{C}/\text{min.}$ e $-0,2^\circ\text{C}/\text{min.}$, quando o sêmen foi diluído em meio à base de leite, porém, para o diluente à base de gema de ovo, a taxa de refrigeração de $-0,6^\circ\text{C}/\text{min.}$ resultou em maior longevidade.

Parece haver consenso entre os pesquisadores sobre a necessidade de se utilizar taxas de refrigeração lentas, não superiores a $-0,05^\circ\text{C}/\text{min.}$, entre 19 e 8°C , pois esta é a fase crítica de ocorrência das lesões nas membranas espermáticas (Kayser et al., 1992; Moran et al., 1992; Amann e Graham, 1993; Squires et al., 1999).

2.2.4. Temperatura final de estocagem e tempo de preservação do sêmen equino refrigerado

A temperatura e o tempo de armazenamento do sêmen têm efeito sobre as características de motilidade espermática, as taxas de prenhez e os processos decorrentes do envelhecimento celular.

A temperatura ideal de estocagem do sêmen tem sido discutida pelos pesquisadores e dela dependem processos relacionados às lesões espermáticas causadas pelo frio, a taxa de crescimento microbiano e o estresse oxidativo das membranas.

Estudando o efeito de quatro temperaturas sobre a motilidade espermática, durante 36 horas de armazenamento, Province et al. (1985) verificaram que o sêmen estocado a 20°C e 15°C apresentou valores superiores de motilidade do que a 10°C ou 5°C ($p < 0,05$), enquanto Varner et al. (1988) e Varner et al. (1989), constataram que a estocagem entre 4°C e 5°C por 24 horas resultou em maior motilidade espermática que entre 20°C a 25°C , com taxa de prenhez de 73% para ambas as faixas de temperatura.

Para uma adequada preservação do ejaculado Varner et al. (1989) sugerem que a resistência do ejaculado dos garanhões a refrigeração deve ser analisada, antes do estabelecimento de uma temperatura ideal de armazenamento do sêmen. Batellier et al. (2001)

verificaram que para alguns gananhões a estocagem do sêmen a 15°C por 24 horas foi mais eficiente que a 5°C, com aumento da longevidade espermática e melhores índices de prenhez. Já, Ball (1998b) relata que existe uma redução significativa da fertilidade quando o sêmen é estocado por 24 horas a 20°C, quando comparada àquela obtida após preservação a 5°C.

Love et al. (2001) verificaram que a temperatura de estocagem teve efeito sobre a integridade da cromatina espermática, sendo que temperaturas mais baixas como 5°C mostraram-se mais eficientes, de 7 até 46 horas de armazenamento do sêmen, quando comparadas a preservação a 20°C.

Lindsey et al. (2005) avaliaram qual seria a temperatura ideal para o armazenamento do ejaculado, por um período de 18 horas, antes do processo de sexagem. Embora as taxas de prenhez não tenham diferido estatisticamente ($p > 0,05$), foram de 72% e 55% para o sêmen conservado a 15°C e 5°C, respectivamente.

Pelo exposto verifica-se que há controvérsias entre os resultados de pesquisas quanto à temperatura ideal de estocagem para o sêmen eqüino, sendo que alguns demonstram que a preservação entre 15 e 20°C é superior na conservação das características seminais e fertilidade, enquanto outros afirmam ser superior a estocagem entre 4 e 5°C.

A conservação do ejaculado por pelo menos 24 horas é importante, pois este é, na maioria das vezes, o tempo necessário para que o sêmen dos gananhões seja transportado e recebido pelos haras para a sua utilização na IA (Squires et al., 1999). O armazenamento por períodos superiores pode desencadear processos bioquímicos que comprometem a fertilidade dos gametas, como a capacitação espermática prematura durante a estocagem que resultará na diminuição da capacidade de penetrar e fertilizar o ovócito (Pommer et al., 2002).

As alterações espermáticas causadas pelo envelhecimento podem ser decorrentes de instabilidade nuclear, perda de componentes intracelulares e, em especial, da peroxidação lipídica (Amann e Graham, 1993).

Após a ejaculação e durante a manipulação, o sêmen fica exposto a diversos fatores, sobretudo ao processo de peroxidação dos lipídeos da MP promovido pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (Boe-Hansen et al., 2005; Funahashi e Sano, 2005; Kankofer et al., 2005).

Estudos conduzidos por Ball et al. (2001) apontam à importância do estresse oxidativo, causado pelas ROS, sobre a função espermática do sêmen preservado por longos períodos. Os autores sugerem que a H₂O₂ parece ser a ROS que está associada com os maiores danos aos espermatozóides, que são caracterizados pela perda de motilidade.

A alta concentração de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática dos espermatozóides favorece o estresse oxidativo sofrido por essas células (Aurich, 2005).

Assim, os lipídios podem ser desestabilizados pelos radicais livres que são gerados pelos próprios espermatozóides Ball et al. (2001).

Os resíduos metabólicos, como ácido lático e/ou CO₂, podem aumentar a acidez do sêmen causando prejuízos celulares irreversíveis pela peroxidação dos lipídios da membrana. Uma leve oxidação parece promover a capacitação, entretanto o estresse oxidativo acarreta prejuízos à membrana que resultam em perda da motilidade e redução da fertilidade (Aurich, 2005).

Substâncias antioxidantes como a glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e a catalase, presentes no plasma seminal, controlam o balanço entre a produção de ROS e sua neutralização (Kankofer et al., 2005).

A refrigeração do sêmen reduz sua atividade metabólica, portanto, a produção de ROS, conforme apontam os resultados de Kankofer et al. (2005) que estudando a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como um indicador da peroxidação lipídica, não acusaram aumento desta substância durante a estocagem do sêmen equino a 5°C por 24 horas, concluindo que a peroxidação lipídica não aumentava, substancialmente, durante o armazenamento do sêmen nestas condições, conferindo assim maior longevidade aos gametas.

2.2.5. Diluição do sêmen equino para refrigeração

Os diluidores de sêmen são soluções destinadas a proteger os espermatozóides de condições desfavoráveis e prolongar sua sobrevivência durante a refrigeração e o transporte, além de apresentarem a vantagem de aumentar o volume da dose inseminante e auxiliarem na avaliação do sêmen (Pickett e Shiner, 1994; Ball, 1998b; Darenius, 1998). Para avaliar a qualidade do meio diluidor devem ser aferidas a pressão osmótica e o pH e estes, devem apresentar valores entre 300 a 350 mOsm e 7,0 a 7,2, respectivamente (Darenius, 1998).

Uma característica importante dos diluidores utilizados na preservação do sêmen refrigerado é sua capacidade de estabilizar as membranas espermáticas durante a fase de transição, momento no qual ocorrem as maiores lesões celulares. Assim, para minimizar os danos causados pelo choque térmico uma variedade de substâncias pode ser adicionada ao meio diluidor (Kenney et al., 1975).

Os diluentes utilizados para preservação do sêmen equino refrigerado, geralmente, possuem leite e/ou gema de ovo como um dos componentes (Heitland et al., 1995).

A gema de ovo confere proteção aos espermatozóides contra o choque térmico e essa ação protetora se deve às lipoproteínas de baixa densidade (Amann e Graham, 1993), que permanecem firmemente ligadas aos espermatozóides, em especial a lipoproteína 3 (Foulkes, 1977). Entretanto, a gema de ovo contém progesterona, o que poderia induzir uma capacitação espermática precoce, ocasionando redução da fertilidade (Lipar et al., 1999), pois conforme demonstrado por Cheng et al. (1998) a ligação da progesterona exógena marcada ao receptor localizado na membrana plasmática do espermatozóide equino parece ser um importante passo na indução da reação do acrossomo.

Embora não se conheça o exato mecanismo de proteção do leite contra o choque térmico, provavelmente as proteínas do leite agem de modo similar às lipoproteínas da gema de ovo, ou seja, estabilizando as membranas (Amann e Graham, 1993). Batellier et al. (2001) relatam que a proteção conferida pelos componentes do leite estaria relacionada aos seus efeitos antioxidantes. De acordo com Batellier et al. (1997) o leite é um fluido biológico com uma complexa composição, mais de 100.000 moléculas, e algumas como a β -lactoglobulina são benéficas, enquanto outras, como a α -lactoalbumina, são prejudiciais à sobrevivência dos espermatozóides.

O uso do leite em pó desnatado como um dos componentes do meio diluidor foi primeiramente relatado por Kenney et al. (1975), que obtiveram uma taxa de prenhez de 58% para as éguas inseminadas.

Ferreira (1993) comparou dois diluentes, um contendo gema de ovo e outro à base de leite, para a preservação do sêmen asinino sob refrigeração ativa entre 4 e 6°C. A partir de 24 horas o autor observou maior motilidade espermática total, progressiva e vigor ($p < 0,05$) para o sêmen diluído em meio à base de gema de ovo.

Tekin et al. (1989) verificaram uma superioridade nos valores da motilidade e morfologia espermáticas quando o sêmen era preservado por até 72 horas em diluidor à base de glicina-gema ("Dimitropoulos") quando comparados ao leite desnatado.

Bruemmert et al. (2002) e Squires et al. (1999) relataram que a adição de antioxidantes aos meios diluidores pode ser benéfica para preservar a motilidade e a integridade da membrana espermática e assim possibilitar um aumento da longevidade do sêmen. Kankofer et al. (2005) verificaram que a adição do diluidor EquiPro[®] aumentou a atividade de três enzimas antioxidantes, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e catalase, presentes no plasma seminal, ao refrigerar o sêmen equino a 5°C/24 horas, quando comparado ao sêmen *in natura*. Entretanto, Ball et al. (2001) não constataram efeito benéfico de diferentes substâncias antioxidantes hidro ou lipossolúveis, sobre a preservação da motilidade durante 72 horas de estocagem.

Amann e Graham (1993) citam que algumas substâncias quelantes, como o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), ao serem adicionadas aos meios diluidores, se ligam ao Ca^{2+} e Mg^{2+} , reduzindo a perda de íons intracelulares minimizando as lesões causadas pelo choque térmico.

Goulart et al. (2004), na tentativa de minimizar os efeitos provocados pelo estresse térmico causado pela refrigeração do sêmen equino, buscaram um indutor de funcionalidade, a pentoxifilina, que adicionada ao ejaculado diluído e refrigerado a 5°C , *in vitro*, melhorou a maioria dos parâmetros espermáticos relacionados à motilidade, o que, provavelmente, deveu-se ao aumento da concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos, em especial da adenina monofosfato cíclica (AMPC) e da guanosina monofosfato cíclica (GMPc).

A utilização de antibióticos nos diluidores é recomendada a fim de minimizar o crescimento bacteriano durante o armazenamento do sêmen até o momento da inseminação. Entretanto, estes não devem interferir na qualidade seminal ou mesmo impedir o estabelecimento da microflora vaginal, o que poderia favorecer o crescimento de microorganismos patogênicos (Darenius, 1998).

A porção fluída do ejaculado, no qual os espermatozóides estão presentes, é conhecida como plasma seminal (Garner e Hafez, 2004). Estudos comprovam que no plasma seminal existem substâncias moduladoras da resposta inflamatória uterina pós-cobertura e estas auxiliam na limpeza uterina de éguas suscetíveis a endometrite pós-cobertura (Troedsson, 1999). Além disso, o plasma seminal contém ocitocina e prostaglandinas, que promovem a contração uterina visando o transporte do gameta masculino até o local da fertilização (Katila, 2001) e substâncias antioxidantes como a cisteína, ergotioneína e glutathione peroxidase, capazes de minimizar os efeitos da peroxidação lipídica (Amann e Graham, 1993).

Apesar do importante papel do plasma seminal no transporte e fisiologia do gameta masculino, parece não ser o meio ideal para a preservação dos espermatozóides já que, grandes proporções de plasma seminal, acarretam redução da motilidade espermática durante um longo período de estocagem sob refrigeração, enquanto pequenas quantidades melhoram sua sobrevivência (Squires et al., 1999).

Moore et al. (2005) verificaram que, embora a exposição do sêmen por 15 minutos a concentrações de plasma seminal, variando de 0 a 80% antes da criopreservação, não tenham afetado a motilidade total, progressiva e integridade da membrana plasmática, a incubação por 2 a 6 horas com 20% de plasma seminal foi deletéria à viabilidade espermática quando comparada à preservação com 5% ($p < 0,05$).

Jasko et al. (1992a) verificaram que a ausência de plasma no sêmen equino diluído em meio à base de leite reduziu significativamente ($p < 0,05$) a motilidade espermática quando

refrigerado por 24 horas, contudo, Love et al. (2005) obtiveram melhor preservação da motilidade espermática e da integridade do DNA na ausência de plasma seminal quando o ejaculado foi diluído e refrigerado por 48 horas.

A interação entre a membrana plasmática do espermatozóide e os componentes específicos do plasma seminal parece interferir na suscetibilidade da membrana aos prejuízos causados pelo estresse térmico (Aurich, 2005). Os resultados de Kankofer et al. (2005) sugerem que para uma maior atividade de algumas enzimas antioxidantes, certa quantidade de plasma seminal deve ser mantida no ejaculado no momento da sua diluição.

Apesar da grande maioria dos meios utilizados para diluição de sêmen equino refrigerado ser composta de leite desnatado em pó e glicose, baseados na fórmula de Kenney et al. (1975), variações estão comercialmente disponíveis e diferem principalmente em relação à composição de antibióticos e açúcares (Squires et al., 1999; Varner, 2003).

Batellier et al. (2001) constataram que o diluidor francês INRA 96[®], suplementado com fosfocaseinato, uma fração protéica extraída do leite, foi mais eficaz na preservação do potencial fertilizante do espermatozóide equino refrigerado por 24 horas a 4°C, quando comparado ao diluidor americano E-Z Mixin[®]-CST, com taxas de prenhez/ciclo de 59% (n=39) e 49% (n=39), respectivamente (p=0,25).

No Brasil encontram-se disponíveis no mercado os diluidores Botu-Sêmen[®] e Botu-Turbo[®], comercializados pela Biotech Botucatu, os meios Max-Sêmen[®] e Max-Sêmen Plus[®] distribuídos pela E.H.G. Agrofarma e ainda o Equimix[®], comercializado pela Nutricell. Segundo os fabricantes as versões Turbo e Plus são acrescidas de componentes que aumentam a motilidade espermática e melhoram a sobrevivência do sêmen de garanhões com baixa resistência ao processo da refrigeração.

Modificações na composição dos diluidores para preservação do sêmen equino refrigerado têm sido estudadas a fim de se promover um aumento da longevidade espermática. Os crioprotetores extracelulares mais utilizados são à base de leite e de gema de ovo, sendo que algumas formulações possuem ambos. Diferentes antibióticos, tampões, açúcares e mais recentemente, a adição de agentes indutores de funcionalidade da célula espermática estão sendo investigados a fim de se obter uma melhor preservação do ejaculado de garanhões com baixa qualidade seminal.

2.2.6. Concentração espermática e volume da dose inseminante do sêmen equino refrigerado

Fatores como a estação do ano, frequência de ejaculação, tamanho dos testículos e a idade do garanhão devem ser levados em consideração ao se determinar o número de éguas que o reprodutor poderá servir durante a estação de monta, pois possuem efeito sobre o número de espermatozóides que o macho produz e que estarão disponíveis para a ejaculação (Pickett e Shiner, 1994).

Teoricamente, a fertilidade máxima poderia ser atingida aumentando-se o número de espermatozóides com potencial fecundante (Brandão et al., 2003). Apesar de milhares de espermatozóides chegarem ao local da fertilização no trato reprodutivo feminino, milhões são necessários para assegurar a fertilização (Suarez, 1998). Entretanto, quando os espermatozóides são viáveis por um período maior de tempo no trato reprodutivo da égua, provavelmente uma concentração espermática menor poderia ser utilizada na IA (Brandão et al., 2003).

Uma taxa de diluição adequada é fundamental para a preservação da viabilidade espermática quando sob refrigeração por 24 a 72 horas. Jasko et al. (1992a) verificaram que taxas de diluição variando entre 1:4 a 1:19 são adequadas para a preservação do sêmen equino refrigerado a 5°C e, a presença de pelo menos 5% de plasma seminal é importante para a manutenção da viabilidade do sêmen. Douglas-Hamilton et al. (1984) trabalhando com sêmen equino refrigerado a 5°C, utilizaram taxas de diluição de 1:2 a 1:6 e obtiveram uma taxa de prenhez ao 1º ciclo de 65% (n=46).

Numerosos estudos foram conduzidos desde 1970 por pesquisadores da *Colorado State University* a fim de determinar a concentração espermática a ser utilizada na inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado, sendo preconizado 500×10^6 de espermatozóides móveis (Ball, 2005). Assim, um total de 1×10^9 de espermatozóides deve ser enviado para os haras, o que normalmente garante uma inseminação com 500×10^6 espermatozóides móveis após o transporte. Em alguns casos, principalmente quando se trabalha com ejaculados que apresentam grandes volumes de plasma seminal, a centrifugação é necessária a fim de se concentrar o sêmen antes da diluição (Ball, 1998b).

Da mesma forma, Pickett e Shiner (1994) sugerem que, ao trabalhar com rebanhos de fertilidade desconhecida, a concentração espermática mínima com motilidade progressiva utilizada na inseminação artificial deve ser de 500×10^6 . Ao trabalharem com sêmen equino refrigerado por mais de 36 horas, Douglas-Hamilton et al. (1984) utilizaram $1,0 - 1,5 \times 10^9$ espermatozóides totais, pois consideravam uma redução da motilidade de aproximadamente

50%, assim, a concentração de espermatozóides viáveis no momento da inseminação deveria ser de 500 milhões.

Utilizando sêmen refrigerado a 20°C e transportado por $65,93 \pm 3,69$ minutos, Carvalho et al. (1998) não verificaram influência da concentração ($p > 0,05$) sobre as taxas de concepção ao primeiro ciclo de 92 éguas da raça Mangalarga Marchador. As taxas de prenhez ao 1º ciclo foram 43,75%, 57,89% e 54,55% para fêmeas inseminadas com concentrações inferiores a 250×10^6 , entre 250 e 350×10^6 e superiores a 350×10^6 espermatozóides viáveis, respectivamente.

Pesquisas recentes têm sido realizadas para avaliar a eficiência da utilização de técnicas de IA com baixa concentração espermática (Sieme et al., 2004; Ball, 2005; Güvenc et al., 2005; Lyle e Ferrer, 2005). Carvalho et al. (1998) e Brandão et al. (2003) relatam que a utilização de baixas concentrações na dose inseminante tem como principal objetivo maximizar o uso de um ejaculado, inseminando um maior número de éguas. Varner (2003) afirma que a concentração espermática utilizada na inseminação artificial com sêmen refrigerado pode ser reduzida em até 100 vezes caso o sêmen seja depositado perto da junção útero-tubária, através da inseminação histeroscópica ou com pipeta flexível.

Em relação ao volume utilizado para a inseminação, não está totalmente esclarecida qual é a influência deste sobre o transporte dos espermatozóides no trato reprodutivo da égua (Katila, 2001).

Pickett e Shiner (1994) relataram que ao utilizar pequenos volumes de sêmen para a inseminação de éguas, reduz-se o número de bactérias, debris e outros materiais que possam afetar a fertilidade ao serem introduzidos no útero. Squires et al. (1989) testaram volumes de 10 e 100 ml para a IA com 250×10^6 espermatozóides móveis e obtiveram 70,6% (12/17) e 13,6% (3/22) de taxa de recuperação embrionária, respectivamente ($p < 0,05$). Os autores verificaram que grandes volumes poderiam reduzir a fertilidade pelo expressivo refluxo cervical e irritação endometrial. Jasko et al. (1992b) não observaram diferença nas taxas de recuperação embrionária ao utilizarem 10 e 50 ml na inseminação de éguas com sêmen a fresco, sendo elas de 76% e 61,9%, respectivamente. Entretanto, Darenius (1998) abordando vários aspectos referentes ao uso de sêmen refrigerado na Suécia relata que não se constatou efeito negativo do volume sobre a fertilidade ao utilizarem doses entre 75 e 100 ml.

Quando se deposita o sêmen próximo à junção útero-tubária, utilizando, por exemplo, a inseminação histeroscópica, volumes tão pequenos como 20 e 200 μL são utilizados sem decréscimo na fertilidade (Morris e Allen, 2002).

Em síntese, a grande maioria das pesquisas revela que para se obter sucesso na IA com sêmen eqüino refrigerado deve ser utilizada uma concentração média de 500×10^6

espermatozoides viáveis. Entretanto, para alguns ganhões esta concentração pode ser reduzida sem queda da fertilidade. No que diz respeito ao volume da dose inseminante os resultados demonstram que a IA com valores de 10 até 75 ml garantem bons índices de prenhez, sendo estes valores recomendados.

2.2.7. Freqüência e momento da inseminação artificial com sêmen equino refrigerado

A fertilização depende, dentre outros fatores, do sincronismo no transporte dos gametas através do trato reprodutivo da fêmea (Hafez, 2004) para que estes estejam viáveis no momento da fecundação. Desta forma, a determinação do momento da IA é importante para a obtenção de boas taxas de prenhez (Pickett e Shiner, 1994).

De acordo com Allen (1984) a administração de 3.000 U.I. de gonadotrofina coriônica humana (hCG) induz a ovulação em éguas que apresentem folículos de diâmetro ≥ 40 mm, um controle farmacológico que se tornou rotina entre os profissionais que trabalham com sêmen refrigerado (Shore et al., 1998; Nunes et al., 2004a), pois além de proporcionar uma estimativa do momento de ocorrência da ovulação, também torna possível reduzir o número de inseminações por ciclo (IA/ciclo), sem comprometer a fertilidade (Pickett e Shiner, 1994).

Valle et al. (2000) trabalhando com sêmen refrigerado a 14°C e concentração de 400×10^6 espermatozoides móveis, não verificaram diferença nas taxas de prenhez ao utilizarem 1, 2, 3, 4 ou mais IA/ciclo ($p > 0,05$). Os autores destacaram que a redução do número de IA/ciclo é um fator de diminuição dos custos num programa de IA, principalmente quando há transporte de sêmen entre haras. Brandão et al. (2003) não verificaram aumento da taxa de prenhez ao elevar o número IA/ciclo, utilizando sêmen a fresco diluído. Os autores verificaram que, considerando os dados referentes a duas e três IA, a taxa de concepção / ciclo foi de 55,7%, semelhante àquela com quatro ou mais IA, de 50,0%. Nunes et al. (2004a) obtiveram 71,42%, 90% e 97,14% de prenhez ao 1º, 2º ciclos e ao final da estação de monta, utilizando inseminação artificial única / ciclo, com sêmen refrigerado a 15°C por 24 horas.

Considerando o período de sobrevivência dos gametas no trato reprodutivo feminino, Pickett e Amann (1987) recomendam que as inseminações sejam realizadas a intervalos de 48 horas durante o estro ou até 12 horas após a ovulação da égua e, segundo Ball (1998b) esta deve ocorrer 24 horas antes da ovulação, pois intervalos maiores poderão ocasionar redução nas taxas de fertilidade.

Em estudo retrospectivo Pickett e Shiner (1994) não relataram vantagens das IA diárias quando comparadas àquelas em dias alternados (64% *versus* 63% de prenhez, respectivamente).

Quando é realizado um bom controle do desenvolvimento folicular o número de IA pode ser reduzido, principalmente quando se trabalha com agentes indutores da ovulação. Desta forma, a fertilidade parece ser muito mais influenciada pelo intervalo entre a IA e a ovulação do que pelo número de inseminações realizadas por ciclo estral.

2.2.8. Efeito de garanhão frente a refrigeração seminal

Em virtude da espécie equina ser selecionada pelo padrão racial e performance atlética, pouca atenção é dada para o desempenho reprodutivo, portanto alguns garanhões apresentam baixos índices de eficiência reprodutiva. Metcalf (1998) cita que alguns países Europeus selecionam os garanhões que serão utilizados na estação de monta levando em consideração aspectos reprodutivos, assim como aqueles relacionados ao desempenho esportivo. Desta maneira, a seleção prévia destes reprodutores influencia positivamente as taxas de prenhez ao se utilizar a IA.

Darenius (1998) sugere que os garanhões a serem utilizados nos programas de IA com sêmen refrigerado devam possuir: órgãos genitais internos e externos sem alterações, produção semanal de espermatozoides em torno de $30-35 \times 10^9$, 70% de células morfológicamente normais, motilidade superior a 50% e, após 12 horas de refrigeração, uma redução da motilidade inicial não superior a 30%, mas mínima de 40% ao final desse período.

A diferença na composição das membranas espermáticas e do plasma seminal pode interferir na resistência do sêmen aos processos de refrigeração e/ou criopreservação (Brinsko et al., 2005; Moore et al., 2005).

De acordo com a suscetibilidade do sêmen frente à refrigeração, o ejaculado dos garanhões pode ser classificado como de alta e baixa qualidade. Segundo esta classificação, os garanhões com sêmen de baixa qualidade apresentam redução superior a 40% da motilidade progressiva inicial após 24 horas de armazenamento (Brinsko et al., 2000a). Entretanto, com a centrifugação e remoção parcial do plasma seminal, após 48 horas sob refrigeração, os autores verificaram manutenção da motilidade espermática para os garanhões com sêmen classificado como de baixa qualidade.

Empregando a IA com sêmen refrigerado, Metcalf (1998) verificou que as taxas de prenhez refletiam a qualidade do ejaculado utilizado. Ao analisar a motilidade progressiva,

morfologia espermática, número de espermatozóides viáveis e concentração, classificou o sêmen em excelente, bom, regular e ruim, obtendo índices de gestação de 87,5% (14/16), 62% (18/29), 33% (6/18) e 11% (2/18), respectivamente.

Batellier et al. (2001) sugerem, como uma alternativa para a refrigeração por 24 horas do sêmen de garanhões classificados como de baixa qualidade, a utilização do diluidor INRA 96[®], por este possuir entre seus constituintes o fosfocaseinato, fração protéica do leite que confere proteção à membrana por estabilizá-la e, a adoção da estocagem a 15°C, pois, desta forma, se evita a faixa de temperatura de ocorrência do choque térmico.

A preservação do sêmen equino sob refrigeração pode ocasionar a redução das taxas de fertilidade pela variação individual entre garanhões (Van der Holst, 1984; Batellier et al., 2001; Pommer et al., 2002). Alguns animais apresentam baixas taxas de prenhez ao serem utilizados em programas de IA com sêmen refrigerado por períodos superiores a 24 horas. Nestes casos, para a obtenção de bons índices de prenhez, recomenda-se que o sêmen destes animais deva ser utilizado logo após a sua colheita (Aurich, 2005).

Stradaoli et al. (2000), ao estudarem as características seminais e suas correlações com as concentrações de carnitina (LC) e acetilcarnitina (AC), verificaram uma correlação positiva de ambas com a concentração espermática e entre AC e espermatozóides morfolologicamente normais, indicando-as como potencial marcador de qualidade seminal. Além disso, a correlação entre AC e LC e espermatozóides com motilidade progressiva, após refrigeração, sugere que a carnitina possa contribuir para a manutenção da viabilidade espermática durante a estocagem *in vitro*.

Aparentemente, os garanhões subfêrteis possuem espermatozóides mais sensíveis às lesões da cromatina. Estudo conduzido por Love et al. (2001) sugere que reprodutores férteis não apresentaram aumento de lesões na cromatina espermática quando o sêmen é preservado a 5°C por até 46 horas, contrariamente o sêmen de animais subfêrteis revelaram declínio da qualidade da cromatina durante o armazenamento.

Na tentativa de melhorar a fertilidade do sêmen de garanhões que apresentam baixa tolerância à refrigeração, pesquisa recente revelou que estes foram beneficiados ao se elevar a proporção de ácido docosahexanóico (DHA) em suas dietas, um ácido graxo ômega 3 (Brinsko et al., 2005).

Muitos técnicos procuram solucionar problemas de subfertilidade que, se não forem adquiridos, pode resultar em seleção genética negativa dos animais do ponto de vista reprodutivo. Apesar das características reprodutivas serem de baixa herdabilidade, a obtenção de progênie de machos subfêrteis poderá perpetuar na população genes de indivíduos particularmente indesejáveis sob o aspecto reprodutivo (Amann e Graham, 1993).

2.3. Avaliação do Sêmen Refrigerado de Equinos

O processo de manipulação do ejaculado, com a finalidade de refrigerar e transportar o sêmen pode aumentar as lesões em diferentes regiões do espermatozóide e, assim, ocasionar a redução das taxas de fertilidade (Kenney et al., 1995; Aurich, 2005; Boe-Hansen et al., 2005).

No que diz respeito à avaliação do sêmen, o verdadeiro potencial fertilizante deste somente pode ser medido através da inseminação artificial de muitas éguas e a determinação do número de gestantes, porém esse é um método caro e demorado (Squires et al., 1999).

Na maioria das vezes o exame da saúde reprodutiva do garanhão se baseia apenas na avaliação da concentração, motilidade, morfologia espermática e capacidade de monta e ejaculação, o que é falho em prever a fertilidade potencial do macho (Ball, 1998b; Neild et al., 2005).

Os pesquisadores têm se dedicado a aprimorar técnicas para a avaliação do sêmen, entretanto, como são vários os atributos que devem ser avaliados a fim de se determinar o potencial fertilizante do espermatozóide, uma bateria de testes laboratoriais têm sido investigada. Assim, vários autores recomendam a realização de testes laboratoriais não tradicionais que poderiam revelar os efeitos da refrigeração e da estocagem do sêmen sobre a função espermática e fertilidade (Love et al., 2001; Varner, 2003; Boe-Hansen et al., 2005; Neild, et al., 2005).

Dentre os testes, a avaliação da motilidade é comumente usada, por ser relativamente simples e barata. Embora possua uma correlação de baixa a média intensidade com a fertilidade, pois não avalia todos os atributos que os espermatozoides devem possuir para a fecundação (Squires et al., 1999), esta técnica continua sendo indicada para a avaliação da viabilidade espermática, em razão da sua queda ser acompanhada pelo decréscimo do número de células com integridade estrutural (Zúccari, 1998).

O sistema de avaliação computadorizada é outro método utilizado para avaliar a motilidade espermática, com a vantagem de ser objetivo, o que reduz a possibilidade de erros, além de fornecer outras informações tais como a velocidade e trajeto dos espermatozoides. As desvantagens do uso desta técnica estão relacionadas ao custo e tempo necessários para cada avaliação (Squires et al., 1999; Aurich, 2005).

Muitas vezes se constata baixos índices de prenhez apesar da motilidade espermática não ser afetada após longos períodos de armazenamento do sêmen, sugerindo que outros compartimentos celulares, como a cromatina, estariam comprometidos e assim, limitariam o processo de fertilização (Love et al., 2005).

São descritos testes que avaliam a morfologia dos espermatozóides, a integridade estrutural da membrana plasmática através de colorações fluorescentes (Zúccari, 1998), além daqueles que avaliam a integridade funcional, como por exemplo o teste hiposmótico (Aurich, 2005).

A técnica de citometria de fluxo tem sido utilizada na tentativa de se prever com maior acurácia o potencial fertilizante do espermatozóide já que esta avalia simultaneamente vários atributos celulares, como a viabilidade celular, integridade acrossomal e função mitocondrial (Squires et al., 1999).

Alguns estudos sobre sêmen refrigerado têm utilizado testes complementares, como a avaliação da integridade da cromatina, para verificar as interações existentes entre a qualidade seminal e a fertilidade (Love et al., 2001; Neild, et al., 2005).

Recentemente, provas laboratoriais que avaliam a capacitação espermática, reação do acrossoma e estrutura do DNA estão sendo estudadas pois estes atributos são essenciais para a fertilização e estabelecimento de uma prenhez viável (Neild et al., 2005).

Um aspecto importante a se considerar quando da comercialização do sêmen, seja ele refrigerado ou congelado, é o risco de transmissão de doenças através deste material biológico, principalmente quando este transporte é feito entre diferentes países. O ejaculado dos garanhões pode conter agentes infecciosos como bactérias e vírus e estes, são capazes de sobreviver mesmo quando o sêmen é congelado. Assim, é recomendável a realização de exames sanitários para a verificação de quaisquer doenças que possam ser transmitidas (Barbacini, 2005).

Vários trabalhos citam que a utilização de sêmen refrigerado ou congelado reduziria o risco de transmissão de doenças venéreas, associado em geral ao trânsito de animais entre os haras (Ball, 1998b; Squires et al., 1999; Papa et al., 2005). Metcalf (2001) aponta a arterite viral, o exantema coital e a metrite contagiosa eqüina, como doenças que podem ser transmitidas pelo sêmen. Além disso, algumas enfermidades, como a babesiose, podem ser importantes caso o sêmen seja contaminado pelo sangue de um animal infectado. Apesar de não existirem evidências de transmissão venérea, o vírus da anemia infecciosa eqüina é encontrado no ejaculado de animais portadores, sendo também importante a consideração desta doença ao se utilizar sêmen transportado. O autor salienta ainda que os componentes dos diluidores de sêmen, sendo a maioria composta por gema de ovo e/ou leite, devem estar livre de agentes infecciosos quando estes fizerem parte da composição dos meios.

Como forma de se prevenir a transmissão de doenças através do transporte de sêmen Metcalf (2001) sugere que além da adição de antibióticos aos diluidores, devam ser instituídos exames laboratoriais para verificar a presença de possíveis doenças com risco de transmissão,

além de vigilância constante por parte dos responsáveis pela colheita e recebimento dos ejaculados.

Uma combinação de provas laboratoriais deve ser utilizada para aumentar a acurácia ao se predizer a fertilidade do garanhão antes deste ser utilizado como doador de sêmen durante a estação de monta (Neild et al., 2005).

2.4. Taxa de Prenhez do Sêmen Eqüino Refrigerado

A fertilidade de um rebanho é dependente da qualidade do sêmen utilizado na IA. Love et al. (2005) citam que a baixa qualidade seminal contribui para a redução dos índices de fertilidade, além de salientar que o manejo inadequado das éguas pode ser responsável pelas baixas taxas de prenhez e, segundo Pickett e Shiner (1994), os fatores ambientais também devem ser considerados ao se avaliar a eficiência reprodutiva dos animais.

Van der Holst (1984) relatam que o desconhecimento da fisiologia do ciclo estral da égua foi a maior causa de insucesso da IA nos Países Baixos, pois de 330 éguas inseminadas em propriedades particulares na Holanda, a taxa de nascimento foi de apenas 55%, enquanto as IA realizadas em centrais especializadas resultaram em 74% de potros vivos. Da mesma forma, Rota et al. (2004) evidenciaram que sob condições ideais de manejo as taxas de prenhez são maiores, ao compararem os índices de prenhez de éguas submetidas a IA em centrais especializadas ou sob condições de campo, obtendo taxas de prenhez total de 80,6% (n=31) e 52% (n=25), respectivamente.

Jasko et al. (1992c) relatam que taxas de gestação obtidas com sêmen refrigerado por 24 horas são semelhantes às obtidas com sêmen a fresco. Porém, quando este período excede 48 horas, uma redução de cerca de 50% pode ser verificada.

Douglas-Hamilton et al. (1984) utilizando sêmen eqüino refrigerado a 4°C por 6 a 23 horas, inseminaram 46 éguas de diferentes categorias reprodutivas, em dias alternados, até a detecção da ovulação, registrando taxa final de gestação de 91%.

Jasko et al. (1992c) concluíram que taxas de gestação satisfatórias podem ser obtidas através da utilização de diferentes formas de preservação do sêmen, pois não verificaram diferenças nas taxas de prenhez obtidas com sêmen fresco, refrigerado a 4°C por 24 horas e congelado, sendo os índices para cada grupo de 76% (31/41), 65% (54/83) e 56% (23/41), respectivamente.

Avaliando os dados de um número expressivo de éguas (46.556), submetidas a diferentes tipos de acasalamento na Suécia, entre 1990 e 1996, Darenius (1998) pôde verificar

que, a utilização do sêmen refrigerado como método de acasalamento teve um crescimento de 29,37% neste período, quando comparado aos realizados através da MN e sêmen a fresco, que tiveram uma redução de 49,6% e 36,89%, respectivamente. Uma possível explicação para este crescimento seria os bons índices de natalidade obtidos com o sêmen refrigerado, de 68,83%, não diferindo daqueles obtidos com a MN ou sêmen a fresco, de 69,83% e 74,50%, respectivamente, porém, superior aos alcançados pelo sêmen congelado (56,57%).

Revisando a literatura verifica-se que vários índices podem ser utilizados para avaliar a eficiência reprodutiva dos eqüinos submetidos a IA, quando diferentes métodos de preservação do sêmen são utilizados, tais como: taxa de natalidade, taxa de prenhez por ciclo, taxa de recuperação embrionária, etc (Quadro 1).

Amann (2005) ao analisar alguns trabalhos publicados nos anais do 8th *International Symposium on Equine Reproduction* (n = 25) e todos os artigos, referentes a mamíferos, do volume 60 da *Theriogenology* (n = 42), constatou que 76% (51/67) eram falhos. Alerta, portanto, que é preciso cautela na interpretação dos resultados de fertilidade, pois muitos trabalhos ignoram o delineamento experimental e o impacto estatístico na interpretação dos dados. Quando não é detectada diferença estatística, muitos desconsideram o reduzido número de fêmeas e/ou machos utilizados e, no caso específico dos machos, é ignorada a real fertilidade das fêmeas.

Concluindo, a utilização da IA com sêmen refrigerado é permitida, no Brasil, pela maioria das associações de raça, possibilitando ampliar o uso de garanhões geneticamente superiores, fato que tem feito crescer o interesse dos criadores por esta biotécnica, sendo o segundo país no mundo que mais realiza IA com sêmen eqüino refrigerado. Adequadas taxas de refrigeração e temperatura final de estocagem, que garantam um maior tempo de preservação do ejaculado, têm sido tema de muitas pesquisas há vários anos. Para isso, diferentes equipamentos e meios diluidores vêm sendo desenvolvidos e comercializados em muitos países. O acompanhamento do ciclo estral da égua é fundamental para a determinação do momento e frequência da IA, manejo este que pode reduzir os custos dos programas de IA, principalmente quando existe o transporte de material biológico. Além disso, o estabelecimento de volume e concentração da dose inseminante adequados são fatores primordiais para a obtenção de boas taxas de prenhez, devendo-se considerar ainda os aspectos ligados à variação individual entre garanhões.

Quadro 1. Eficiência reprodutiva de eqüinos submetidos à inseminação artificial (IA) com sêmen a fresco, refrigerado e congelado

Autor(es)	Método de preservação	Temperatura de estocagem	Tempo de estocagem	Concentração espermática	Volume da dose inseminante	Frequência das IA	Diluidor	Índice de eficiência reprodutiva
Jasko et al. (1992c)	Sêmen fresco	Ambiente	Até 60' pós-colheita	600 x 10 ⁶ totais	---	Dias alternados	Leite desnatado - Glicose	76% (n=41) Taxa de prenhez /ciclo
Klug (1992)	Sêmen fresco	Ambiente	---	---	---	---	Kenney et al. (1975) ou Glicina- gema	67,1% Taxa de natalidade
Ferreira (1993)	Sêmen fresco	Ambiente (28-30°C)	Até 60' pós-colheita	250 x 10 ⁶ viáveis	---	Dias alternados	Gema de ovo	83% (n=29) Taxa de prenhez /ciclo
Mattos (1995)	Sêmen fresco	Ambiente	Até 60' pós-colheita	500 x 10 ⁶ totais	20 ml	Dias alternados	Leite desnatado sem glicose	75,7% (n=29) Taxa de prenhez /ciclo
Gahne et al. (1998)	Sêmen fresco	Ambiente	---	500 x 10 ⁶ viáveis	---	---	---	64% (n=32) Taxa de prenhez /ciclo
Gahne et al. (1998)	Sêmen fresco	Ambiente	---	300 x 10 ⁶ viáveis	---	---	---	75% (n=32) Taxa de prenhez /ciclo
Brandão et al. (2003)	Sêmen fresco	37°C	Até 60' pós-colheita	200 x 10 ⁶ viáveis	10 ml	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	66,70% (n=30) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Brandão et al. (2003)	Sêmen fresco	37°C	Até 60' pós-colheita	400 x 10 ⁶ viáveis	10 ml	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	65,50% (n=29) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Douglas-Hamilton et al. (1984)	Sêmen refrigerado	4°C	6-23 h	1,0 -1,5 x 10 ⁹ totais	---	1,6 IA por ciclo estral	Kenney et al. (1975)	65% (n=46) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Heiskanen et al. (1987)	Sêmen refrigerado	5-7°C	24 h	---	---	---	Kenney et al. (1975)	82% (n=11) Taxa de prenhez ao 1º ciclo

*OV- Ovulação

** - Junção útero-tubárica

Quadro 1. Eficiência reprodutiva de eqüinos submetidos à inseminação artificial (IA) com sêmen a fresco, refrigerado e congelado

Autor(es)	Método de preservação	Temperatura de estocagem	Tempo de estocagem	Concentração espermática	Volume da dose inseminante	Frequência das IA	Diluidor	Índice de eficiência reprodutiva
Heiskanen et al. (1987)	Sêmen refrigerado	5-7°C	24 h	---	---	---	Kenney et al. (1975) - Hepes e Teofilina	70% (n=10) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Jasko et al. (1992c)	Sêmen refrigerado	4°C	24 horas	600 x 10 ⁶ totais	---	Dias alternados	Leite desnatado-Glicose	65% (n=83) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Ferreira (1993)	Sêmen refrigerado	4-6°C	24 horas	250 x 10 ⁶ viáveis	---	Dias alternados	Gema de ovo	80% (n=30) Taxa de prenhez/ciclo
Ferreira (1993)	Sêmen refrigerado	4-6°C	48 horas	250 x 10 ⁶ viáveis	---	Dias alternados	Gema de ovo	76% (n=29) Taxa de prenhez/ciclo
Heiskanen et al. (1994)	Sêmen refrigerado	---	41±6 h	1,5 -2,0 x 10 ⁹ totais	40 ml	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	87% (n=15) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Heiskanen et al. (1994)	Sêmen refrigerado e centrifugado	---	41±6 h	1,5 -2,0 x 10 ⁹ totais	40 ml	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	60% (n=15) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Mattos (1995)	Sêmen refrigerado	4°C	24 h	500 x 10 ⁶ totais	20 ml	Dias alternados	Leite desnatado sem glicose	58,6% (n=29) Taxa de prenhez /ciclo
Valle et al. (1999)	Sêmen refrigerado	14°C	215 minutos	400 x 10 ⁶ viáveis	15 ml	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	56% (n=100) Taxa de prenhez /ciclo
Zidane et al. (1991)	Sêmen refrigerado	5°C	48 h	500 x 10 ⁶ viáveis	20 ml	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	40,5% (n=37) Taxa de recuperação embrionária
Zidane et al. (1991)	Sêmen refrigerado	20°C	48 h	500 x 10 ⁶ viáveis	20 ml	Dias alternados	Kenney et al. (1975)	14,3% (n=14) Taxa de recup. embrionária

*OV- Ovulação

** - Junção útero-tubárica

Quadro 1. Eficiência reprodutiva de eqüinos submetidos à inseminação artificial (IA) com sêmen a fresco, refrigerado e congelado

Autor(es)	Método de preservação	Temperatura de estocagem	Tempo de estocagem	Concentração espermática	Volume da dose inseminante	Frequência das IA	Diluidor	Índice de eficiência reprodutiva
Nunes et al. (2004a)	Sêmen refrigerado	15-20°C	24 h	300 x 10 ⁶ viáveis	40 ml	Única - com indução OV*	Kenney et al. (1975)	71,42% (n=35) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Jasko et al. (1992c)	Sêmen congelado	---	---	800 x 10 ⁶ totais	---	Diária	---	56% (n=41) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Squires et al. (2003)	Sêmen congelado	---	---	250 x 10 ⁶ totais	---	Única pós-ovulação	---	83,3% (n=18) Taxa de prenhez total
Squires et al. (2003)	Sêmen congelado	---	---	250 x 10 ⁶ totais	---	24 e 40 h após indução OV	---	86,6% (n=30) Taxa de prenhez total
Carvalho et al. (2004)	Sêmen congelado	---	---	150 x 10 ⁶ viáveis	---	Única pós-OV	Martin et al. (1979)	33,33% (n=15) Taxa de prenhez 1º ciclo
Carvalho et al. (2004)	Sêmen congelado	---	---	300 x 10 ⁶ viáveis	---	Única pós-OV	Martin et al. (1979)	66,7% (n=15) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Ferreira et al. (2005)	Sêmen congelado	---	---	800 x 10 ⁶ totais	---	Única pós-OV	Botu-crio®	43% (n = 21) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Nunes et al. (2004b)	Sêmen congelado	---	---	100 x 10 ⁶ viáveis (JUT**)	1 ml	Única pós-OV	---	61,11% (n=18) Taxa de prenhez total
Barbacini (2005)	Sêmen congelado	---	---	---	---	Diária	---	54% (n=446 éguas) Taxa de prenhez/ciclo

*OV- Ovulação

** - Junção útero-tubárica

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**. 1.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. cap.11, p.354-378.

ALLEN, W. E. The use of hormones in the control of reproductive function in the mare. **Equine Practice**, p.55-60, 1984.

AMANN, R.P. Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. **Theriogenology**, v.63, p.698-715, 2005.

AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON AO., VOSS JL. **Equine reproduction**, 1.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap.80, p.715-745.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v.89, n.1-4, p.65-75, 2005.

BACKMAN, T., BRUEMMER, J.E., GRAHAM, J.K., SQUIRES, E.L. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.690-694, 2004.

BALL, B.A. An introduction to the use and application of cryopreserved equine semen. In: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, 1998, Davis. **Proceedings...**Davis, 1998a. p.25-41.

BALL, B.A. Evaluation and use of transported equine semen. In: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, 1998, Davis. **Proceedings...**Davis, 1998b. p.18-24.

BALL, B.A. Hysteroscopic and low-dose insemination techniques. In: Congresso Nazionale Multisala Sive, 11, 2005, Pisa. **Proceedings...**Pisa, 2005. 3p. Disponível em: <http://www.evsre.it/vet.journal/scheletrooutput_ricerca.php>. Acesso em: 20 set. 2005.

BALL, B.A., MEDINA, V., GRAVANCE, C.G., BAUMBE, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**, v.56, n.4, p.577-89, 2001.

BARBACINI, S. Quality standards in production and use of frozen semen. In: Congresso Nazionale Multisala Sive, 11, 2005, Pisa. **Proceedings...Pisa**, 2005. 3p. Disponível em: <http://www.evsre.it/vet.journal/scheletrooutput_ricerca.php>. Acesso em: 20 set. 2005.

BARTH, A.D., OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. 1 ed. Iowa Ames: Iowa State University Press / Ames, 1989, 285p.

BATELLIER, F., MAGISTRINI, M., FAUQUANT, J., PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.48, n.3, p.391-410, 1997.

BATELLIER, F., VIDAMENT, M., FAUQUANT, J., DUCHAMP, G., ARNAUD, G., YVON, J.M., MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Anim. Reprod. Sci.**, v.68, n.3-4, p.181-190, 2001.

BOE-HANSEN, G.B., ERSBOLL, A.K., GREVE, T., CHRISTENSEN, P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. **Theriogenology**, v.63, p.2006-2019, 2005.

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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.55, n.1, p.61-67, 2003.

BRINSKO, S.P., CROCKETT, E.C., SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, p.129-136, 2000a.

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, 2000b.

BRINSKO, S.P., VARNER, D.D., LOVE, C.C., BLANCHARD, T.L., DAY, B.C., WILSON, M.E. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v.63, p.1519-1527, 2005.

BRUEMMERT, 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. **J. Anim. Sci.**, v.80, n.1, p.12-18, 2002.

CARVALHO, G.R., SILVA FILHO, J.M., LIMA, M.C.C., OLIVEIRA, H.N., PALHARES, M.S. Efeito de diferentes concentrações espermáticas sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen eqüino diluído, resfriado a 20°C e transportado. **Rev. Bras. Zootec.**, v.27, n.4, p.695-699, 1998.

CARVALHO, G.R., FURST, R., LEITE, P.G., RESENDE, F.D., OLIVEIRA, J.V., LOURENÇO, G.G. Avaliação da fertilidade do sêmen eqüino resfriado a 6°C antes do congelamento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. **Anais...**Campo Grande, 2004. CD-Rom, MR061. 4p.

CHENG, F.P., GADELLA, B.M., VOORHOUT, W.F., FAZELI, A., BEVERS, M.M., COLENBRANDER, B. Progesterone induced acrossome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. **Biol. Reprod.**, v.59, p.733-742, 1998.

DARENIUS, A. Experiences with chilled, transported equine semen. In: STALLION REPRODUCTION SYMPOSIUM, 1998, Society for Theriogenology - American Association of Equine Practitioners. **Proceedings...**1998, p.60-70.

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.

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.

FERREIRA, C.S., DE PAULA, F.A.L., NUNES, D.B., COSTA E SILVA, E.V., ZÚCCARI, C.E.S.N. Taxa de prenhez de éguas mestiças Quarto de Milha submetidas a diferentes protocolos de sincronização de cio. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, Campo Grande. **Anais...**Campo Grande, 2005. CD-Rom. 5p.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolks and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.49, p.277-284, 1977.

FUNAHASHI, H., SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored a 10°C. **Theriogenology**, v.63, p.1605-1616, 2005.

GAHNE, S., GANHEIM, A., MALMGREN. Effect of insemination dose on pregnancy rate in mares. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.1071-1074, 1998.

GARNER, D.L., HAFEZ, E.S.E. Espermatozóide e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 7. ed. Kiawah Island: Manole Ltda, 2004. cap.7, p.97-110.

GOULART, H.M., SILVA, A.E.D.F., MCMANUS, C., PAPA, F.O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade in vitro dos espermatozóides de eqüinos, após o resfriamento a 5°C. **Rev. Bras. Zootec.** v.33, n.1, p. 112-122, 2004.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North Am.*: **Eq. Prac.**, v. 12, p. 131-147, 1996.

GÜVENC, K., REILAS, T., KATILA, T. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. **Theriogenology**, v.63, p.2504-2512, 2005.

HAFEZ, E.S.E. Transporte e sobrevivência de gametas. In: _____. **Reprod. Anim.**, 7 ed. Barueri: Manole Ltda, 2004. cap.6, p.83-96.

HEISKANEN, M.L., PIRHONEN A., KOSKINEN, E., MAENPAA, P.H. Motility and ATP content of extended equine spermatozoa in different storage conditions. **J. Reprod. Fertil.**, v.35, p.103-107, 1987.

HEISKANEN, M.L., HUHTINEN, M., PIRHONEN, A., MAENPAA, P.H. Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. **Acta. Vet. Scand.**, v.35, n.3, p.257-262, 1994.

HEITLAND, A.V., JASKO, D.J., GRAHAM, J.K., SQUIRES, E.L., AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Motility and fertility of stallion spermatozoa cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. **Biol. Reprod.**, v.1, p.753-759, 1995.

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...**1992c, v.3, p.1439-1441.

KANKOFER, M., KOLM, G., AURICH, J., AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.63, p.1354-1365, 2005.

KATILA, T. Sperm-uterine interactions: a review. **Anim. Reprod. Sci.**, v.68, n.3-4, p.267-272, 2001.

KAYSER, J.P., AMANN, R.P., SHIDELER, R.K. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, n.4, p.601-614, 1992.

KENNEY, R.M., BERGMAN, R.V., COOPER, W.L. Minimal contamination techniques and preliminary findings. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 21, 1975, **Proceedings...**, 1975, p.327-336.

KENNEY, R.M., EVENSON, D.P., GARCIA, M.C., LOVE, C.C. Relationship between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. **Biol. Reprod. Mono.**, v.1, p.647-653, 1995.

KLUG, E. Routine AI application in the Hannoverian Sport Horse Breeding Association. **Anim. Reprod. Sci.**, v.28, n.1-4, p.39-44, 1992.

LINDSEY, A.C., VARNER, D.D., SEIDEL JR., G.E., BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18h at either 5°C or 15°C prior to flow-cytometric sorting. **Anim. Reprod. Sci.**, v.85, p.125-130, 2005.

LIPAR, J.L., KETTERSON, E.D., NOLAN, V.J.R., CASTO, J.M. Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.115, n.2, p.220-227, 1999.

LOVE, C.C., THOMPSON, J.A., LOWRY, V.K., VARNER, D.D. The relationship between chromatin quality and fertility of chilled stallion sperm. In: AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 47, 2001, San Diego. **Proceedings...San Diego**, v.47, 2001. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2001/91010100229.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2005.

LOVE, C.C., BRINSKO, S.P., RIGBY, S.L., THOMPSON, J.A., BLANCHERD, T.L., VARNER, D.D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v.63, p.1584-1591, 2005.

LYLE, S.K., FERRER, M.S. Low-dose insemination - Why, when and how. **Theriogenology**, v.64, p.572-579, 2005.

MALMGREN, L. Effectiveness of two systems for transporting equine sêmen. **Theriogenology**, v.50, p.833-839, 1998.

MATTOS, R.C. **Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen eqüino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana.** 1995. 114p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, 1995.

METCALF, E.S. Pregnancy rates with cooled equine semen received in private practice. In: AMERICAN ASSOCIATIONS EQUINE PRACTITIONERS, 44, 1998, Baltimore. **Proceedings...**Baltimore, 1998. p.16-18.

METCALF, E.S. The role of international transport of equine semen on disease transmission. **Anim. Reprod. Sci.**, v.68, p.229-237, 2001.

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.

MORAN, D.M., JASKO, D.J., SQUIRES, E.L., AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, n.6, p.999-1012, 1992.

MORRIS, L.H.A., ALLEN, W.R. An overview of low dose insemination in the mare. **Reprod. Dom. Anim.**, v.37, p.206-210, 2002.

NEILD, D.N., GADELLA, B.M., AGÜERO, A., STOUT, T.A.E., COLENBRANDER, B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, v.89, n.1-4, p.47-56, 2005.

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, 2004a. CD-Rom, MR035. 3p.

NUNES, D.B., ZÚCCARI, C.E.S.N., 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, 2004b. CD-Rom, MR036. 3p.

PADILLA, A.W., FOOTE, R.H. Extender and centrifugation effects on the motility patters of slow-cooled stallion spermatozoa. **J. Anim. Sci.**, v.69, p.3308-3313, 1991.

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 congelamento de sêmen eqüino. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 19, 2005, Angra dos Reis. **Anais...**Angra dos Reis, 2005. p.19-27.

PARKS, J.E., LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v.29, n.2, p.255-66, 1992.

PICKETT, B.W., AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Equine Veterinary Science**, 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.

POMMER, A.C., LINFOR, J.J., MEYERS, S.A. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. **Theriogenology**, v.57, n.5, p.1493-1501, 2002.

PROVINCE, C.A., SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W., AMANN, R.P. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.23, n.6, p.925-934, 1985.

ROTA, A., FURZI, C., PANZANI, D., CAMILLO, F. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. **Reprod. Domest. Anim.**, v.39, n.2, p.103-9, 2004.

SHORE, M.D., MACPHERSON, M.L., COMBES, G.B., VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L. Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. **Theriogenology**, v.50, n.5, p.693-698, 1998.

SIEME, H., BONK, A., HAMANN, H., KLUG, E., KATILA, T. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. **Theriogenology**, v.62, n.5, p.915-928, 2004.

SILVA FILHO, J.M., PALHARES, M.S., FONSECA, F.A. Transporte e inseminação artificial com sêmen de eqüino. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG**, Belo Horizonte, n.11, p.3-112, 1994.

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, 35, 1989, Boston. **Proceedings...** Boston: American Association of Equine Practitioners, 1989. p.25-30.

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.

SQUIRES, E.L., BARBACINI, S., NECCHI, D., REGER, H.P., BRUEMMER, J.E. Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 49, 2003, New Orleans. **Proceedings...** New Orleans, 2003. Disponível em: <http://www.ivis.org/procedings/AAEP/2003/squires/charppter_frm.asp?LA=1>. Acesso em: 13 fev. 2004.

STRADAIOLI, G., SYLLA, L., ZELLI, R., VERINI SUPPLIZI, A., CHIODI, P., ARDUINI, A., MONACI, M. Seminal carnitine and acetylcarnitine content and carnitine acetyltransferase activity in young Maremmno stallions. **Anim. Reprod. Sci.**, v.64, n.3-4, p.233-245, 2000.

STRYER, L. Introdução ao estudo das membranas biológicas. In: _____. **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 12, p. 230-256.

SUAREZ, S.S. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. **Biol. Reprod.**, v. 8, p.1005-1107, 1998.

TEKIN, N., WOCKENER, A., KLUG, E. Konservierungsfähigkeit von Pferdesamen bei Einsatz zweier Verdüner und Konservierungstemperaturen. **Dtsch. Tierarztl. Wschr.**, v.96, n.5, p.258-265, 1989.

TROEDSSON, M.H. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v.52, n.3, p.461-471, 1999.

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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 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. **Rev. Bras. Zootec.**, v.29, p.1721-1726, 2000.

VAN DER HOLST. De huidige em de toekomstige ontwikkeling van de k.i. bij paarden in nederland. **Vlaams Diergenee Skunding Tijdschrift**, v.53, p.302-307, 1984.

VARNER, D.D. Technical considerations for cool transported equine semen. In: CONGRESSO NAZIONALE MULTISALA SIVE, 9, 2003, Pisa. **Proceedings**...Pisa, 2003. Disponível em: <http://www.evsre.it/vet.journal/scheletro_output_ricerca.php>. Acesso em: 20 set. 2005.

VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.L., GARCIA, M.C., KENNEY, R.M.. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.29, p.1043-1053, 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.

ZIDANE, N., VAILLANCOURT, P., GUAY, P., POITRAS, P., BIGRAS-POULIN, M. Fertility of fresh equine semen preserved for up to 48 hours. **J. Reprod. Fert.**, (suppl.44), p.644, 1991.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998. 121p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu - SP, 1998.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

EFICIÊNCIA DO *CONTAINER* CP PARA REFRIGERAÇÃO E PRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQÜINO A 2,0°C POR 24 E 48 HORAS

D.B. Nunes^a, J.R. Zorzatto^b, E.V. Costa e Silva^c, C.E.S.N. Zúccari^d

^a*Mestranda em Ciência Animal / UFMS - Campo Grande, MS, Bolsista do CNPq*

^b*Departamento de Computação e Estatística / UFMS, Campo Grande, MS, Brasil*

^c*Departamento de Medicina Veterinária / UFMS, Campo Grande, MS, Brasil*

^d*Departamento de Zootecnia / UFMS – Campo Grande, MS, Brasil*

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi verificar a eficiência do *container* (CP) para refrigerar o sêmen eqüino a 2,0°C por até 48 horas. **Experimento 1** - determinada a taxa de refrigeração do CP1, 24 ejaculados de seis garanhões foram fracionados e estocados por 24 horas no CP1 e no EquitainerTM (EQ) - controle. Avaliou-se motilidade, pré-refrigeração (M-0) e pós-24 horas (M-24). Utilizou-se o teste de Wilcoxon para dados emparelhados ($\alpha=5\%$). As taxas médias de refrigeração após 30 e 60 minutos foram, respectivamente, de -0,36°C/min. e -0,35°C/min. (n=5). A motilidade foi superior para EQ-M24 ($p<0,05$). **Experimento 2** - no CP2 foram processados dez ejaculados de um garanhão, avaliando-se

(fatorial 2x2) dois volumes (50/100 ml) e duas concentrações espermáticas (500/750 x10⁶), durante 24 e 48 horas (M-48), substituindo-se o sistema de refrigeração no M-24. Foram estudados o tempo, volume e concentração, comparando-se os tratamentos, dois a dois, pelo teste de Wilcoxon para dados emparelhados ($\alpha=5\%$). A motilidade diferiu entre tratamentos ($p<0,05$) às 24 horas, sendo T1>T2 e T1>T3, não diferiu no M-48, contudo diferindo entre M-24 e M-48. O número de espermatozóides com membrana plasmática íntegra não diferiu entre tratamentos nem entre M-0 e M-24, contudo, M-48 diferiu de M-0 nos tratamentos 1 e 4 sendo igual entre M-24 e M-48. **Experimento 3** – Foram utilizados 13 ejaculados de um garanhão para avaliar por quanto tempo o CP2 era eficiente para manter uma motilidade mínima de 30%. Analisou-se a motilidade e número de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, pré-refrigeração e às 24, 36, 42 e 48 horas pós-refrigeração. Utilizou-se a estatística descritiva. No M-24 todas as amostras apresentaram motilidade >30%. Aproximadamente 70% (9/13) delas tiveram motilidade >30%, às 42 horas. **Experimento 4** – Foram utilizados 10 ejaculados de dois garanhões, avaliando-se motilidade, número de espermatozóides com membrana plasmática íntegra e taxa de prenhez ao 1º ciclo de 26 éguas, inseminadas com sêmen preservado no CP2 por 24 horas. A taxa de prenhez ao 1º ciclo foi de 69,23% (18/26). **Experimento 5** - Foram processados 12 ejaculados de dois garanhões, avaliando-se motilidade, número de células com membrana plasmática íntegra e taxa de prenhez ao 1º ciclo de 13 éguas, inseminadas com o sêmen preservado no CP2 por 48 horas. A taxa de prenhez ao 1º ciclo foi de 69,23% (9/13). CP1 e CP2 apresentaram satisfatórias taxas de refrigeração e preservação seminal e, após 24 e 48 horas no CP2 bons índices de fertilidade foram obtidos.

Palavras-chave: espermatozóide, garanhão, sêmen refrigerado, *container*, motilidade, fertilidade

Abstract

The aim of this paper is to verify the efficiency of the *container* (CP) to cool the equine semen at 2,0°C for up to 48 hours. **Experiment 1** – After determining the CP1 cooling rate, 24 ejaculates of six stallions were fractionated and stored for 24 hours in CP1 and in Equitainer™ (EQ) - control. The motility pre-cooling (M-O) and post-24 hours (M-24) was evaluated. The Wilcoxon test for two related samples was used ($\alpha=5\%$). The mean cooling rates after 30 and 60 minutes was, respectively, -0,36°C/min. and -0,35°C/min. (n=5). The motility was higher for EQ-M24 ($p<0,05$). **Experiment 2** - In CP2, 10 ejaculates of a stallion were processed, evaluating (factorial 2x2) two volumes (50/100 ml) and two sperm concentrations ($500/750 \times 10^6$), for 24 and 48 hours (M-48), substituting the cooling system in M-24. Time, volume and concentration were studied, and the treatments were compared, two by two, by the Wilcoxon test for two-related samples ($\alpha=5\%$). Motility differed between treatments ($p<0,05$) at 24 hours, being $T1>T2$ and $T1>T3$; it did not differ at M-48, but differed between M-24 and M-48. The number of sperm membrane integrity did not differ either between treatments or between M-0 and M-24; however M-48 differed from M-0 in treatments 1 and 4, remaining equal between M-24 and M-48. **Experiment 3** – 13 ejaculates of a stallion were used to evaluate for how long the CP2 was efficient to keep a minimal motility of 30%. Motility and sperm membrane integrity at pre-cooling and at post-cooling (24, 36, 42 and 48 hours) were analyzed. Descriptive statistics was used. At M-24 all samples presented motility $>30\%$. Approximately 70% (9/13) of them had motility $>30\%$ at 42 hours. **Experiment 4** – 10 ejaculates of two stallions were used, evaluating motility, sperm membrane integrity and pregnancy rates at the 1st cycle of 26 mares inseminated with preserved semen in CP2 for 24 hours. The pregnancy rate at 1st cycle was 69,23% (18/26). **Experiment 5** – 12 ejaculates of two stallions were processed, evaluating motility, sperm membrane integrity and pregnancy rate at 1st cycle of 13 mares inseminated with the

preserved semen in CP2 for 48 hours. Pregnancy rate at 1st cycle was 69,23% (9/13). CP1 and CP2 presented satisfactory cooling and seminal preservation rates and, after 24 and 48 hours in CP2, good fertility rates were obtained.

Key words: spermatozoa, stallion, cooled semen, container, motility, fertility

1. Introdução

A utilização do sêmen refrigerado tornou-se rotina por permitir o acasalamento de animais alojados em diferentes propriedades, facilitando a formação dos condomínios de garanhões, além de otimizar o uso de reprodutores de alto valor genético, dispensar o trânsito de reprodutoras e seus produtos, reduzir a transmissão de doenças venéreas, eliminar o risco de acidentes durante as coberturas e proporcionar índices de fertilidade semelhantes aos obtidos com a monta natural (MN) ou inseminação artificial (IA) com sêmen fresco (Squires et al., 1999).

Pesquisas recentes apontam à possibilidade da congelação do sêmen de garanhões que estão distantes das centrais de reprodução, através do envio do ejaculado refrigerado por até 24 horas para posterior congelação (Papa et al., 2005). Além disso, Lindsey et al. (2005) obtiveram 72% de prenhez ao 1º ciclo, com IA de 25 éguas utilizando sêmen eqüino sexado, previamente refrigerado.

A manutenção dos componentes estruturais e funcionais dos espermatozoides durante a refrigeração e transporte do sêmen é essencial para o processo de fertilização. Entretanto, ao submeter o sêmen à refrigeração devem ser considerados alguns fatores tais como: suscetibilidade do espermatozóide ao choque térmico, variação individual entre garanhões,

qualidade dos diluentes, taxa de refrigeração, temperatura final de armazenamento e equipamento utilizado para o transporte.

Quando a amostra seminal é submetida a condições ideais de refrigeração, além de manter a integridade estrutural e funcional dos gametas, há redução da atividade metabólica com aumento da longevidade celular, sem detrimento da fertilidade.

O objetivo do presente trabalho foi testar a eficiência de dois *containers* (CP1 e CP2) para a refrigeração e preservação do sêmen equino e sua fertilidade após armazenamento por 24 e 48 horas.

2. Materiais e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido durante duas estações de monta, na Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, localizada no município de Terenos / MS, tendo como coordenadas geográficas os paralelos de 20°25'39,72" de latitude sul e 54°51'24,96" de longitude oeste de Greenwich e altitude de 389,23 metros.

Foram desenvolvidos cinco experimentos, três *in vitro* e dois *in vivo*, para testar a eficiência dos *containers* CP1 e CP2 para a refrigeração e preservação do sêmen equino a 2°C por períodos de 24 e 48 horas.

Foram usados garanhões da raça Pantaneira, com idade entre de 8 e 11 anos, de fertilidade conhecida, após a estabilização das reservas espermáticas extragonadais. As colheitas de sêmen, com vagina artificial modelo "Botucatu", foram feitas com o auxílio de égua em cio e/ou manequim. Nos experimentos 4 e 5 as éguas foram selecionadas, por exame ginecológico através de palpação retal e rufiação diária individual, quanto ao estágio do ciclo estral, sendo o cio induzido através da aplicação intramuscular de 5 mg de Dinoprost

Trometamina (Lutalyse^{®1}). Após o 4^o dia da aplicação da segunda dose da prostaglandina F₂ α , iniciava-se a rufiação e o controle folicular diário. A IA era realizada ao ser detectado um folículo ovariano com diâmetro ≥ 40 mm e a ovulação era induzida pela aplicação endovenosa de 3.000 U.I. de gonadotrofina coriônica humana (hCG - Pregnyl^{®2}) no dia da IA. Para a IA a amostra seminal era homogeneizada, sem aquecimento prévio, e transferida para seringas sendo depositada no corpo do útero. O diagnóstico de gestação foi realizado por palpação retal aos 20 dias e confirmado aos 30 e 45 dias pós-ovulação.

Experimento 1

Para a refrigeração e preservação do sêmen equino sob refrigeração por 24 horas foi montado um *container* (CP1) a partir de uma caixa isotérmica quadrada de 25,5 x 19,5 cm (altura x largura) e 2,5 cm de espessura. A refrigeração do sistema foi feita por cinco bombonas plásticas recicláveis de 13,8 x 9,8 x 5,0 cm (comprimento x largura x espessura). O sêmen foi estocado em recipiente cilíndrico de vidro, revestido externamente por espuma de 2,0 cm de espessura e acondicionado em copo isotérmico com 0,5 cm de espessura (Figura 1).

Para o estabelecimento da taxa de refrigeração a haste de um termômetro digital, modelo Ioptherm 46[®], foi inserida nas amostras seminais (n=5) e após o *container* (CP1) ser lacrado foram feitas leituras seriadas da temperatura a cada 10 minutos durante as primeiras seis horas e a cada 30 minutos até às 24 horas.

Foram processados 24 ejaculados de seis garanhões. Após as colheitas, o sêmen foi filtrado e diluído em meio de mínima contaminação (Kenney et al., 1975) a uma taxa de diluição fixa de 3:1 (diluidor:sêmen).

¹Upjhon Produtos Farmacêuticos

²Organon



Figura 1. Componentes do CP1 - bombonas plásticas recicláveis, recipiente cilíndrico de vidro para armazenamento do sêmen e copo isotérmico preenchido internamente por espuma.

A amostra de sêmen foi fracionada e estocada por 24 horas no CP1 e no Equitainer™ (EQ) - sistema comercial americano utilizado como controle (Douglas-Hamilton et al., 1984).

Foi avaliada a motilidade progressiva (%) nos momentos pré-refrigeração (M-0) e 24 horas pós-refrigeração no CP1 (CP1-M24) e no EQ (EQ-M24). Antes da avaliação da variável procedeu-se o aquecimento de 5 ml da amostra seminal a 38°C por 10 minutos.

A análise estatística foi feita através do teste de Wilcoxon para dados emparelhados para avaliar os valores medianos. Para efeito de rejeição da hipótese de nulidade utilizou-se $\alpha=5\%$ (Zar, 1984).

Experimento 2

Avaliou a influência de diferentes concentrações espermáticas e do volume total na preservação do sêmen equino refrigerado por 48 horas.

O *container* CP1 conferiu satisfatória preservação do sêmen equino por 24 horas, entretanto, em virtude da caixa isotérmica não ser comercialmente acessível, a mesma foi substituída por outra similar, idealizando-se outro *container* (CP2) (Figura 2) com os mesmos objetivos.



Figura 2. Descrição detalhada do *container* CP2: caixa isotérmica retangular em isopor com as seguintes dimensões internas (em centímetros): comprimento 25,0; largura 17,1; altura 20,4 e parede externa com espessura de 1,6 cm. O modelo é equipado internamente com cinco unidades de gelos recicláveis contidos em bombonas plásticas com as seguintes medidas, em centímetros, comprimento 13,8; largura 9,8; espessura 5,0, dispostas de maneira a circundar uma caixa cilíndrica também de isopor, em formato de copo cujas dimensões internas, em centímetros, são as seguintes: diâmetro 7,0; e altura 9,8, sendo sua parede externa de 1,0 cm de espessura, sendo que, dentro deste copo de isopor, envolvida por uma manta de espuma, fica contido o recipiente cilíndrico de vidro, onde é armazenado o sêmen - Patente: Modelo de utilidade n. 000037, INPI/MS, 24 de Janeiro de 2003.

Para o estabelecimento da taxa de refrigeração a haste de um termômetro digital, modelo Ioptherm 46[®], foi inserida nas amostras seminais (n=2) e após o *container* (CP2) ser lacrado, foram feitas leituras seriadas da temperatura a cada 10 minutos durante as primeiras seis horas e a cada 60 minutos, até 48 horas, sem a troca do sistema de refrigeração.

Com o intuito de verificar a influência de dois volumes (50 e 100 ml) e duas concentrações espermáticas (500 e 750 x 10⁶) sobre a taxa de refrigeração e a preservação do

sêmen equino armazenado no *container* CP2 durante 48 horas, foram processados dez ejaculados de um garanhão adulto da raça Pantaneira, de fertilidade conhecida.

Após a colheita de sêmen o ejaculado foi fracionado e diluído em meio de mínima contaminação (Kenney et al., 1975), ajustando-se o volume (ml) e a concentração ($\times 10^6$), respectivamente, para os diferentes tratamentos: T1 - 50/500; T2 - 50/750; T3 - 100/500 e T4 - 100/750.

O sêmen foi estocado no CP2 e após 24 horas, o sistema de refrigeração passiva foi substituído e mantido por até 48 horas, sendo estabelecida a curva de refrigeração.

As variáveis analisadas foram: motilidade progressiva (%) e integridade da membrana plasmática, avaliada pela associação de dois corantes supra-vitais, Eosina Y e Nigrosina (Barth e Oko, 1989).

As características seminais foram avaliadas nos momentos pré-refrigeração (M-0), 24 (M-24) e 48 horas (M-48) pós-refrigeração.

O teste de normalidade de Anderson-Darling com $p=0,0000$ rejeitou a normalidade dos dados em todos os momentos. Levando em consideração que os dados não apresentavam distribuição normal, as variáveis são emparelhadas (dependentes) e as variâncias diferentes, a análise de variância paramétrica clássica ficou inviável. Por outro lado, não existe a análise de variância não paramétrica equivalente no caso de três fatores. Desta forma, para a análise dos dados três fatores foram estudados: tempo, volume (50 ou 100 ml) e concentração (500 ou 750×10^6). Compararam-se os tratamentos, dois a dois, em nível de significância de 5%, usando o teste de Wilcoxon para dados emparelhados (Zar, 1984).

Experimento 3

O objetivo deste estudo foi avaliar por quanto tempo o CP2 era eficiente em manter as amostras de sêmen até uma motilidade mínima de 30%.

Utilizou-se 13 ejaculados de um garanhão da raça Pantaneira. Após a colheita do sêmen procedeu-se com sua diluição em meio de mínima contaminação (Kenney et al., 1975), ajustando-se o volume e a concentração para 30 ml e 500×10^6 , respectivamente. Após a diluição o sêmen foi estocado no *container* CP2.

As variáveis analisadas foram: motilidade progressiva (%) e integridade da membrana plasmática, avaliada pela associação de dois fluorocromos, diacetato de carboxifluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP) (Harrison e Vickers, 1990).

As características seminais foram avaliadas nos momentos pré-refrigeração (M-0), 24 (M-24), 36 (M-36), 42 (M-42) e 48 (M-48) horas pós-refrigeração.

Para a apresentação dos dados relativos às variáveis estudadas foi utilizada a estatística descritiva (Zar, 1984).

Experimento 4

Foram processados dez ejaculados de dois garanhões da raça Pantaneira, para avaliar as características seminais e taxa de fertilidade *in vivo* do sêmen equino refrigerado a 2°C por 24 horas.

As colheitas de sêmen foram realizadas 24 horas antes da inseminação artificial (IA) sendo o ejaculado diluído em meio de mínima contaminação (Kenney et al., 1975) a uma taxa de 3:1 (diluidor: sêmen) e posteriormente estocado no CP2.

As variáveis analisadas foram: motilidade progressiva (%) e integridade da membrana plasmática, avaliada pela associação de dois fluorocromos, diacetato de carboxifluoresceína (FDA) e o iodeto de propídio (IP) (Harrison e Vickers, 1990) e, taxa de prenhez ao 1º ciclo.

As características seminais foram avaliadas pré-refrigeração (M-0) e 24 horas pós-refrigeração (M-24).

Para avaliar a taxa de prenhez ao 1º ciclo do sêmen eqüino refrigerado por 24 horas no CP2, foram utilizadas 26 éguas da raça Pantaneira pertencentes a diferentes categorias reprodutivas, com idade média de $9,28 \pm 3,59$ anos, escore corporal médio de $4,10 \pm 0,50$, segundo proposto por Henneke et al. (1983), distribuídas aleatoriamente entre os garanhões.

A concentração média de espermatozóides viáveis na amostra seminal utilizada para IA foi de $650 \pm 125 \times 10^6$ e o volume médio de 45 ± 15 ml.

Para a apresentação dos dados foi utilizada a estatística descritiva (Zar, 1984).

Experimento 5

Mediante os resultados dos experimentos anteriores observou-se que o *container* CP2 foi eficiente na preservação do sêmen eqüino nos diferentes momentos estudados. Desta forma, para avaliar as características seminais e a taxa de prenhez ao 1º ciclo com sêmen eqüino refrigerado por 48 horas no CP2, foram utilizados 12 ejaculados de dois garanhões da raça Pantaneira.

O sêmen foi colhido 48 horas antes da realização da IA, sendo o ejaculado diluído em meio de mínima contaminação (Kenney et al., 1975) a uma taxa de 3:1 (diluidor: sêmen) e, posteriormente estocado no CP2.

As variáveis analisadas foram: motilidade progressiva (%) e integridade da membrana plasmática, avaliada pela associação de dois corantes supra-vitais, a Eosina Y e a Nigrosina (Barth e Oko, 1989) e, taxa de prenhez ao 1º ciclo.

As características seminais foram avaliadas nos momentos pré-refrigeração (M-0), 24 (M-24) e 48 (M-48) horas pós-refrigeração.

Para avaliar a taxa de prenhez ao 1º ciclo do sêmen eqüino refrigerado por 48 horas no CP2, foram utilizadas 13 éguas da raça Pantaneira, sendo sete destinadas ao garanhão A e seis

ao B. As matrizes tinham idade média de $10,45 \pm 3,88$ anos, escore corporal médio de $5,60 \pm 0,70$ (Henneke et al., 1983) e, pertenciam a diferentes categorias reprodutivas.

A concentração média de espermatozóides viáveis na amostra seminal utilizada para IA era de $750 \pm 150 \times 10^6$ e o volume médio de 39 ± 17 ml.

Para a apresentação dos dados foi utilizada a estatística descritiva (Zar, 1984).

3. Resultados

Experimento 1

A temperatura média das amostras de sêmen no momento pré-refrigeração (M-0), 30 e 60 minutos após a estocagem no *container* CP1 foi de $38,4 \pm 2,2$; $27,7 \pm 3,1^\circ\text{C}$ e $17,3 \pm 1,7^\circ\text{C}$, respectivamente (Figura 3). A taxa média de refrigeração nos primeiros 30 minutos foi de $-0,36 \pm 0,02^\circ\text{C}$ e na primeira hora foi de $-0,35 \pm 0,03^\circ\text{C}$. Para o intervalo compreendido entre $21,1^\circ\text{C}$ e $7,9^\circ\text{C}$, a taxa de queda da temperatura foi de $-0,11 \pm 0,03^\circ\text{C}$. A temperatura mais baixa alcançada pela amostra seminal no CP1 foi de $2,1^\circ\text{C}$ após 22 horas e 15 minutos de armazenamento.

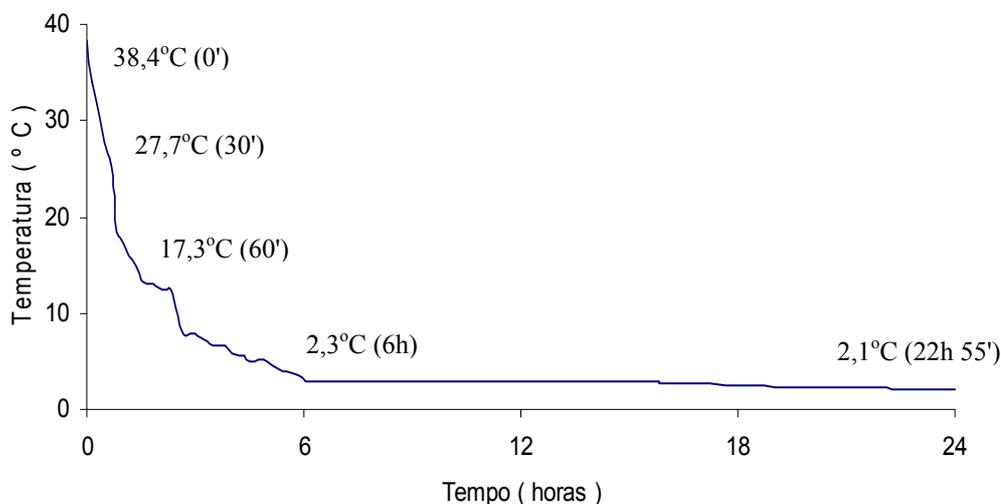


Figura 3. Curva de refrigeração do sêmen armazenado no *container* CP1 em função do tempo.

Observa-se na tabela 1 os valores da média, desvio padrão, mediana, moda, mínimo e máximo para a motilidade progressiva (%).

A análise dos dados mostrou que os valores medianos referentes à motilidade progressiva (%) no momento pré-refrigeração (M-0) foram superiores ($p < 0,05$) aos demais momentos. Na comparação entre o CP1-M24 e EQ-M24, a motilidade progressiva foi superior no tratamento EQ-M24 ($p < 0,05$).

Tabela 1. Estatística descritiva dos valores da motilidade progressiva (%) para o sêmen nos momentos pré-refrigeração (M-0) e após 24 horas nos *containers* CP1 (CP1-M24) e EQ (EQ-M24).

	M-0	CP1-M24	EQ-M24
	Motilidade (%)	Motilidade (%)	Motilidade (%)
Média \pm desvio padrão	72,5 \pm 6,8	47,5 \pm 13,3	50,0 \pm 10,5
Md (Mín.-Máx.)	70 ^A 60-80	45 ^B 30-70	50 ^C 30-70
n	24	24	24

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).

Experimento 2

Durante a etapa de estabelecimento da taxa de refrigeração do CP2 a temperatura média das amostras de sêmen no momento pré-refrigeração (M-0), 35 e 65 minutos foram de $36,5 \pm 1,2$; $27,8 \pm 1,2$ e $21,3 \pm 1,4^\circ\text{C}$, respectivamente (Figura 4). As taxas médias de refrigeração nos primeiros 35 e 65 minutos foram de $-0,25 \pm 0,02^\circ\text{C}$ e $-0,23 \pm 0,01^\circ\text{C}$, respectivamente. Para o intervalo compreendido entre $19,6^\circ\text{C}$ e $7,9^\circ\text{C}$, a taxa de queda da temperatura foi de $-0,081 \pm 0,002^\circ\text{C}$. A temperatura mais baixa alcançada pela amostra, sem a troca do sistema de refrigeração do CP2 foi de $2,0^\circ\text{C}$, atingida após 21 horas e 55 minutos e, 50 horas depois de armazenado o sêmen apresentava uma temperatura de $14,7^\circ\text{C}$.

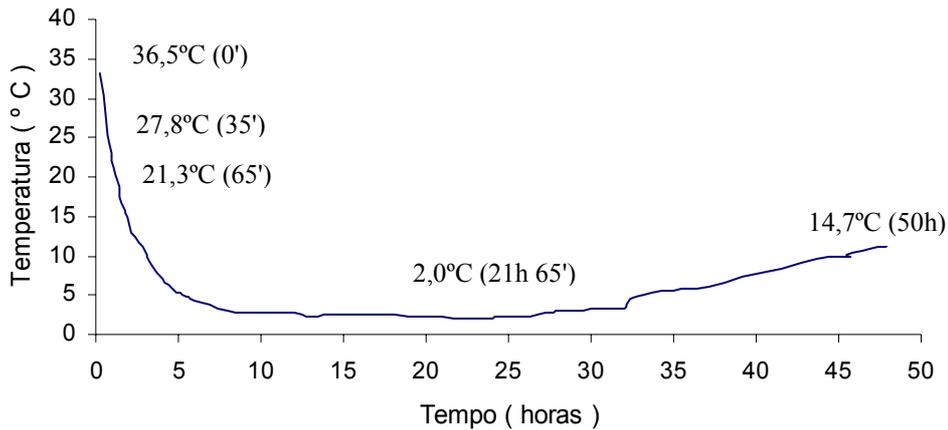


Figura 4. Curva de refrigeração do sêmen armazenado no *container* CP2 em função do tempo.

Observa-se na tabela 2 as taxas de refrigeração dos *containers* CP1 e CP2 nos momentos pré-refrigeração (M-0), 30 (5) e 60 (5) minutos pós-refrigeração e entre aproximadamente 20 e 8°C, além da temperatura mais baixa alcançada pelas amostras seminais durante o período de estocagem sem troca do sistema de refrigeração.

Tabela 2. Taxas de refrigeração em função do tempo, para o intervalo aproximado de 20°C a 8°C e momento em que foi atingida a menor temperatura, para os *containers* CP1 e CP2, sem a troca do sistema de refrigeração.

Momentos (min.)	Taxas de refrigeração (°C)	
	CP1	CP2
CP1 (30) - CP2 (35)	- 0,36 ± 0,02	- 0,25 ± 0,02
CP1 (60) - CP2 (65)	- 0,35 ± 0,03	- 0,23 ± 0,01
Temperatura (°C)	CP1	CP2
CP1 (21,1 - 7,9) CP2 (19,6 - 7,9)	-0,11 ± 0,03	-0,081 ± 0,002
Menor temperatura (tempo)	2,1 (22 h 15 min.)	2,0 (21 h 55 min.)

Para os tratamentos 1, 2, 3 e 4, as taxas médias de refrigeração nos primeiros 30 e 60 minutos são apresentadas na tabela 3. A temperatura mais baixa foi de -3,6°C alcançada pela amostra do tratamento 4 aos 45 minutos após a troca do gelo e para os tratamentos 1, 2 e 3, as temperaturas mais baixas atingidas foram de -3,5°C; -0,2°C; -0,8°C, atingida aos 45 minutos após a troca dos gelos (Figuras 5 e 6).

Tabela 3. Taxa média de refrigeração do sêmen equino aos primeiros 30 e 60 minutos segundo diferentes volumes e concentrações.

Tratamentos (ml / x 10 ⁶)	Taxa de refrigeração (°C)	
	30 minutos	60 minutos
50 / 500	-0,43 ± 0,01°C	-0,30 ± 0,03°C
50 / 750	-0,45 ± 0,02°C	-0,34 ± 0,03°C
100 / 500	-0,27 ± 0,01°C	-0,22 ± 0,01°C
100 / 750	-0,20 ± 0,03°C	-0,17 ± 0,03°C
n	5	5

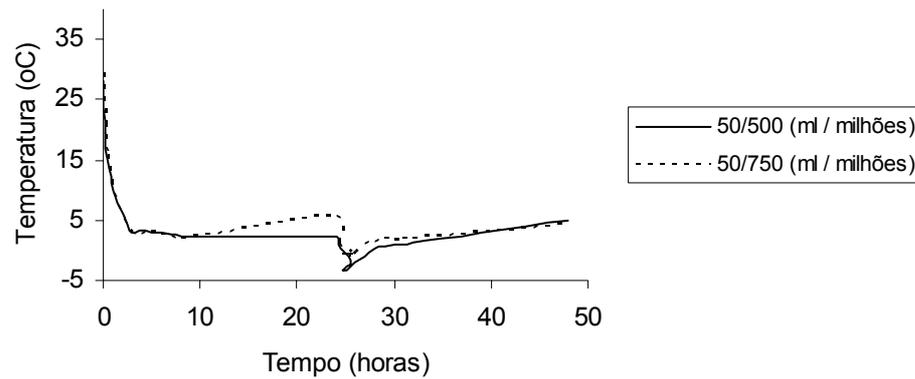


Figura 5. Curva de refrigeração do sêmen com volumes de 50 ml e concentrações espermiáticas de 500 e 750 x 10⁶ durante a estocagem no CP2 em função do tempo.

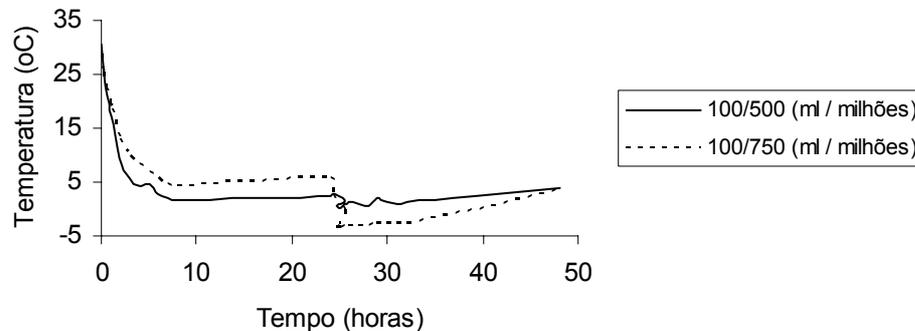


Figura 6. Curva de refrigeração do sêmen com volumes de 100 ml e concentrações espermiáticas de 500 e 750 x 10⁶ durante a estocagem no CP2 em função do tempo.

Maiores valores medianos ($p < 0,05$) da variável motilidade progressiva (%) foram obtidos no momento pré-refrigeração (M-0) quando comparados àqueles dos quatro tratamentos às 24 (M-24) e 48 horas (M-48). Os valores medianos de motilidade progressiva (%) às 24 horas de armazenamento diferiram ($p < 0,05$) entre os tratamentos 1 e 2 e 1 e 3. Os

valores medianos de motilidade progressiva (%) às 48 horas de armazenamento não diferiram ($p>0,05$) entre os tratamentos. Houve diferença significativa ($p<0,05$) para os valores medianos da motilidade progressiva (%) entre os períodos de 24 e 48 horas de armazenamento (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação dos valores medianos de motilidade progressiva (%) nos momentos pré-refrigeração (M-0), 24 e 48 horas pós-refrigeração segundo diferentes volumes (ml) e concentrações ($\times 10^6$) espermáticas.

	Tratamentos (ml / $\times 10^6$)								
	M-0	T1 - 50/500		T2 - 50/750		T3 - 100/500		T4 - 100/750	
		M-24	M-48	M-24	M-48	M-24	M-48	M-24	M-48
Mediana	80 ^{A,a}	65 ^B	50 ^b	60 ^C	45 ^b	55 ^C	45 ^b	60 ^{B,C}	50 ^b
Valor p*		0,0077		0,0406		0,0300		0,0209	
n	10	10		10		10		10	

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p<0,05$) pelo teste de Wilcoxon.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p<0,05$) pelo teste de Wilcoxon.

* Comparação das medianas dentro de tratamento nos diferentes momentos de refrigeração.

Os valores medianos do número de células íntegras no momento pré-refrigeração (M-0), não diferiram ($p>0,05$) daqueles dos tratamentos durante as 24 horas de armazenamento. Comparando-se os valores medianos do número de células íntegras às 48 horas de armazenamento foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$) entre o controle M-0 e os tratamentos 1 e 4. Em relação a comparação dos valores medianos para o número de células íntegras às 24 e 48 horas de armazenamento não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos. Não se verificou diferença ($p>0,05$) entre os valores medianos do número de células íntegras entre os dois períodos de armazenamento dentro do mesmo tratamento (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação dos valores medianos para o número de células íntegras nos momentos pré-refrigeração (M-0), 24 e 48 horas pós-refrigeração segundo diferentes volumes (ml) e concentrações ($\times 10^6$) espermáticas.

	Tratamentos (ml / $\times 10^6$)								
	M-0	T1 - 50/500		T2 - 50/750		T3 - 100/500		T4 - 100/750	
		M-24	M-48	M-24	M-48	M-24	M-48	M-24	M-48
Mediana	89,5 ^{A,a}	90 ^A	83,5 ^{b,c}	90 ^A	87 ^{a,c}	87 ^A	85,5 ^{a,c}	88,5 ^A	83 ^{b,c}
Valor p*		0,0593		0,8127		0,3139		0,4148	
n	10	10		10		10		10	

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p<0,05$) pelo teste de Wilcoxon.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p<0,05$) pelo teste de Wilcoxon.

* Comparação das medianas dentro de tratamento nos diferentes momentos de refrigeração.

Experimento 3

Os valores médios de motilidade progressiva (%) e número de células íntegras para os momentos pré-refrigeração (M-0), e após 24, 36, 42 e 48 horas de refrigeração (M-24, M-36, M-42 e M-48, respectivamente, se encontram na tabela 6.

Tabela 6. Valores médios (\pm desvio padrão) para as variáveis motilidade progressiva (%) e número de células íntegras durante refrigeração por 48 horas no *container* CP2.

Momentos	n (ejaculados)	Motilidade progressiva (%)	Número de células íntegras*
M-0	13 (100%)	74,60 \pm 05,18	82,46 \pm 5,20
M-24	13 (100%)	55,76 \pm 09,54	81,10 \pm 5,34
M-36	12 (92,31%)	42,72 \pm 09,04	79,11 \pm 7,34
M-42	09 (69,23%)	38,88 \pm 11,66	80,25 \pm 5,65
M-48	04 (30,77%)	35,00 \pm 10,00	72,75 \pm 1,50

*Eosina-nigrosina.

No M-24 todas as amostras apresentavam motilidade progressiva superior a 30%. Cerca de 70% (9/13) das amostras estavam com mais de 30% de motilidade progressiva às 42 horas, sem a troca do sistema de refrigeração.

Experimento 4

No momento pré-refrigeração (M-0) o valor médio para motilidade progressiva (%) foi de 67,0 \pm 6,7. Após 24 horas de refrigeração no CP2, a motilidade progressiva foi de 39,5 \pm 10,7. O número de células íntegras no M-0 foi de 72,6 \pm 6,7 e no M-24 de 43,0 \pm 7,6. A taxa de prenhez ao primeiro ciclo foi de 69,23% (18/26).

Experimento 5

No momento pré-refrigeração (M-0) os valores médios para motilidade progressiva (%) e número de células íntegras foram de $71,7 \pm 5,8$ e $81,8 \pm 5,3$, respectivamente. Para M-24, valores de $56,7 \pm 6,5$ e $79,1 \pm 3,5$, respectivamente para as variáveis motilidade progressiva (%) e número de células íntegras. Às 48 horas de refrigeração os valores médios para as variáveis motilidade progressiva (%) e número de células íntegras foram de $44,2 \pm 6,7$ e $75,7 \pm 2,5$. A taxa de prenhez ao primeiro ciclo foi de 69,23% (9/13).

4. Discussão

A IA com sêmen eqüino submetido ao transporte se expandiu após o lançamento comercial do EquitainerTM, que possui uma taxa ideal para refrigeração de $-0,30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Douglas-Hamilton et al., 1984). Embora amplamente utilizado por diversos países fatores como seu custo elevado e por não ser descartável, contribuíram para o desenvolvimento de produtos similares. Nos *containers* testados neste trabalho, as taxas médias de refrigeração até os 60 minutos, no CP1 ($-0,35 \pm 0,03^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e CP2 ($-0,23 \pm 0,01^{\circ}\text{C}/\text{min}$), foram similares às indicadas por Douglas-Hamilton et al. (1984), Province et al. (1985) e Varner et al. (1989). Dentro do intervalo de temperatura em que ocorre o choque térmico 19 a 8°C (Graham, 1996), a taxa média de refrigeração para o *container* CP1 ($-0,11 \pm 0,03^{\circ}\text{C}/\text{min}$) foi cerca do dobro da recomendada por alguns autores que consideram que esta não deva ser superior a $-0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Kayser et al., 1992; Moran et al., 1992 e Amann e Graham, 1993). Contudo, ao observar os resultados do Experimento 1, verifica-se que embora a motilidade progressiva tenha sido superior ($p < 0,05$) para o sêmen armazenado no EquitainerTM (EQ), a pequena diferença entre os valores (CP1 – 45% vs EQ – 50%), provavelmente não tenha significado

biológico, por esta ter sido estimada subjetivamente. Para o CP2 a taxa média de refrigeração durante a fase do choque térmico foi de $-0,081 \pm 0,002^{\circ}\text{C}/\text{min}$, pouco superior a recomendada por Kayser et al. (1992), Moran et al. (1992) e Amann e Graham (1993). Cabe salientar que, a parede da caixa isotérmica do CP1 era mais espessa em cerca de 1 cm, fato que pode ter contribuído para uma taxa de refrigeração mais rápida.

A taxa de refrigeração do sêmen depende do volume e da temperatura inicial da amostra (Douglas-Hamilton et al., 1984; Squires et al., 1999 e Brinsko et al., 2000), fato observado no experimento 2, para os primeiros 30 e 60 minutos de armazenamento no CP2, quando as taxas médias de refrigeração foram mais lentas para volumes de 100 ml quando comparada às amostras de 50 ml, sem diferença entre os tratamentos para as características seminais. Nos experimentos 2, 3, 4 e 5, o volume variou de 22 a 100 ml, sem comprometimento da qualidade seminal por até 48 horas. Portanto, conforme ressaltam Douglas-Hamilton et al. (1984) e Brinsko et al. (2000), é importante observar e atender às recomendações técnicas dos fabricantes dos *containers* em relação ao volume da amostra de sêmen a ser refrigerada.

Há controvérsias entre pesquisadores sobre a temperatura ideal de estocagem do sêmen equino, por períodos de 18 a 72 horas. Alguns relataram que a preservação entre 15 e 20°C foi superior para as características seminais e/ou fertilidade (Province et al., 1985; Batellier et al., 2001 e Lindsey et al., 2005), enquanto outros afirmaram ser mais indicada a estocagem entre 4 e 5°C (Varner et al., 1988; Varner et al., 1989 e Ball, 1998). A temperatura mais baixa no CP1 e CP2 foi de aproximadamente $2,0^{\circ}\text{C}$, quando não houve a troca de gelos, portanto, abaixo da recomendada (Varner et al., 1989; Moran et al., 1992; Ball, 1998; Batellier et al., 2001; Moore et al., 2005), mas, sem efeitos deletérios sobre motilidade, integridade da membrana plasmática e capacidade fecundante do sêmen, por até 48 horas, conforme atestam as taxas de prenhez ao 1º ciclo de 69,23% (Experimentos 4 e 5).

No Experimento 2, às 24 horas os gelos recicláveis foram substituídos e 45 minutos após a troca todos os tratamentos acusaram temperaturas inferiores a 0°C, porém, após 48 horas de refrigeração, os valores de motilidade progressiva e células íntegras foram similares aos obtidos por Malmgren (1998) às 24 horas, utilizando o Equitainer I™. Temperaturas abaixo de 0°C, também foram relatadas por Katila et al. (1997) e Brinsko et al. (2000), de -0,1°C (ExpectaFoal™) e -5,7°C (Lane-STST™), respectivamente, sem efeito prejudicial sobre a motilidade espermática. É possível que uma associação de fatores tenha contribuído para a redução de prováveis lesões celulares, como a presença dos crioprotetores extracelulares do diluidor, lipoproteínas do leite e glicose, e uma boa taxa de refrigeração durante a fase de transição dos lipídeos da membrana (Graham, 1996).

Durante os experimentos, tanto CP1 como CP2 permaneceram sob condições laboratoriais sem controle da temperatura ambiente e, além disso, não sofreram influência direta de variações climáticas externas como calor intenso e insolação, fatores que interferem nas taxas de refrigeração e temperatura final de estocagem do sêmen (Valle et al., 1999 e Brinsko et al., 2000). No entanto, CP1 e CP2 possuem cinco bombonas de gelo reciclável, ou seja, um sistema de refrigeração maior que o da maioria dos equipamentos já testados (Douglas-Hamilton et al. 1984; Malmgren, 1998; Brinsko et al., 2000; Valle et al., 2000). Tal fato provavelmente garantiu que às 50 horas de estocagem, sem a troca dos gelos, o sêmen apresentasse uma temperatura média de 14,7°C, semelhante à obtida por Malmgren (1998), de 12,2°C, para 24 horas de preservação do sêmen no Equitainer I™, quando este foi submetido a uma temperatura externa de 37°C. Portanto, pode-se supor que ao submeter o CP2 a uma temperatura externa elevada, comum em países tropicais como o Brasil, possivelmente, esta não terá influência negativa sobre a qualidade do sêmen. Desta forma, torna-se desnecessária a troca do sistema de refrigeração, aumentando a praticidade em nível de campo, além do tempo de transporte, em geral, ser de 24 horas, momento em que o CP2 encontra-se a 2°C.

O armazenamento, sob refrigeração, por períodos superiores a 24 horas, pode desencadear processos bioquímicos que comprometem a motilidade, integridade da membrana plasmática e fertilidade dos gametas (Jasko et al., 1992; Pommer et al., 2002 e Aurich, 2005). No experimento 5, às 48 horas de refrigeração, sem a troca do sistema de refrigeração, os valores de motilidade progressiva estiveram pouco acima do recomendado por Darenuis (1998), de 40% após 12 horas, cerca de 76% de células íntegras e uma taxa de prenhez ao 1º ciclo igual a do experimento 4 (refrigeração por 24 horas), comprovando a eficiência do CP2 na preservação da qualidade e fertilidade seminais.

A melhor medida da fertilidade é a taxa de prenhez (Squires et al., 1999) e esta sofre influência da concentração espermática, volume da dose inseminante e, além da frequência das inseminações, depende, principalmente, do intervalo entre IA e a ovulação (Allen, 2005). Nos testes *in vivo* tanto os volumes (22 a 66 ml) como concentrações (525 a 900×10^6) utilizados não tiveram efeito negativo sobre as taxas de prenhez e encontram-se dentro de valores relatados por diversos autores (Douglas-Hamilton et al., 1984; Squires et al., 1989; Pickett e Shinner, 1994; Valle et al., 2000).

Neste estudo o uso do hCG permitiu que fosse utilizada uma IA/ciclo, manejo sugerido por vários pesquisadores (Allen, 1984; Shore et al., 1998; Brandão et al., 2003), com uma taxa de prenhez ao 1º ciclo de 69,23%, valor similar aos obtidos por Douglas-Hamilton et al. (1984), Jasko et al. (1992), Heiskanen et al. (1994) e Valle et al. (1999), utilizando inseminações em dias alternados até a detecção da ovulação. Sem o uso de indutores da ovulação, recomenda-se que as IA sejam realizadas a um intervalo máximo de 48 horas (Voss et al., 1982; Brinsko e Varner, 1992; Brandão et al., 2003), o que aumenta o número de inseminações / ciclo e/ou concepção. Já, a inseminação única / ciclo reduz os custos com a colheita de sêmen, mão-de-obra e transporte do material.

5. Conclusões

Conclui-se que o *container* CP1 apresentou satisfatória taxa de refrigeração, manutenção da temperatura por 24 horas e boa preservação das características seminais durante a estocagem. O *container* CP2 mostrou-se eficiente quanto às características de refrigeração, preservação da motilidade e integridade da membrana plasmática, proporcionando bons índices de fertilidade após preservação do sêmen equino por 24 e 48 horas. Entretanto, novos estudos são necessários para avaliar a influência das variações climáticas sobre as características de refrigeração do CP2.

6. Referências Bibliográficas

ALLEN, W.E. The use of hormones in the control of reproductive function in the mare. **Equine Practice**, p.55-60, 1984

ALLEN, W.R. The Development and Application of the Modern Reproductive Technologies to Horse Breeding. **Reprod. Dom. Anim.** v.40, p.310-329, 2005.

AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine reproduction**, 1. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap.80, p.715-745.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v.89, n.1-4, p.65-75, 2005.

BALL, B.A. Evaluation and use of transported equine semen. In: EQUINE ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY WORKSHOP, 1998, Davis. **Proceedings...**Davis, 1998. p.18-24.

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

BATELLIER, F., VIDAMENT, M., FAUQUANT, J., DUCHAMP, G., ARNAUD, G., YVON, J.M., MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Anim. Reprod. Sci.**, v.68, n.3-4, p.181-190, 2001.

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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.55, p.61-67, 2003.

BRINSKO, S.P., VARNER, D.D. Artificial insemination and preservation of semen. *Veterinary Clinics of North America*: **Equine Practice**, v.8, p.205-218, 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.

DARENIUS, A. Experiences with chilled, transported equine semen. In: STALLION REPRODUCTION SYMPOSIUM, 1998, Society for Theriogenology - American Association of Equine Practitioners. **Proceedings...**1998, p.60-70.

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.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America*: **Equine Practice**, v.12, p.131-147, 1996.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.88, p.343-352, 1990.

HENNEKE, D.R., POTTER, G.G., KREIDER, J.L., YEATES, B.F. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Vet. J.**, v.15, n.4, p.371-372, 1983.

HEISKANEN, M.L., HUHTINEN, M., PIRHONEN, A., MAENPAA, P.H. Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. **Acta. Vet. Scand.** v.35, p.257-262, 1994.

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...**, 1992, v.3, p.1439-1441.

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.

KAYSER, J.P., AMANN, R.P., SHIDELER, R.K. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, n.4, p.601-614, 1992.

KENNEY, R.M., BERGMAN, R.V., COOPER, W.L. Minimal contamination techniques and preliminary findings. In: AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 1975, **Proceedings...**, 1975, v.21, p.327-336.

LINDSEY, A.C., VARNER, D.D., SEIDEL JR., G.E., BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18h at either 5°C or 15°C prior to flow-cytometric sorting. **Anim. Reprod. Sci.**, v.85, p.125-130, 2005.

MALMGREN, L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. **Theriogenology**, v.50, p.833-839, 1998.

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.

MORAN, D.M., JASKO, D.J., SQUIRES, E.L., AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, n.6, p.999-1012, 1992.

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 congelamento de sêmen equino. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 19, 2005, Angra dos Reis. **Anais...**Angra dos Reis, 2005, p.19-27.

PICKETT, B.W., SHINER, K.A. Recent developments in artificial insemination in horses. **Livestock Production Science.**, v.40, n.1, p.31-36, 1994.

POMMER, A.C., LINFOR, J.J., MEYERS, S.A. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. **Theriogenology**, v.57, n.5, p.1493-1501, 2002.

PROVINCE, C.A., SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W., AMANN, R.P. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.23, n.6, p.925-934, 1985.

SHORE, M.D., MACPHERSON, M.L., COMBES, G.B., VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L. Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. **Theriogenology**, v.50, n.5, p.693-698, 1998.

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, 35, 1989, Boston. **Proceedings...**Boston: American Association of Equine Practitioners, 1989, p.25-30.

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, 1999, p.01-38.

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 equino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.51, n.5, 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. **Rev. Bras. Zootec.**, v.29, n.6, p.1721-1726, 2000.

VARNER, D.D., BLANCHARD T.L., LOVE, C.L., GARCIA, M.C., KENNEY, R.M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.29, p.1043-1053, 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.

VOSS, J.L., SQUIRES, E.L., PICKETT, R.K., SHIDELER, R.K., EIKENBERRY, D.J., Effect of numbers and frequency of inseminations on fertility of mares. **J. Reprod. Fert.**, v.32, p.53-57, 1982.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 2. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984. 718 p.