

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA
CAMPUS SOUSA-PB
BACHARELADO EM MEDICINA VETERIÁRIA

Vicente Antonio da Silva Neto

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN DE JUMENTO
NORDESTINO APÓS DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO PELO FRIO

SOUSA-PB

2017

Vicente Antonio da Silva Neto

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN DE JUMENTO
NORDESTINO APÓS DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO PELO FRIO

Trabalho de conclusão de curso como parte das exigências para a conclusão do Curso de Graduação de Bacharelado em Medicina Veterinária do Instituto Federal da Paraíba, Campus Sousa.

Prof. M.Sc. Luis Eduardo Pereira de Andrade Ferreira

SOUSA-PB

2017

Vicente Antonio da Silva Neto

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN DE JUMENTO
NORDESTINO APÓS DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO PELO FRIO

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: _____ pela
Comissão Examinadora:

Orientador (a):

Msc. Luis Eduardo Pereira de Andrade Ferreira
Instituto Federal da Paraíba
Medicina Veterinária

Avaliadores (a):

Dr. Carlos Enrique Peña-Alfaro
Universidade Federal de Campina Grande
Medicina Veterinária

Msc. Eduardo Santiago Beltrão
Instituto Federal da Paraíba
Medicina Veterinária

SOUSA – PB

2017

DEDICATÓRIA

Dedico à Deus, e aos meus pais,
Vidal e Francisca, pelo amor
incondicional e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder a vida e estar sempre presente nela, e por ter me dado força e fé nos momentos difíceis.

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Vidal e Francisca, pelo amor e dedicação de sempre e por nunca medirem esforços para que eu conseguisse realizar este sonho.

Aos meus irmãos Fátima, Socorro, Glória, José Vidal, Renault e Segundo pelo carinho e apoio de todos, e por constituírem uma família unida.

Aos tios, primos, sobrinhos e todos que fazem parte de minha família.

À Isabela pelo apoio incondicional, todo amor, carinho e muita paciência durante toda essa longa jornada.

Aos amigos e companheiros de lutas das antigas HRV e GV, e agora da Vetesouros, Anderson Holanda, Ayellysson Neves, Ermerson Ferreira, Pablo Cavalcanti, Redy Dantas e Wendel Dantas.

Ao meu Professor, orientador e amigo, Luis Eduardo de Andrade, pelos ensinamentos, pela confiança depositada e por nunca medir esforços para a realização deste trabalho.

A todos os Professores que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal, desde a alfabetização até aqui.

Aos amigos e colegas do Lab. de Ensino em Biotecnologia da Reprodução: Aldcejan Jr., José Valdevan, Gessyca Martins, Maria do Socorro, Juliany Alves, Mariely Britto e Naianne Araújo.

Aos amigos que contribuíram de forma direta e foram fundamentais para a realização deste trabalho: Ícaro Costa, Ítallo Costa, Herbert Lira, Maria das Graças Gabriela, Vinicius Silva.

Aos equídeos em geral, principalmente aos asininos: Gigante, Tião, Nazaré, Rosa, Rosinha, Terceira e Carol, que foram indispensáveis para a realização desta e outras pesquisas.

Aos demais amigos e colegas da turma 2012.1 e agregados, Anderson Lourenço, João Pedro, Bianca Alves, Desireé Seal, João Silvestre, Sezinando Brandão, Gabriel Lins, Paulo Wbiratan, João Grigório e Joffre Ramalho.

Aos amigos Médicos Veterinários formados no IFPB, Jessika Gadelha, Rita de Cássia, Flávia Kellany, Laís Dourado e Igor Mariz.

Aos funcionários e amigos José Evânio Siebra, Eduardo Beltrão, Ariclens Olinto, Luis Onofre, Januário Neto, Francimar e Elisângela.

Aos Médicos Veterinários Luís Fleury e Pedro Vita, que contribuíram imensamente para a realização do meu estágio final.

A todos que confiaram e torceram por mim, e que de alguma forma contribuíram para que este sonho se concretizasse, o meu Muito Obrigado!!!

“A parte que ignoramos é muito maior que tudo quanto sabemos.”

- Platão.

RESUMO: O presente trabalho descreve os parâmetros seminais do sêmen fresco de Jumentos Nordestinos, e suas variações após diferentes técnicas de conservação pelo frio. Foram utilizados três asininos adultos. O sêmen destes foi inicialmente avaliado quanto a sua motilidade total, vigor espermático, concentração e volume. As biotecnologias de conservação pelo frio usadas foram: refrigeração, onde as amostras, diluídas em três diluentes diferentes, foram avaliadas a cada 12 horas; e congelamento, sendo avaliados os protocolos em máquina automática e sistema geladeira/vapor de N₂; nestas, foram avaliados motilidade total e vigor espermático. Os valores encontrados na avaliação inicial se apresentaram com médias de 89% de motilidade, vigor quatro, concentração/ml e total de 160 e 4667 x 10⁶ e volume de sêmen e gel de 32 e 6 ml respectivamente. No resfriamento, encontramos médias de motilidade e vigor satisfatórios para todos os meios testados até momento 24 horas, onde apresentavam médias próximas a 57% e 3 respectivamente. Para o congelamento, os protocolos máquina e geladeira demonstraram médias de 63% contra 20% de motilidade, e vigor de 3 para ambos os grupos. Concluimos que os parâmetros de sêmen fresco para Jumento Nordestino são semelhantes aos descritos para outras raças. Os meios testados para refrigeração podem ser utilizados com eficácia até 24 horas no sistema de refrigeração utilizado. O protocolo máquina foi aparentemente eficiente, enquanto na geladeira não se demonstrou eficaz para o congelamento de sêmen asinino no protocolo utilizado.

Palavras-chave: Asininos. Criopreservação. Refrigeração passiva. Motilidade espermática. Vigor espermático.

ABSTRACT: The present essay describes seminal parameters of fresh semen of Northeastern Donkeys, and their variations after using different techniques of preservation by cold treatment. It was used three adult donkeys. Firstly, their semen was evaluated with regard to its total motility, spermatic vigor, concentration and volume. Cold preservation biotechnologies involved were: cooling, where the samples were diluted in three different diluents and evaluated every 12 hours; and freezing, where the protocols were evaluated in automatic machine and vapor refrigeration system of N₂. Mean for the first evaluation were 89% for motility, vigor 4, 160 and 4667 x 10⁶ for concentration/ml and total, and then, a volume of 32 and 6 ml for semen and gel, respectively. In the cooling, it was found satisfactory means of motility and vigor for all media tested until they reach 24 hours. In addition, mean values found were close to 57% and 3, respectively. For freezing, the machine and refrigerator protocols demonstrated mean values of 63% versus 20% for motility, and vigor 3 for both groups analysed. In conclusion, the parameters of fresh semen for Northeastern Donkeys are similar to those described for other breeds. Additionally, media tested for cooling can be used with effectiveness last up to 24 hours in the cooling system used. The machine protocol was apparently efficient, while in the refrigerator, it demonstrated to be non-effective for freezing of donkey semen on the protocol used.

Keywords: Donkeys. Cryopreservation. Passive cooling. Sperm motility. Spermatic vigor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Imagem 1. Jumento da raça Nordestina no pastejo	14
Imagem 2. Vagina artificial fechada.....	15
Imagem 3. Fêmea utilizada como manequim.....	15
Imagem 4. Manequim artificial.....	16
Imagem 5. Momento da coleta de sêmen.....	22
Imagem 6. Volume total do ejaculado.....	22
Imagem 7. Caixa isotérmica utilizada para refrigeração passiva do sêmen.....	23
Imagem 8. Estante de congelamento produzida no LEBRE.....	24
Imagem 9. Máquina automática de congelamento de sêmen.....	24
Gráfico 1 - Distribuição das médias da motilidades total, de jumentos Nordestinos submetidos à diluição com três meios diferentes, no decorrer de três dias, com avaliações a cada 12 horas.....	27
Gráfico 2 - Distribuição das médias do Vigor espermático de jumentos Nordestinos, submetidos à diluição com três meios diferentes, no decorrer de três dias, com avaliações a cada 12 horas.....	28
Gráfico 3 - Distribuição das médias e desvio padrão da motilidade espermática de jumentos Nordestinos submetidos a criopreservação de sêmen. Nas fases pós a coleta (Inicial), pós-centrifugação e adição de crioprotetor (Pré-congelamento) e descongelados, após congelamento nos tratamentos Máquina e Geladeira.....	29
Gráfico 4 - Distribuição das médias individuais e desvio padrão da motilidade espermática de jumentos Nordestinos submetidos a criopreservação de sêmen. Nas fases pós a coleta (Inicial), pós-centrifugação e adição de crioprotetor (Pré-congelamento) e descongelados, após congelamento nos tratamentos Máquina e Geladeira.....	30
Gráfico 5 - Distribuição das médias e desvio padrão do vigor espermático de jumentos Nordestinos submetidos a criopreservação de sêmen. Nas fases pós a coleta (Inicial), pós-centrifugação e adição de crioprotetor (Pré-congelamento) e descongelados, após congelamento nos tratamentos na Máquina e Geladeira.....	31
Gráfico 6 - Distribuição das médias individuais e desvio padrão do vigor espermático de jumentos Nordestinos submetidos a criopreservação de sêmen. Nas fases pós a coleta (Inicial), pós-centrifugação e adição de crioprotetor (Pré-congelamento) e descongelados, após congelamento na Máquina e na Geladeira.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios e desvios-padrão das características do sêmen fresco de Jumentos Nordestinos: Motilidade total, vigor espermático, concentração por ml e total, volume de sêmen e volume de gel.....	26
Tabela 2 - Motilidade total para o sêmen fresco de asininos em diferentes estudos.....	27
Tabela 3 - Distribuição das médias da motilidades total, de jumentos Nordestinos submetidos à diluição com três meios diferentes, no decorrer de três dias, com avaliações a cada 12 horas.....	28
Tabela 4 - Médias e desvio padrão das repetições da motilidade espermática dos jumentos Nordestinos submetidos a criopreservação de sêmen. Nas fases pós a coleta (Inicial), pós-centrifugação e adição de crioprotetor (Pré-congelamento) e descongelados, após congelamento na Máquina e na Geladeira.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

% - Porcentagem

Bsh – Clima semiárido quente

cm – Centímetro

EUA – Estados Unidos da América

G – Força gravitacional

Hg – Mercúrio

LEBRE – Laboratório de Ensino em Biotecnologia da Reprodução

m – Metro

MC1 – Meio Comercial 1

MC2 – Meio Comercial 2

min – Minuto

ml – Mililitro

mm – Milímetro

N₂ – Nitrogênio líquido

°C – Grau Célsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1. Jumento Nordestino	14
2.2. Coleta de sêmen	15
2.3. Avaliação seminal microscópica	16
2.4. Conservação do sêmen pelo frio	17
2.4.1. Refrigeração	17
2.4.1.1. Diluição do sêmen para refrigeração	17
2.4.1.2. Sistemas de refrigeração	18
2.4.2. Criopreservação	18
2.4.2.1. Crioprotetores mais utilizados para sêmen de equídeos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Local e animais	21
3.2. Grupo experimental	21
3.3. Coleta e avaliação do sêmen	22
3.4. Refrigeração do sêmen	23
3.5. Congelamento do sêmen	23
3.6. Análises estatísticas	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Características seminais de Jumentos Nordestinos	26
4.2. Sêmen asinino refrigerado	27
4.3. Sêmen asinino congelado	29
5. CONCLUSÕES	33
6. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Medidas técnico-científicas que assegurem a preservação dos asininos (*Equus asinus*) e a sua multiplicação racional, vêm sendo pouco descritas. No entanto, tais pesquisas são de relevante importância, pois o objetivo da conservação animal é a manutenção da biodiversidade, onde a perda de uma única espécie pode afetar o funcionamento de um ecossistema inteiro (HENSON, 1992). Diante disto, a não existência de um padrão para a conservação espermática dos jumentos Nordestinos é fator prejudicial para esta espécie (SAMPER & MORRIS, 1998).

Além do mais, os asininos têm desempenhado um papel importante desde os primórdios da humanidade, servindo de tração e transporte nas regiões áridas e semiáridas do planeta, e sendo indispensáveis na produção de muares (PUGH, 2002).

Os primeiros relatos científicos sobre o uso de biotecnologias da reprodução aplicadas em equídeos datam do final do Séc. 19 e início do Séc. 20, quando foi utilizada a inseminação artificial (IA) em éguas com finalidade de prevenção de doenças sexualmente transmissíveis (BIELANSKY, 1982). O uso desta biotécnica vem sofrendo pequenos avanços para asininos nas últimas décadas, principalmente com utilização do sêmen refrigerado (NUNES et al, 2006), sendo o sêmen congelado ainda pouco aproveitado. Principalmente por não haver uma padronização das técnicas de congelamento aceita para esta espécie, como as já existentes para bovinos (SAMPER & MORRIS, 1998).

O uso do frio para a conservação do sêmen prolonga a sobrevivência dos espermatozoides, e os protege de condições adversas. Além de maximizar o número de fêmeas a serem inseminadas, diminuir o risco de consanguinidade e reduzir a possibilidade de transmissão de doenças (LOOMIS & SQUIRES, 2005). Porém, se faz necessário tomar algumas precauções com os protocolos usados na preservação desse sêmen. Pois diversos fatores são capazes de influenciar negativamente na viabilidade espermática após a conservação pelo frio, como a composição do meio diluente e crioprotetor, métodos de transporte e a individualidade do reprodutor (ROCHA, 2012).

Com isso, para que os espermatozoides sobrevivam aos danos causados pelo frio, se faz necessário que estejam imersos em um meio que lhes confira nutrientes e proteção físico-química, associada a curvas ideais de refrigeração e de congelamento (ARRUDA, 2000). Deste modo, as células espermáticas conseguirão manter sua fertilidade, preservando morfologia aceitável, metabolismo, motilidade progressiva, membranas estabilizadas e enzimas para a fertilização (SQUIRES et al., 1999).

Para promover esta proteção, uma diversidade de meios diluentes foi desenvolvida com a combinação de diversos componentes (açúcares, eletrólitos, tampões, antioxidantes, antibióticos, gema de ovo, leite e outros crioprotetores), estes capazes de fornecer nutrientes e proteger os espermatozoides contra as injúrias provocadas pelo frio (PADILLA & FOOTE, 1991).

Desta forma, o presente trabalho objetiva descrever e revisar os padrões espermáticos da espécie em estudo e avaliar diferentes biotecnologias da reprodução aplicadas à conservação de espermatozoides de jumentos Nordestinos pelo frio.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Jumento Nordestino

Os asininos são membros da família Equidae, e pertencem à ordem Perissodactyla (HAFEZ, 2004). Segundo o IBGE (2011), o Brasil possui um efetivo desses animais de aproximadamente 974.688, sendo que o Nordeste abriga cerca de 880 mil jumentos, que na sua maioria, são da raça Nordestina. Os animais desta raça (Imagem 1) apresentam como características principais porte mínimo de 1,10 m para o macho e fêmea; cabeça bem proporcionada e ligeiramente alongada, pescoço fino e bem atado a cabeça; corpo alongado com linha dorso-lombar reta e garupa oblíqua e afinada na parte posterior; membros secos, descarnados, bem aprumados e cascos pequenos; e pelagem cardã, ruça, pelo de rato, roxa e apatacada (ALMEIDA, 2009).

Imagem 2. Jumento da raça Nordestina no pastejo.



Fonte: Silva Neto (2017).

Altamente rústico e adaptado às condições no semiárido brasileiro, o jumento Nordestino era usado pelo homem do Nordeste brasileiro em uma variedade de atividades (NOBRE, 1980). Apesar disso, na segunda metade do século XX, os animais desta raça sofreram uma redução de aproximadamente 75% da sua população. Preocupada com o desaparecimento da raça, a EMPARN (Empresa de Pesquisa do Rio Grande do Norte) manteve, por um tempo, um Núcleo de Conservação desta raça (MARIANTE & CAVALCANTE, 2006). Porém, com a diminuição de sua utilização, os mesmos passaram a ser abandonados a deriva, e hoje são vistos como problema, principalmente por serem envolvidos em acidentes de trânsito (ALMEIDA, 2009).

2.2. Coleta de sêmen

A coleta de sêmen dos equídeos pode ser realizada utilizando-se modelos de vaginas artificiais, fechadas (Imagem 2), projetadas para a coleta do ejaculado total, ou abertas, quando se pretende realizar a coleta fracionada do sêmen (ROCHA, 2012). A última é mais higiênica, por possibilitar o descarte da fração pré-espermática, que contém grande quantidade de bactérias, e da fração gelatinosa, prejudicial à conservação dos espermatozoides (SIEME et al., 2004).

Imagem 2. Vagina artificial fechada.



Fonte: Silva Neto (2016).

Independente do tipo de vagina utilizada, esta deve propiciar pressão e temperaturas adequadas para se realizar a coleta. A temperatura ideal é de 42 a 45° C no interior da vagina artificial, com uma pressão de, aproximadamente, 66 mm/Hg no momento da coleta de sêmen (TISCHNER & KOSINIAK, 1992).

Para realizar a coleta com a vagina artificial, é necessário que o macho tenha estabilidade durante a monta, sob pena de ocasionar lesões ao animal (LOVE, 1992). Para isto pode-se utilizar fêmeas em cio (Imagem 3) ou ovariectomizadas, porém em alguns casos, estas ainda podem não fornecer a segurança suficiente ao garanhão e veterinário, pela movimentação de algumas delas e a possibilidade de acidente devido a contensão (RICHARDSON & WENKOFF, 1976).

Imagem 3. Fêmea utilizada como manequim



Legenda: Fêmea em cio e devidamente contida.
Fonte: Silva Neto (2016).

Pode-se ainda utilizar do manequim artificial (Imagem 4), que minimiza a necessidade de fêmeas em cio no momento da coleta, bem como a mão de obra para contê-las. Mas proporciona risco para animais mais afoitos, possibilitando injúrias no pênis por colisão contra a estrutura do manequim (LOVE, 1992), exigindo maior atenção do responsável pela coleta nessas situações.

Imagem 4. Manequim artificial



Fonte: <http://zipanuncios.com.br/ads/manequim-para-coleta-de-semen-de-cavalo/>

2.3. Avaliação seminal microscópica

A motilidade e vigor espermático são os principais fatores utilizados para avaliar o sêmen rotineiramente, constituindo uma técnica simples e barata. Apesar de subjetiva, 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).

A motilidade total para sêmen fresco de jumentos já foi descrita por alguns autores com amplitude que vai desde, 70 a cerca de 100% (ARRUDA et al., 1989; KER, 2009; CONTRI et al., 2011). Já o vigor espermático, que constitui a avaliação subjetiva da força e velocidade espermática, é classificado usando uma escala de 0 a 5 (WALTON, 1952), onde Henry et al. (1987) encontrou a média de 4,2 para jumentos Nordestinos.

Quando se fala no uso do sêmen para o congelamento, usam-se no Brasil os padrões definidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), onde o sêmen fresco deve apresentar motilidade mínima de 70% e vigor de aproximadamente três.

Já os parâmetros mínimos para o uso de sêmen congelado na inseminação artificial têm sido preconizados como 35% de motilidade total logo após o descongelamento, a nível mundial (WBFSSH, 2016). Já no Brasil, o CBRA (1998) preconiza, como parâmetros mínimos

para a aprovação da partida de sêmen congelado, valores superiores a 30% para motilidade total, vigor maior que três, após o descongelamento.

2.4. Conservação do sêmen pelo frio

2.4.1. Refrigeração

As biotecnologias da reprodução são ferramentas indispensáveis para a equideocultura mundial, e a IA é um dos instrumentos de maior impacto na reprodução de equídeos (LOOMIS, 2006). A maneira mais comum de utilização dessa biotecnologia é o uso do sêmen refrigerado, utilizado na reprodução de asininos desde o final da década de 80 (HECKENBICHLER et al., 2011).

O armazenamento do sêmen em baixas temperaturas tem como o objetivo prolongar a viabilidade espermática e reduzir o consumo de energia (ALTHOUSE et al., 1992), porém durante o processo de resfriamento ocorre reorganização dos lipídios da membrana plasmática e formação de substratos indesejáveis que acarretam diretamente a diminuição da vida útil das células espermáticas (HOLT, 2000), para minimizar a ação desses subprodutos, são usados os diluentes ricos em macromoléculas lipídicas previamente ao processo de resfriamento (GRANHAM, 1996).

2.4.1.1. Diluição do sêmen para refrigeração

Os diluidores de sêmen são destinados a proteger os espermatozoides de condições desfavoráveis durante a refrigeração e o transporte, além de apresentarem a vantagem de aumentar o volume da dose inseminante e auxiliarem na avaliação do sêmen (DARENIUS, 1998). Uma característica importante desses diluidores é a sua capacidade de estabilizar as membranas espermáticas durante a fase de transição, onde ocorrem as maiores lesões celulares (NUNES, 2006).

Para prevenir ou atenuar essas lesões causadas pelo frio aos espermatozoides, é necessário a adição de lipídios (gema de ovo) ou lipoproteínas (leite) ao diluente (HEITLAND et al., 1995; GRANHAM, 1996). Assim como o controle das taxas de refrigeração, onde segundo Kayser et al. (1992), os espermatozoides de equídeos podem ser rapidamente resfriados, a uma taxa de 0,7°C/min, de 37 a 20°C, sendo que a partir desta temperatura até 5°C deve ser utilizada uma taxa lenta, entre 0,05 e 0,1°C/min, visando reduzir os efeitos prejudiciais causados nessa faixa de temperatura.

A ação protetora da gema de ovo se deve as suas lipoproteínas de baixa densidade (AMANN & GRANHAM, 1993), que permanecem ligadas firmemente aos espermatozoides, em especial a lipoproteína 3 (FOULKES, 1977). Mas apesar da proteção conferida, a gema de ovo possui progesterona, o que pode induzir uma capacitação espermática precoce, ocasionando redução da fertilidade (LIPAR et al., 1999).

Por outro lado, as proteínas do leite agem, de modo similar às lipoproteínas da gema de ovo, estabilizando as membranas espermáticas (AMANN & GRANHAM, 1993). Onde de acordo com Batellier et al. (1997), o leite é um fluido biológico de complexa composição, possuindo moléculas como as β -lactoglobulina são benéficas à sobrevivência dos espermatozoides. Batellier et al. (2001) relatam que a proteção conferida às células espermáticas, pelos componentes do leite, estaria relacionada a seus efeitos antioxidantes na membrana celular.

2.4.1.2. Sistemas de refrigeração

Existem no mercado 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).

Machado et al. (2002) desenvolveram um sistema de refrigeração passiva composto por duas caixas de isopor, uma interna medindo 15 x 11 cm, e uma externa medindo 25 x 16 cm, e como fonte de gelo os autores compararam o gelo reciclável gelatinoso e o gelo derivado de polímero (Ice Foam®). Os autores utilizaram o sistema Equine Express®, utilizado comercialmente nos EUA, como controle. Ficou comprovado que o dispositivo que utilizou o gelo Ice Foam® foi eficaz na manutenção da temperatura (16° C por um período superior a 24 horas) e manteve a motilidade e viabilidade espermática durante o período avaliado, mostrando-se superior ao Equine Express®. O dispositivo criado por Machado et al. (2002) mostraram-se como uma alternativa eficaz e economicamente viável para o transporte de sêmen diluído e refrigerado de equídeos.

2.4.2. Criopreservação

O processo de congelamento de sêmen possui várias etapas que podem danificar os espermatozoides, tais como: a mudança de temperatura, o estresse osmótico e tóxico causado

pelos crioprotetores, e a formação e dissolução de gelo no ambiente extracelular (CANISSO, 2008). Segundo Squires et al., (1999), para as células espermáticas alcancem boa fertilidade, devem ultrapassar os obstáculos impostos por estas etapas mantendo características como morfologia, metabolismo, motilidade, membranas plasmáticas e acrossomal estabilizadas, e atividade enzimática. E para os espermatozoides sobreviverem a este processo, precisam estar em um meio que lhes promovam suporte nutricional e proteção físico-química, associado a uma curva ótima de congelamento (ARRUDA, 2000).

2.4.2.1. Crioprotetores mais utilizados para sêmen de equídeos

Os crioprotetores são substâncias capazes de promover a sobrevivência celular durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. Estas substâncias podem ser classificadas de acordo com sua permeabilidade à membrana celular, em: penetrantes (pequenas moléculas) que atravessam a membrana do espermatozoide, a exemplo do glicerol, etilenoglicol e as amidas (acetamida, formamida, etc.); e não penetrantes (macromoléculas), como as proteínas presentes no leite e na gema de ovo, sacarose, glicose, lactose e etc. (McKINNON, 1996).

Dentre os crioprotetores penetrantes, o glicerol é o mais utilizado no congelamento de sêmen de equídeos (PAPA et al., 1999). Apresenta funções atenuadoras das crioinjúrias celulares, por estímulo da desidratação celular, diminuindo o volume intracelular de água disponível para o congelamento. Estudos apontam que glicerol também apresenta efeitos tóxicos, que parece causar desnaturação proteica, mudanças de eventos citoplasmáticos por causa do aumento da viscosidade intracelular e alteração direta da membrana plasmática (ALVARENGA et al., 2000).

As amidas são formadas por dois grupos funcionais: um grupo amina e um grupo ácido carboxílico. Estas possuem menor viscosidade quando comparadas ao glicerol e são mais permeáveis à membrana plasmática do espermatozoide, reduzindo os efeitos deletérios do estresse osmótico causado pelo crioprotetor (BALL & VO, 2001).

Na categoria dos crioprotetores não penetrantes, os açúcares atuam protegendo as células pelos efeitos osmóticos, e servem de substrato energético para o espermatozoide (YILDIZ et al., 2000). A gema de ovo também é comumente encontrada em meios diluidores, prevenindo a célula contra choque térmico no processo de congelamento. Essa proteção é conferida pela presença das lipoproteínas de baixa densidade, que aderem a membrana plasmática, garantindo a maior resistência ao choque térmico e melhoria na motilidade pós-congelamento (MOUSSA et al., 2002).

Os meios diluidores para o congelamento de sêmen são utilizados para garantir a sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides. Apresentam em sua constituição básica, substâncias que permitem a preservação da membrana plasmática, proteção contra choque térmico, manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico, inibição crescimento bacteriano e fornecimento de energia para as células (LINDE-FOSBERG, 1991; ENGLAND, 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local e animais

O trabalho foi realizado no alto sertão da Paraíba, município de Sousa, perímetro irrigado de São Gonçalo. Região que apresenta clima tropical semiárido, latitude sul de 6°50'14,69" e 38°17,43'43,69" de longitude oeste, altitude de 234 m, precipitação média anual de 894 mm e evaporação média anual de 3.056,6 mm. O clima da região é do tipo Bsh da classificação de Köppen, com dois períodos bem definidos, seco e chuvoso, com o período chuvoso entre janeiro e maio (DNOCS, 2016).

Os animais foram mantidos nas dependências do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, onde foi fornecida alimentação (pastejo, feno e concentrado), mineralização e água "*ad libitum*". As análises e o processamento do sêmen foram realizados no Laboratório de Ensino em Biotecnologia da Reprodução (LEBRE) do Hospital Veterinário do mesmo campus.

Foram utilizados três jumentos Nordestinos errantes, adultos, com idade entre três e cinco anos. Estes foram selecionados após exame clínico geral e andrológico, como também testados para o congelamento de sêmen, comprovando sua maturidade sexual. Após sua captura foram submetidos a previa quarentena, período de adaptação e vermifugação. Ao final do experimento foram doados para pequenos produtores.

3.2. Grupo experimental

Para a avaliação das variáveis do sêmen refrigerado, os ejaculados dos três animais foram diluídos em uma concentração final de 50×10^6 espermatozoides viáveis/ml, como recomendado para os meios comerciais, em três diluentes diferentes: Meio Comercial 1 (MC1), Meio Comercial 2 (MC2) e o meio proposto por Kenney et al. (1975) reproduzido no LEBRE, ambos a base de leite em pó desnatado, glicose e antibióticos.

Já para a avaliação do congelamento de sêmen, os animais foram submetidos a repetidas coletas com intervalo de 48 horas, até completar 5 ejaculados de cada animal. Estes que foram divididos em dois tratamentos diferentes: congelamento em Máquina automática, e em sistema Geladeira/vapor de nitrogênio líquido (N₂), totalizando 15 amostras para cada tratamento. Para os dois tratamentos foram utilizados os mesmos meios diluentes para a centrifugação, Botusêmen®, e congelamento, Botucrio®.

3.3. Coleta e avaliação do sêmen

O sêmen foi coletado pelo método de vagina artificial (Imagem 5), segundo descrito por Fernandes (2012). Usando como manequim, jumentas em estro natural ou induzido, devidamente contidas e com sinais aparentes de cio (HENRY et al., 1987).

Imagem 5. Momento da coleta de sêmen.



Fonte: Silva Neto (2016)

Cada ejaculado passou por análises iniciais de volume total e de gel, motilidade total, vigor e concentração espermática, seguindo as recomendações descritas por Ker (2009), além de volume total do ejaculado (Imagem 6) e fração de gel. Para o sêmen submetido à refrigeração, logo após a adição dos meios diluentes foram repetidas as análises de motilidade total e vigor, sendo este o momento 0 hora. A avaliação se repetiu novamente a cada 12 horas até completar um período de 72 horas, totalizando sete avaliações por ejaculado para cada meio diluente utilizado.

Imagem 6. Volume total do ejaculado



Fonte: Silva Neto (2016)

As avaliações para o processo de congelamento do sêmen asinino foram divididas em três fases distintas, sendo estas: Sêmen Fresco, Sêmen Pós-centrifugado (ressuspendido no meio crioprotetor) e Sêmen Pós-congelamento. Onde essa ultima fase foi dividida em dois tratamentos: congelamento em Máquina automática e sistema Geladeira/vapor de N₂. Aqui foram avaliados os mesmo parâmetros do sêmen refrigerado.

Todas as avaliações de motilidade total e vigor espermático foram realizadas no sistema “duplo-cego”, onde duas pessoas avaliam estas variáveis e o resultado considerado é a média das duas avaliações, de maneira que não existiu diferença maior que 10% entre as duas avaliações.

3.4. Refrigeração do sêmen

Posteriormente a avaliação inicial, os ejaculados foram diluídos até chegar a concentração de aproximadamente 50×10^6 espermatozoides viáveis/ml, com três meios diluentes distintos. Transferiram-se alíquotas de três ml da diluição de cada meio testado para bolsas plásticas, e separados nos containers (Imagem 7) de acordo com os momentos de avaliação. A refrigeração do sêmen ficou por conta do sistema descrito e testado por Machado et al. (2002).

Imagem 7. Container utilizado para refrigeração passiva do sêmen



Fonte: Silva Neto (2016)

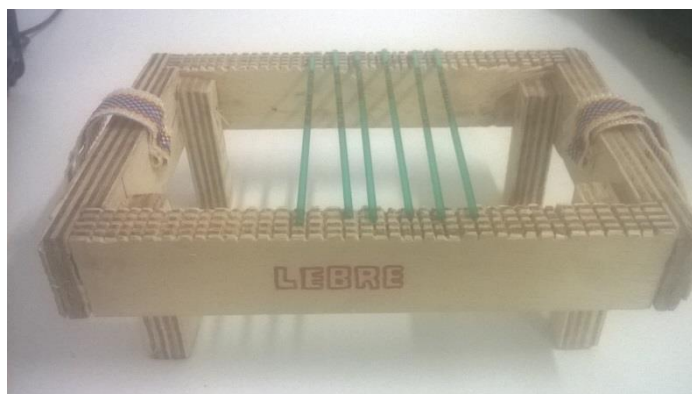
3.5. Congelamento do sêmen

Após a avaliação das coletas, somente foram congeladas as amostras que se apresentaram com motilidade igual ou superior a 70%, vigor superior a 3, tal como preconizado por CRBA (1998). As doses coletadas foram divididas em alíquotas contendo cerca de 150×10^6 espermatozoides viáveis para cada palheta que foi congelada, diluídas na proporção de 1:1 com meio diluente comercial para centrifugação, e então depositadas em tubos falcon de 14 ml, para centrifugação a 600 G por 10 minutos a temperatura ambiente (ALMEIDA, 2006).

Após a centrifugação o plasma seminal foi imediatamente desprezado, e o “pellet” que restou foi ressuscitado em meio diluente comercial, a base de gema de ovo, glicerol e amidas. Logo após, a mistura foi envasada em palhetas de polietileno de 0,5 ml previamente identificadas. Após o envase, as palhetas foram lacradas com álcool polivinílico.

As palhetas do Grupo Geladeira foram alocadas em uma estante artesanal própria para o congelamento (Imagem 8), e levadas para Geladeira, para serem refrigeradas e estabilizadas a 5°C durante 20 minutos. Após esse período, a estante com as palhetas foi colocada em um isopor com N₂ a uma distancia de 4 cm acima deste, permanecendo 20 minutos no vapor, atingindo cerca de -120° C, e em seguida foram submersas no líquido e estocadas em um botijão criogênico a -196° C (FÜRST, 2006).

Imagem 8. Palhetas distribuídas em estante de congelamento produzida no LEBRE.



Fonte: Silva Neto (2016)

As palhetas do Grupo Máquina (Imagem 9) foram dispostas no porta palheta, que foi colocado no sistema de refrigeração para rodar a curva de temperatura até 5° C, permanecendo nesta temperatura por mais 1 hora para estabilizar o sêmen. Após a estabilização, a parte central do porta palheta foi mergulhada no recipiente com nitrogênio líquido (5 cm de altura) onde chega até -120° C, com a Máquina indicando o fim do congelamento. Logo após as palhetas foram armazenadas no botijão de N₂ a -196° C.

Imagem 9. Máquina automática de congelamento de sêmen.



Fonte: <http://www.espacovet.com.br/>

3.6. Análises estatísticas

Os dados obtidos das variáveis estudadas são apresentados como média e seus respectivos desvios padrão, como medidas de tendência central. Para análise, foi empregando a análise de variância (ANOVA). Nos casos em que houve significância no teste F ($P \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. O programa computacional Sigma Stat 3.1, foi empregado em todas as análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características seminais de Jumentos Nordestinos

Nos valores encontrados para os padrões espermáticos de jumentos, foi observada diferença estatística apenas entre os quesitos concentração total do ejaculado, e volume de gel ($P < 0,05$), nos demais padrões avaliados, os asininos mantiveram o mesmo padrão, como podemos observar na tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão das características do sêmen fresco de jumentos Nordestinos: Motilidade total, vigor espermático, concentração por ml e total, volume de sêmen e volume de gel.

Animal	Motilidade (%)	Vigor	Concentração /ml	Concentração total	Vol. Sêmen (ml)	Vol. Gel (ml)
1	89 ± 2,2	3,8 ± 0,45	124,4 ± 44,7	4344,4 ± 753,6	41,6 ± 24,2	14,4 ± 10,9 ^A
2	90 ± 3,5	4,4 ± 0,55	158,4 ± 48,6	3352,2 ± 1722,4 ^A	22 ± 9,2	1,2 ± 0,6 ^B
3	89 ± 2,2	3,8 ± 0,45	197,6 ± 49	6304,4 ± 1278,9 ^B	32,4 ± 3,8	2,6 ± 3,1 ^B
Média	89,3 ± 2,5	4 ± 0,5	160,1 ± 51,9	4667 ± 1698	32 ± 16,2	6,06 ± 8,3

AB/ letras na coluna quando diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os valores para o volume do ejaculado encontrados corroboram com os dados já descritos na literatura, que demonstram amplitude de 10 a 180 ml, sendo que os valores mais comuns estão em torno de 40 ml de média (NISHIKAWA, 1959; HENRY et al., 1987; SANTOS, 1994). Já a presença de gel no ejaculado, onde foi constatada diferença estatística ($P < 0,05$), é considerada uma característica individual dependente do jumento, época do ano, frequência de coleta, excitação sexual e da idade (NISHIKAWA, 1959; GEBERS, 1995), neste caso diferindo apenas o indivíduo.

No trabalho realizado por Kreuchauf (1984), no qual utilizaram jumentos Africanos, os valores médios para a concentração espermática por mL variam desde 100 a 800 x 10⁶ de espermatozoides, corroborando com o presente trabalho, que encontrou média geral de 160,1 ± 51,9 x 10⁶/ml, semelhante entre os animais.

A média de motilidade total encontrada no sêmen fresco neste trabalho é equivalente estatisticamente a diversos trabalhos encontrados na literatura (CANISSO et al., 2008; ROTA et al., 2008; KER, 2009; DE OLIVEIRA, 2010; CONTRI et al., 2011) conforme podemos observar na tabela 2. Diante disto entendemos que o sêmen do jumento Nordeste mantém padrão semelhante aos das outras raças de asininos.

Outro parâmetro avaliado foi o vigor espermático, que constitui a avaliação subjetiva da força e velocidade espermática classificado por Walton (1952) numa escala de 0 a 5. No presente estudo, o vigor espermático médio registrado para o sêmen fresco foi de 4 ± 0,5,

valor acima do que preconiza o CBRA (1998), e corrobora com Henry et al. (1987), que avaliou vigor médio em jumentos da raça nordestina em 4,2.

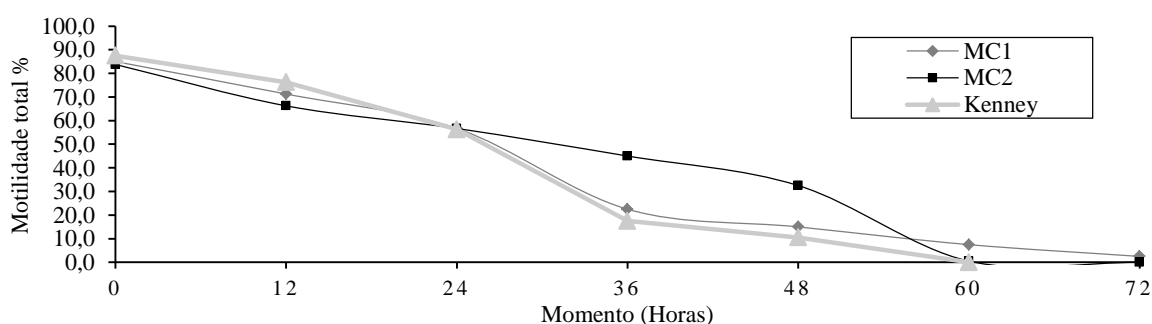
Tabela 2. Motilidade total para o sêmen fresco de asininos em diferentes estudos.

Autores	Ano	Motilidade espermática total (%)
CANISSO et al.	2008	84,20 ± 6,0
ROTA et al.	2008	94,00 ± 3,5
KER	2009	83,07 ± 3,8
DE OLIVEIRA	2010	83,00 ± 2,5
CONTRI et al.	2011	91,00 ± 5,1

4.2. Sêmen asinino refrigerado

Avaliando-se o efeito de momento, dentro dos grupos, com relação à motilidade espermática, foi constatado uma redução progressiva ($p < 0,05$) para todos os grupos (Gráfico 1), que demonstraram um padrão de redução estatisticamente similar. Concordando com Farrás et al. (2014), que avaliaram o meio Botusêmen® com sêmen equino em duas temperaturas diferentes, e mostram que a motilidade total apresenta diferença em todos os momentos avaliados, sendo cada momento inferior ao seu antecessor. Pois o armazenamento superior a 24 horas pode desencadear processos bioquímicos que comprometem a fertilidade dos gametas, como a capacitação espermática prematura (POMMER et al. 2002), instabilidade nuclear, perda de componentes intracelulares e, em especial, da peroxidação lipídica (AMANN & GRAHAM, 1993) causando inevitável morte celular.

Gráfico 1 - Distribuição das médias da motilidade total, de jumentos Nordestinos submetidos à diluição com três meios diferentes, no decorrer de três dias, com avaliações a cada 12 horas.



Ainda com relação à motilidade, ao compararmos as médias dos grupos entre si, em cada momento avaliado, não foram constatadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) demonstrando uma similaridade para todos os meios usados nas características de conservação espermática asinina.

Tabela 3. Distribuição das médias da motilidade total, de jumentos Nordestinos submetidos à diluição com três meios diferentes, no decorrer de três dias, com avaliações a cada 12 horas.

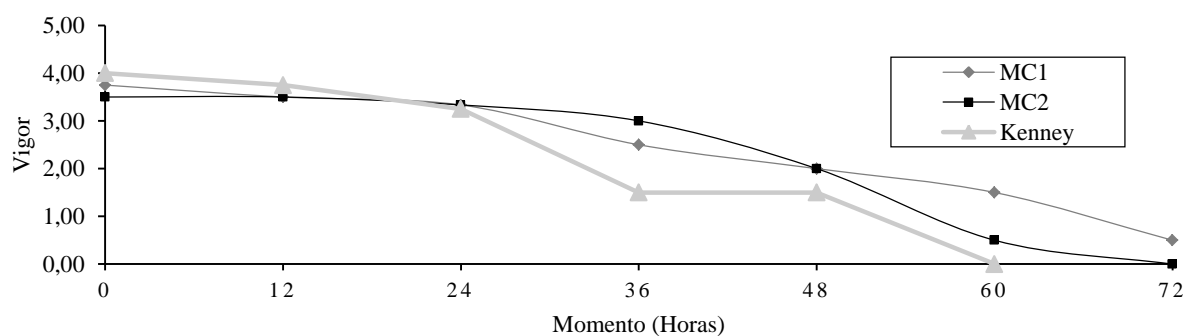
Tratamentos	Momentos da refrigeração (Horas)						
	0	12	24	36	48	60	72
MC1	85,0	71,3	56,7	22,5	15,0	7,5	2,5
MC2	83,8	66,3	56,7	45,0	32,5	0,5	0,0
Kenney	87,5	76,3	56,3	17,5	10,5	0,0	0,0

Avaliando o gráfico 1 e a tabela 3 observamos que até às 24 horas todos os grupos se mantêm com o padrão de motilidade aceitável (WBFSH, 2016; CBRA, 1998). Sugerindo um possível bom resultado em taxa de prenhez utilizando sêmen asinino refrigerado até esse momento, pois as doses de sêmen para refrigeração e envio são de aproximadamente 1×10^9 espermatozoides viáveis, e estudos comprovam que doses entre cerca de 100 e 500 milhões de células espermáticas podem ser utilizadas com eficiência (BRANDÃO et al., 2003; XAVIER, 2006).

Porém apesar da ausência de diferença estatística, apenas o MC2 apresenta valor de motilidade com média acima de 30 % no momento 36, se estendendo até 48 horas. Enquanto o meio Kenney e o MC1 já apresentam valor inferior, limite sugerido como ponto de corte para a utilização de sêmen (CBRA, 1998). Podendo levar a redução das taxas de prenhez após esse momento. No momento 60 horas nenhum dos meios testados apresentam motilidade espermática satisfatória.

Na análise do vigor espermático (Gráfico 2) com relação ao efeito momento em cada grupo, foi constatado que ocorreu um comportamento similar ao da motilidade, com os três grupos se comportando estatisticamente semelhante ($p < 0,05$). Concordando com Silva (2011), onde comparam as médias de vigor espermático armazenados em Geladeira a 5° C até o período de 72 horas.

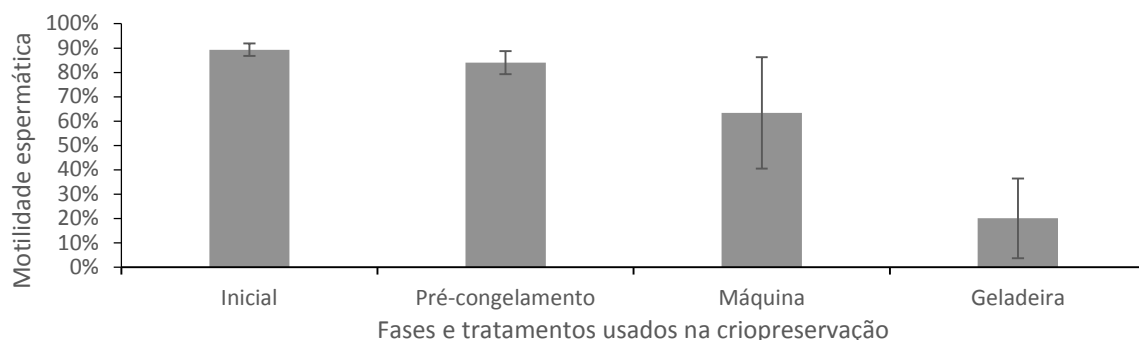
Gráfico 2 - Distribuição das médias do Vigor espermático, de jumentos Nordestinos submetidos a diluição com três meios diferentes, no decorrer de três dias, com avaliações a cada 12 horas.



4.3.Sêmen asinino congelado

Com relação à motilidade total, as fases Inicial e Pré-congelamento não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas entre si. Quando comparados, as duas fases iniciais com a fase de pós-descongelamento, foi encontrada diferença considerável ($p < 0,05$). Os dois tratamentos efetuados na fase de pós-descongelamento também diferem entre si ($p < 0,05$), com resultado superior para o tratamento Máquina, como descrito na Gráfico 3.

Gráfico 3 - Distribuição das médias e desvio padrão da motilidade espermática de jumentos Nordestinos submetidos a criopreservação de sêmen. Nas fases pós a coleta (Inicial), pós centrifugação e adição de crioprotetor (Pré-congelamento) e descongelados, após congelamento nos tratamentos Máquina e Geladeira.

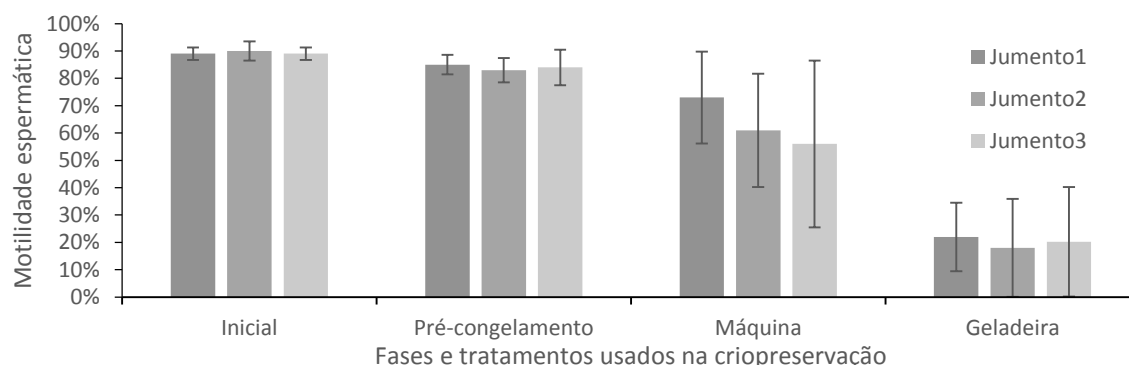


A motilidade do sêmen fresco apresentou média de 89,3% enquanto que a motilidade do sêmen pós-centrifugado apresentou 84%, não demonstrando diferenciação estatística e se mantendo acima dos valores preconizados pelo CBRA (1998) para o congelamento. Na fase de pós-descongelamento, o tratamento Máquina se sobrepôs ao tratamento Geladeira, que não atingiu o requisito mínimo de 30% de motilidade proposto pelo CBRA (1998) para aprovação de seu uso, com médias totais de 63,3 e 20,1% respectivamente.

Os valores encontrados para a motilidade total no tratamento Máquina foram superiores aos encontrados na literatura (ARRUDA et al., 1989; SILVA et al., 1997; OLIVEIRA, 2005; CANISSO, 2008) que relataram valores próximos a 40% de motilidade para o sêmen asinino descongelado. Papa et al. (1999) verificaram motilidade total com valores superiores a 50% utilizando meio M9H (Merck + Gema + Kenney e meio de cultura celular BME), associado ao glicerol. Ambos os autores utilizaram a técnica de Geladeira/vapor de N₂. O resultado superior obtido pelo sistema de Máquina automática de congelamento pode ser associado ao controle eletrônico das curvas de resfriamento e congelamento, obtendo uma variação da fonte de frio padronizada, causando mínimos efeitos deletérios aos espermatozoides.

Quando comparados individualmente e dentro de uma mesma fase (Gráfico 4), todos os asininos se comportaram de maneira estatisticamente semelhante ($P > 0,05$), mantendo o mesmo padrão dentro de cada fase e demonstrando a padronização do experimento.

Gráfico 4 - Distribuição das médias individuais (desvio padrão) da motilidade espermática de jumentos Nordestinos submetidos a criopreservação de sêmen. Nas fases pós a coleta (fresco), pós centrifugação e adição de crioprotetor (pré-congelamento) e descongelados, após congelamento nos tratamentos Máquina e Geladeira.



Na Tabela 4 podemos observar as médias individuais, e média geral da motilidade total do sêmen asinino nas três fases do experimento.

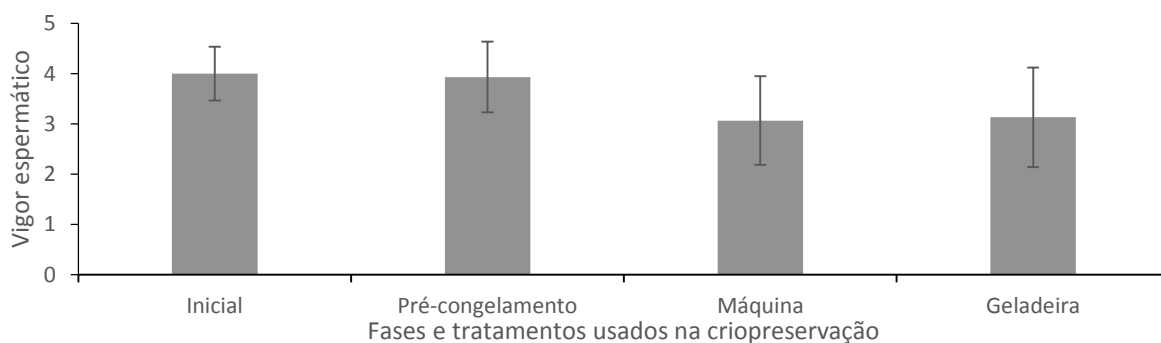
Tabela 4. Médias e desvio padrão das repetições da motilidade espermática dos jumentos Nordestinos submetidos a criopreservação de sêmen. Nas fases pós a coleta (Inicial), pós-centrifugação e adição de crioprotetor (Pré-congelamento) e descongelados, após congelamento na Máquina e na Geladeira.

Resposta da Motilidade espermática total nas fases do congelamento				
	Inicial	Pré-Congelamento	Congelamento Máquina	Congelamento Geladeira
Jumento1	89 ± 2,6	85 ± 3,5	73 ± 16,8	22 ± 12,5
Jumento2	90 ± 3,5	83 ± 4,5	61 ± 20,7	18 ± 17,9
Jumento3	89 ± 2,2	84 ± 6,5	56 ± 30,5	20 ± 20,0
Média	89,3 ± 2,6^A	84 ± 4,7^A	63,3 ± 22,9^B	20,5 ± 16,4^C

AB Letras na linha quando diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

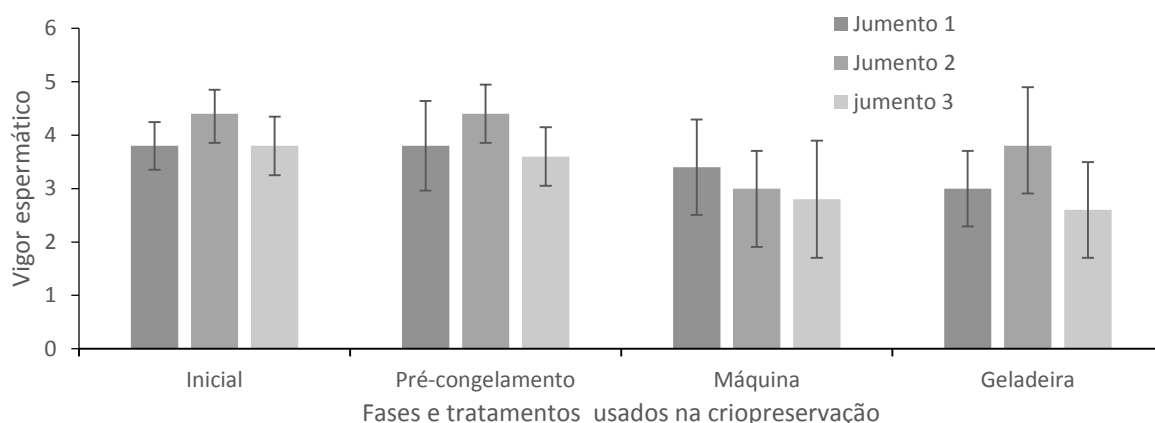
Na análise de vigor espermático as fases de inicial e pós-centrifugado não apresentaram diferenças estatísticas entre si, assim como na fase pós-congelamento, onde os dois tratamentos (Máquina e Geladeira) não apresentaram diferenças ($P > 0,05$). A diferença encontrada nessa avaliação foi entre as duas primeiras fases, em relação à fase de pós-descongelamento ($p < 0,05$), onde esta última apresentou-se com números inferiores as duas primeiras, como pode ser observado no gráfico 5.

Gráfico 5 - Distribuição das médias e desvio padrão do vigor espermático de jumentos Nordestinos submetidos a criopreservação de sêmen. Nas fases pós a coleta (Inicial), pós centrifugação e adição de crioprotetor (Pré-congelamento) e descongelados, após congelamento nos tratamentos na Máquina e Geladeira.



Ao serem comparados entre si (Gráfico 6), os animais se comportaram de forma semelhante dentro de cada uma das três fases distintas, assim como nos dois tratamentos realizados, mantendo um padrão estatisticamente semelhante ($p < 0,05$).

Gráfico 6 - Distribuição das médias individuais e desvio padrão do vigor espermático de jumentos Nordestinos submetidos a criopreservação de sêmen. Nas fases pós a coleta (Inicial), pós centrifugação e adição de crioprotetor (Pré-congelamento) e descongelados, após congelamento na Máquina e na Geladeira.



O processo de congelamento ocasiona redução da viabilidade espermática. Porém, a metodologia empregada no experimento no tratamento em Máquina, possivelmente, foi capaz de minimizar as lesões ocasionadas durante o processamento do sêmen. Isso mostra que os procedimentos precedentes, como diluição inicial em meio de centrifugação, centrifugação (600g/10 minutos), ressuspensão no meio diluidor de congelamento, envase (palheta de 0,5 ml), resfriamento e congelamento em Máquina automática são provavelmente viáveis para espécie. Resultado este que não conseguimos alcançar com os procedimentos utilizados no sistema Geladeira/vapor de N₂, o que pode ser relacionado à difícil padronização, uma vez que diversos fatores podem provocar variações como: marca e modelo da Geladeira, tipo de

caixa isotérmica, número de doses a serem congeladas e o nível de N₂ (RODELLO et al., 2005).

5. CONCLUSÕES

Concluimos que os parâmetros para o sêmen fresco dos Jumentos Nordestinos se mostraram compatíveis com os já descritos na literatura para os demais asininos. Todos os meios diluentes de refrigeração se mostraram eficazes na manutenção da viabilidade espermática até o momento 24 horas *in vitro*. Para o congelamento, o tratamento Máquina automática se demonstrou eficiente na criopreservação de espermatozoides de asininos *in vitro*, enquanto o tratamento Geladeira/vapor de N₂, no protocolo utilizado, não demonstrou resultado satisfatório para sua utilização na inseminação artificial.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino**. Dissertação de Mestrado em Agronomia. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2006.
- ALMEIDA, L.D. **Diversidade genética de raças asininas no Brasil, baseada na análise de locos microssatélites e DNA mitocondrial**. Dissertação de Mestrado. Brasília: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 83 p. 2009.
- ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTER, C.; PARSLEY, M. Artificial insemination and preservation of semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. 8: 205-18; 1992.
- ALVARENGA, M.A.; LANDIM E ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *Proceedings...* **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 6, p. 541-545, 2000.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.R. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Ed.) Equine Reproduction. **Philadelphia: Lea & Febiger**, p. 715-745, 1993.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo, 2000. 120 p. tese (Tese de Livre Docência em Reprodução Animal) FMVZ – Universidade de São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; BARBOSA, R.T.; MANZANO, A. Congelação do sêmen de jumentos: características reprodutivas de um doador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, (Supl. 1), p. 215-216, 1989.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**. v. 22, n. 6, p. 1061-1069, 2001.
- BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.48, n.3, p.391– 417, 1997.
- BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, n.3-4, p.181-190, 2001.
- BIELANSKY, W. Künstliche Besamung beim Pferd. In: BUSCH, W.; LÖHLE, K.; PETER, W. **Künstliche Besamung beim Nutztieren**. Stuttgart: Enke, p. 464-490, 1982
- BRANDÃO, F.Z.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; SATURNINO, H.M.; VIANA, W.S.; DANTAS, M.S.; OLIVEIRA, H.N. Efeito da concentração espermática e do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 55, n. 1, p. 61-67, 2003.

CANISSO, I. F.; CARVALHO, G. R.; TORRES, C. A. A.; GUIMARAES, J. D.; SOUZA, F. A.; SILVA, E. C. Sexual behavior of jacks when na estrous mare is used in semen collection. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n-3-4, p. 314, 2008.

CANISSO, I.F. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da Raça Pêga**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Zootecnia, 2008. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

CONTRI, A.; GLORIA, A.; ROBBE, D. DE AMICIS, I.; CARLUCCIO, A.; Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. **Theriogenology**. 2011.

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

DE OLIVEIRA, R.R. **Efeito in vitro da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoides criopreservados de jumentos (*equus asinus*) da raça Pêga**. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG. 2010.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE OBRAS CONTRA SECA. **Perímetro irrigado de São Gonçalo**. Disponível em:
http://www.dnocs.gov.br/~dnocs/doc/canais/perimetros_irrigados/pb/sao_goncalo.htm Acesso em: 08 de Agosto de 2016.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**. (Suppl.), v. 47, p. 243-255, 1993.

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

FÜRST, R.; CARVALHO, G. R.; FÜRST, M. C. O. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino**. Tese Doutorado – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

GEBERS, A.M. **Emissão diária de espermatozoides e algumas características reprodutivas de jumentos da raça Pêga**. Viçosa: Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1995. 90p. Dissertação (mestrado em Zootecnia) DZO – UFV, 1995.

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

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **In: Reprodução animal**. 7 ed. Editora Manole, 2004. 513 p.

HECKENBICHLER, S.; DEICHSEL, K.; PETERS, P; AURICH, C. Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the of insemination. **Theriogenology**. V. 75, p. 849 – 856, 2011.

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.

HENRY, M.; FIGUEIREDO, A. Z. F.; PALHARES, M. S.; CORYN, M. Clinical and endocrine aspects of the oestrus cycle in donkeys (*Equus asinus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 35, p. 297-303, 1987.

HENSON, L. L. In situ conservation of livestock and poultry. **FAO Animal Production & Health**. Paper 99, p. 112, 1992

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance os species an individual differences. **Theriogenology**. 53: 47-58; 2000.

INSTITUTO FEDERAL DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Censo Agropecuário 2011**. Disponível em:
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_pdf.shtm. Acesso em: 03 de setembro de 2016;

KAYSER, J.P.; AMANN, R.P; SHIDELER, E.L.; JASKO, D.J.; PICKETT, B.W. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p .601-614, 1992.

KENNEY, R. M.; BERGAGMAN, R. V.; COOPER, W, L. Minimal contamination techniques for breeding mares. Technique and preliminary findings. **Proceedings American Association of Equine Practitioners**, v. 21, p. 327 – 336, 1975.

KER, P.G. **Fertilidade do sêmen congelado de jumento (*Equus asinus*) da raça Pêga em éguas inseminadas pré e pós-ovulação**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2009.

KREUCHAUF, A. Reproductive physiology in the jackass. **Animal Research Development**, v. 20, p. 51-78, 1984.

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extend semen. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, p. 467-485, 1991.

LIPAR, J.L.; KETTERSON, E.D.; NOLAN, V.J.R.; CASTRO, J.M. Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, n. 2, p. 220-227, 1999.

LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics Equine.**, n. 22, p. 663–676, 2006.

LOOMIS, P. R.; SQUIRES, E. L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, p. 480 – 491, 2005.

LOVE, C.C. Semen collection techniques. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.8, p.111-128, 1992.

MACHADO, M.S.; LEÃO, K.M.; GOMES, G.M.; MACEDO, L.P.; ALVARENGA, M.A. Efeitos de diferentes sistemas de transporte sobre a qualidade do sêmen refrigerado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p.194-196, 2002.

MARIANTE, A.S; CAVALCANTE, N. Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil. Brasília: **Embrapa Sede / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. 274 p. 2006.

MCKINNON, A.O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. **Australian Equine Veterinary Journal**, v. 14, n. 4, p. 156-175, 1996.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk an easy method cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

NISHIKAWA, Y. Studies on reproduction in horses. **Tokyo: Japan Racing Association**, 340p. 1959.

NOBRE, F.V. Os equídeos no Brasil, especialmente, no Nordeste. **I Congresso Brasileiro de Zootecnia – XVII reunião da sociedade Brasileira de Zootecnia**. 26 p. 1980.

NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 1/2, p. 42 – 56, jan./jun. 2006.

OLIVEIRA, J.V. **Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumento (*Equus asinus*) por meio de testes laboratoriais e fertilidade**, Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, 2005. 108 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – FMVZ – Universidade Estadual Paulista, 2005.

PADILLA, A.W., FOOTE, R.H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **Journal Animal Science**, v.69, p.3308-3313, 1991.

PAPA, F. O.; MEIRA, C.; SIMON, J.J. Pregnancies in mares using donkey (*Equus asinus*) frozen semen. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 27, p. 262, 1999.

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.

PUGH, D. G. Donkey reproduction. **Proceedings of Annual Convention of the AAEP**, vol. 48, p. 113-114, 2002.

RICHARDSON, G.F.; WENKOFF, M.S. Semen collection from a stallion using a dummy mount. **Canadian Veterinary Journal**, v.17, p.177-180, 1976.

ROCHA, N. M. A. **Taxa de gestação em éguas inseminadas com sêmen resfriado de jumentos, utilizando diluidor a base de leite desnatado – gema de ovo com duas concentrações de glicose.** 190 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2012.

RODELLO, L.; AZEVEDO, H. C.; BICUDO, S. D.; MAIA, M. S.; SOUSA, D. B.; SICHERLE, C. C. Comparação entre sistemas automatizado e geladeira/vapor de nitrogênio líquido na criopreservação de sêmen ovino. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. 16. **Anais: Resumos.** Goiânia, GO. 2005.

ROTA, A.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Effect of extender, centrifugation and renewal of seminal plasma on cooled-preserved *Amiata* donkey spermatozoa. **Theriogenology**, v. 69, p. 176-185, 2008.

SAMPER, J. C.; MORRIS, C. A. Current methods for a stallion semen cryopreservation: A survey. **Theriogenology**, v. 70, p. 895-03, 1998.

SANTOS, O.E.C. **Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre características físicas e morfológicas dos espermatozoides de jumentos (*Equus asinus*) preservados a 5°C.** 1994, 82 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1994.

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**, 1; 62(5): 915-28, 2004.

SILVA, R.P.; LEÃO, K. M.; MOUTINHO, E. P. M.; SILVA, N. C.; RODRIGUES, M. C.; SILVA, M. A. P. Avaliação de dois diluentes de refrigeração e o efeito da presença do plasma seminal sobre a viabilidade do sêmen equino refrigerado. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 20, Ed. 167, Art. 1126, 2011.

SILVA, S.S.; HENRY, M.; NUNES, S.A. Influência do sistema de envasamento sobre a qualidade espermática de jumentos (*Equus asinus*) avaliada “in-vitro” pós-descongelação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 21, n. 3, p. 140-146, 1997.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K. Principles of cryopreservation. **In: Cooled and frozen Stallion Semen**, b. 09, 1999.

TISCNER, M.; KOSINIAK, K. Techniques for collection and storage of stallion semen with minimal secondary contamination. **Acta Veterinaria Scandinavica**, (suppl) 88: 83- 90. 1992

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.5, p.505-514, 1999.

WALTON, A.A. Flow orientation as a possible explanation of “wave motion” an “rheotaxis” of spermatozoa. **Journal of Experimental Biology**, v. 29. p. 520-531, 1952.

WBFSH. World Breeding Federation for Sport Horses. Disponível em: <http://www.wbfs.org>. Acesso em outubro de 2016.

XAVIER, I. L. G. S. **Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen a fresco diluído, no corpo ou ápice do corno uterino, utilizando diferentes números de espermatozoides por dose inseminante.** 158 f. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

YILDIZ, C.; KAYA, A; AKSOY, M. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, p. 579-585, 2000.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina.** Botucatu: UNESP. Tese (Doutorado), 121 p.1998.