

Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado

Factors related to the success of artificial insemination of mares with cooled semen

Daniela Brandão Nunes¹, Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari², Eliane Vianna da Costa e Silva³

¹Médica Veterinária Autônoma, Rua Amélia Tognini, 158, Bairro Jardim Mansur, Campo Grande, MS, CEP 79051-750, Brasil.

²Departamento de Zootecnia, ³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, CEP 79070-900, Brasil.

Correspondência: nunesdb@nin.ufms.br; zuccari@nin.ufms.br; licsilva@nin.com.br

Resumo

A inseminação artificial (IA) com sêmen equino refrigerado tem se difundido entre os haras, pois possibilita utilizar garanhões geneticamente superiores, direcionando melhor os acasalamentos. A obtenção de boas taxas de prenhez depende, além da frequência e momento da IA, de fatores relacionados com a refrigeração do sêmen, tais como: equipamento utilizado para transporte, taxa de refrigeração, temperatura final de estocagem, tempo de preservação, taxa de diluição, concentração e volume da dose inseminante e variação individual entre garanhões, aspectos abordados na presente revisão.

Palavras-chave: equino, inseminação artificial, sêmen refrigerado.

Abstract

Artificial insemination (AI) with cooled semen in equine is widely used because it allows the use of genetically selected stallions in breeding programs. Obtaining good pregnancy rates depends not only on the frequency and the moment of the AI, but also on factors related to the semen cooling, such as the equipment used in transportation, the cooling rate, the final temperature of preservation, the time of preservation, the dilution rate, the concentration and volume of the dose used for insemination and the individual variation among stallions. All these aspects are dealt with in the present review.

Keywords: equine, artificial insemination, cooled semen.

Introdução

O armazenamento e o transporte de sêmen, seja pela congelação ou refrigeração, permitem direcionar melhor os acasalamentos por meio 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 Monta Natural (MN) ou IA com sêmen a fresco ou refrigerado (Ball, 1998a; Backman *et al.*, 2004). Dessa 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 se encontram os garanhões.

Padilla e Foote (1991), Amann e Graham (1993) citam que a manutenção da fertilidade dos espermatozoides é importante durante a refrigeração, o transporte até o momento da inseminação. Qualquer alteração que ocorra durante a produção, a 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 na IA, os espermatozoides deverão apresentar integridade funcional e estrutural até o momento da fertilização.

A presente revisão tem como objetivo descrever as lesões celulares induzidas pelo frio, bem como abordar aspectos relacionados com a preservação espermática pela refrigeração que depende de vários fatores, tais como: equipamento utilizado para o transporte do sêmen, taxa de refrigeração, temperatura e tempo de preservação, taxa de diluição, concentração e volume da dose inseminante, variação individual entre garanhões, frequência e momento da IA, além de relatar a importância da avaliação do sêmen refrigerado, aspectos primordiais na obtenção de boas taxas de prenhez.

Fatores que afetam a qualidade do sêmen equino refrigerado

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 espermatozóides 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 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 fluido 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 membrana plasmática afetada pelo frio pode sofrer mudanças na sua permeabilidade, que resulta em alterações funcionais e metabólicas, prejudicando a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozóides (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 fluido, 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 equino 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 e reduz a temperatura na qual esta passa pela fase de transição e, em altas concentrações, pode eliminar esta fase (Kirk *et al.*, 2001). Parks e Lynch (1992) verificaram um alto grau de resistência dos espermatozóides de galos às taxas rápidas de refrigeração, e isso deve estar relacionado aos componentes glicolipídicos da membrana dos espermatozóides desta espécie. Kirk *et al.* (2001) relataram uma melhora da motilidade espermática ao adicionar colesterol no meio diluidor para refrigeração de sêmen equino 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 membrana plasmática têm importante papel na adesão entre as células, 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.

O resfriamento pode induzir a ruptura acrossomal (Bedford *et al.*, 2000) acarretando uma redução da fertilidade. Segundo Pommer *et al.* (2002), o diluente à base de leite desnatado facilita a capacitação espermática quando comparado ao meio Tyrode's. A redução da temperatura de 38 para 30°C de uma amostra de sêmen contendo células com membranas instáveis, devido à capacitação, já é o suficiente para desencadear a reação do acrossomo (Gadella *et al.*, 2001). Desta forma, deve-se sempre estar atento aos danos que o diluente e a curva do resfriamento utilizados podem causar ao acrossoma.

Portanto, protegendo-se as membranas celulares e as funções espermáticas durante a refrigeração até o momento da inseminação, espera-se 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).

Equipamentos utilizados para a refrigeração e o transporte do sêmen equino

Consultando a literatura, Silva Filho *et al.* (1994) compilaram as metodologias empregadas para a preservação do sêmen equino 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 de resfriamento lenta (ideal = -0,33°C /min.); c) manutenção da temperatura pelo maior tempo possível após a estabilização (4-8 °C); d) proteção do sêmen; e) estrutura forte, para permitir o uso de diferentes meios de transporte e f) serem simples, baratos, leves e de fácil manuseio.

Existem sistemas ativos e passivos para a preservação do sêmen, sendo que os passivos possuem a

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

vantagem de ser mais baratos, porém possuem taxa de refrigeração dependente de fatores como a temperatura ambiente, o volume e a 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, em que 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}. Esses 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 de estes 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. Estas eram mais rápidas em condições laboratoriais, com a temperatura em torno de 22°C, que aquelas obtidas ao submeter o *container* ao transporte rodoviário, quando da ocorrência de insolação direta sobre o mesmo. As taxas de resfriamento foram, respectivamente, de -0,25°C e -0,11°C / minuto na primeira e segunda condição. Portanto, deve se ter cautela na utilização de equipamentos testados apenas em nível de laboratório. Atualmente, no Brasil, já existem modelos de *containers* comercialmente disponíveis.

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 maior longevidade espermática e fertilidade. Altas taxas de prenhez podem ser obtidas como as descritas por Douglas-Hamilton *et al.* (1984) que chegou a 91%.

Taxa de refrigeração do sêmen equino

Aurich (2005) define como conseqüências do choque térmico, conseqüência de queda de temperatura em taxas superiores àquelas indicadas para a espécie, as alterações caracterizadas por um modelo anormal de movimento 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). Nesta faixa de temperatura, 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 iniciais de refrigeração superiores a -1°C/min., como taxas de refrigeração muito lentas (<0,05°C/min) eram deletérias para a motilidade e morfologia espermáticas. Em função disso, os pesquisadores desenvolveram um *container* capaz de prover uma taxa de refrigeração inicial de aproximadamente -0,3°C/min. Province *et al.* (1985) verificaram uma redução significativa da motilidade espermática quando fizeram a imersão direta do sêmen em água a 5°C comparada a 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 ± 0,003°C/min.) (p<0,05). Por outro lado, Mattos (1995), ao utilizar uma taxa de refrigeração inicial de -1,0°C/min., não observou diferença significativa (p>0,05) entre os índices de prenhez obtidos com sêmen fresco e refrigerado a 4°C por 24 horas, sendo estes de 75,7% e 58,6%, respectivamente.

Ferreira (1993) demonstrou que os componentes do diluidor podem modificar o tempo de preservação do sêmen de jumentos *in vitro* dependendo da curva de resfriamento. Foi verificado que não houve diferença na

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.

longevidade espermática quando o sêmen diluído em meio à base de leite foi resfriado a $-0,6^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ e $-0,2^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, enquanto a taxa de refrigeração de $-0,6^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ resultou em maior longevidade, quando o sêmen foi diluído em meio à base de gema de ovo.

Parece haver consenso entre os pesquisadores sobre a necessidade de se utilizarem 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).

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 os 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 garanhões 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 , 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. A temperatura de 5°C preservou melhor a integridade da cromatina espermática, de 7 até 46 horas de armazenamento do sêmen, quando comparada à temperatura de 20°C .

Lindsey *et al.* (2005), procurando avaliar qual seria a temperatura ideal para o armazenamento dos espermatozoides, por um período de 18 horas, antes do processo de sexagem, verificaram que, 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 que objetivaram verificar a temperatura ideal de estocagem para o sêmen equino diluído. Alguns trabalhos demonstram que a preservação entre 15 e 20°C é mais eficaz na conservação das características seminais e fertilidade, enquanto outros afirmam ser superior a estocagem entre 4 e 5°C .

A conservação da viabilidade espermática por pelo menos 24 horas é importante, pois este é, na maioria das vezes, o tempo necessário para que as amostras de sêmen dos garanhões sejam transportadas e recebidas 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 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 membrana plasmática 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 para a importância do estresse oxidativo, causado pelas espécies reativas de oxigênio, sobre a função espermática do sêmen preservado por longos períodos. Os autores sugerem que a H_2O_2 parece ser a espécie reativa de oxigênio que provoca maiores danos aos espermatozoides, caracterizados pela perda de motilidade.

A alta concentração de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática dos espermatozoides favorece o estresse oxidativo sofrido por essas células (Aurich, 2005). Assim, os lipídios podem ser desestabilizados pelos radicais livres que são gerados pelos próprios espermatozoides (Ball *et al.*, 2001).

Os resíduos metabólicos, como ácido lático e/ou CO_2 , 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 glutatona peroxidase, superóxido dismutase e a catalase, presentes no plasma seminal, controlam o balanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e sua neutralização (Kankofer *et al.*, 2005).

A refrigeração do sêmen reduz a atividade metabólica do espermatozóide, portanto, a produção de espécies reativas de oxigênio. Kankofer *et al.* (2005), estudando a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico 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.

Diluição do sêmen equino para refrigeração

Os diluidores de sêmen são soluções destinadas a proteger os espermatozoides 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 análise 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 espermatozoides contra o choque térmico e essa ação protetora se deve às lipoproteínas de baixa densidade (Amann e Graham, 1993), que permanecem firmemente ligadas aos espermatozoides, em especial a lipoproteína 3 (Foulkes, 1977). Além disso, a gema de ovo estabiliza a membrana espermática pela neutralização dos componentes deletérios existentes no plasma seminal (Aurich, 2005). 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 espermatozoides.

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, glutatona 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 ao transporte do gameta masculino até o local da fertilização (Katila, 2001) e substâncias antioxidantes como a cisteína, ergotioneína e glutatona 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 *in vitro* 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 duas a seis 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.

Bedford *et al.* (1995) verificaram que a remoção do plasma seminal, quando se utilizam meios diluidores acrescidos de gema de ovo, resultou em maior motilidade total e progressiva ($p < 0,05$), se comparado ao sêmen não centrifugado. Os autores desconhecem a razão pela qual a presença de ambos, plasma seminal e gema do ovo, deprimem a motilidade, sugerindo que a associação destes componentes poderia levar à peroxidação lipídica, com produção de radicais livres.

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 ($p = 0,25$).

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.

Concentração espermática e volume da dose inseminante do sêmen equino refrigerado

Fatores como estação do ano, frequência de ejaculação, tamanho dos testículos e 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).

Vários estudos foram conduzidos, desde a década de 70, a fim de determinar a concentração espermática a ser utilizada na inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado, sendo preconizado 500×10^6 de espermatozoides móveis (Ball, 2005). Assim, um total de 1×10^9 de espermatozoides deve ser enviado para os haras, o que normalmente garante uma inseminação com 500×10^6 espermatozoides 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 $1,0 - 1,5 \times 10^9$ espermatozoides totais, pois consideravam uma redução da motilidade de aproximadamente 50%, assim, a concentração de espermatozoides 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 espermatozoides 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 úterotubária, por meio de 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 espermatozoides 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 100ml para a IA com 250×10^6 espermatozoides 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 50ml 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 100ml.

Quando se deposita o sêmen próximo à junção úterotubária, utilizando, por exemplo, a inseminação histeroscópica, volumes tão pequenos como 20 e 200 μ L 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 equino refrigerado, deve ser utilizada uma concentração média de 500×10^6 espermatozoides viáveis. Entretanto, para alguns ganhos 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 75ml garantem bons índices de prenhez, sendo esses valores recomendados.

Frequência e momento da inseminação artificial com sêmen equino refrigerado

A fertilização depende, dentre outros fatores, do sincronismo no transporte dos gametas por meio 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, uma prática que se tornou rotina entre os profissionais que trabalham com sêmen refrigerado (Shore *et al.*, 1998; Nunes *et al.*, 2004). Esta conduta, 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 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, utilizando duas e três IA a taxa de concepção / ciclo foi de 55,7%, semelhante àquela obtida com quatro ou mais IA (50,0%). Nunes *et al.* (2004) obtiveram 71,42%, 90% e 97,14% de prenhez ao 1^o, 2^o 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. Segundo Ball (1998b), esta deve ocorrer nas 24 horas que antecedem a 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 fármacos 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.

Efeito de ganhão sobre a refrigeração seminal

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

Darenius (1998) sugere que os ganhões 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 morfolologicamente normais, motilidade superior a 50% e, após 12 horas de refrigeração, uma redução da motilidade inicial não superior a 30%, considerando como motilidade mínima ao final desse período de 40%.

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 ganhões pode ser classificado como de alta e baixa qualidade. Segundo essa classificação, os ganhões 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 ganhões 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 motilidade progressiva, morfologia espermática, número de espermatozoides 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 quando se deseja preservar por 24 horas o sêmen de ganhões considerados de baixa qualidade o uso do diluidor INRA 96[®]. Este possui entre seus constituintes o fosfocaseinato, fração protéica do leite que confere proteção à membrana por estabilizá-la. Adicionalmente, eles sugerem a estocagem a 15°C, pois, dessa forma, se evita a faixa de temperatura de maior sensibilidade dos espermatozoides ao choque térmico.

A preservação do sêmen eqüino sob refrigeração pode ocasionar a redução das taxas de fertilidade. Esta queda pode estar ligada a uma característica individual de cada ganhão (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 e acetilcarnitina, verificaram uma correlação positiva de ambas com a concentração espermática e entre acetilcarnitina e espermatozoides morfolologicamente normais, indicando-as como potencial

marcador de qualidade seminal. Além disso, a correlação entre acetilcarnitina e carnitina e espermatozoides 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 espermatozoides 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 foi preservado a 5°C por até 46 horas, contrariamente, os animais subfêrteis revelaram declínio da qualidade seminal devido à maior fragmentação da cromatina entre 20 e 31 horas de 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 em suas dietas, um ácido graxo ômega 3 (Brinsko *et al.*, 2005).

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 por meio 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 predizer o real potencial de fertilidade do macho (Ball, 1998a; 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 real potencial fertilizante do espermatozóide, uma bateria de testes laboratoriais tem 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 (Graham, 2001; 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 o tipo de trajetória dos espermatozoides. As desvantagens do uso desta técnica estão relacionadas ao custo e ao tempo necessários para cada avaliação (Squires *et al.*, 1999; Aurich, 2005).

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

Testes laboratoriais que avaliam a morfologia dos espermatozoides, a integridade estrutural da membrana plasmática por meio de colorações fluorescentes (Zúccari, 1998), além daqueles que avaliam a integridade funcional, por exemplo, o teste hiposmótico (Aurich, 2005) têm sido utilizados.

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 têm utilizado testes complementares, como a avaliação da integridade da cromatina, para verificar as interações existentes entre a qualidade seminal após o resfriamento e a fertilidade (Love *et al.*, 2001; Neild, *et al.*, 2005). Provas laboratoriais que avaliam a capacitação espermática, reação do acrossoma e estrutura do DNA têm sido utilizadas, pois estes atributos são essenciais para a fertilização e o 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 por meio 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 esses 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 equina 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 equina é encontrado no ejaculado de animais portadores, sendo também importante a consideração desta doença ao se utilizar sêmen transportado. Componentes dos diluidores de sêmen, como gema de ovo e/ou leite, devem também estar livre de agentes infecciosos, caso contrário, poderão estar na origem de transmissão de contaminantes.

Como forma de se prevenir a transmissão de doenças por meio 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 contaminantes com risco de transmissão, além de ser necessária a vigilância constante por parte dos responsáveis pela colheita e recebimento dos ejaculados.

Uma combinação de provas laboratoriais deve ser utilizada para aumentar a capacidade de prever a fertilidade de um garanhão antes de este ser utilizado como doador de sêmen durante a estação de monta (Neild *et al.*, 2005).

Taxa de prenhez do sêmen equino 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. 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. Os índices de prenhez de éguas submetidas a IA em centrais especializadas foram de 80,6% (n=31) enquanto as taxas sob condições de campo foram de 52% (n=25). Em geral, espera-se uma taxa de prenhez ao 1º ciclo $\geq 50\%$ quando a monta é natural (Voss, 1993). 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 equino 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 por meio 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, enquanto a monta natural e o uso de sêmen a fresco tiveram uma queda de 49,6% e 36,9%, respectivamente. Uma possível explicação para este crescimento seria os bons índices de natalidade obtidos com o sêmen refrigerado que foram de 68,83%, não diferindo daqueles obtidos com a monta natural (69,83%) ou sêmen a fresco (74,5%). O índice de fertilidade obtida com sêmen congelado foi, neste estudo, inferior aos demais atingindo valores de 56,6%.

Revisando a literatura, verifica-se que vários índices podem ser utilizados para avaliar a eficiência reprodutiva dos equinos 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, entre outros (Tab. 1).

Amann (2005) alerta que é preciso ter 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. Ao analisar 67 trabalhos publicados, encontrou falha de avaliação em 51 (76%).



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 <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (1998)	Sêmen fresco	Ambiente	---	500 x 10 ⁶ viáveis	---	---	---	64% (n=32) Taxa de prenhez /ciclo
Gahne <i>et al.</i> (1998)	Sêmen fresco	Ambiente	---	300 x 10 ⁶ viáveis	---	---	---	75% (n=32) Taxa de prenhez /ciclo
Brandão <i>et al.</i> (2003)	Sêmen fresco	37°C	Até 60' pós-colheita	200 x 10 ⁶ viáveis	10 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	66,70% (n=30) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Brandão <i>et al.</i> (2003)	Sêmen fresco	37°C	Até 60' pós-colheita	400 x 10 ⁶ viáveis	10 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	65,50% (n=29) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Douglas-Hamilton <i>et al.</i> (1984)	Sêmen refrigerado	4°C	6-23 h	1,0 -1,5 x 10 ⁹ totais	---	1,6 IA por ciclo estral	Kenney <i>et al.</i> (1975)	65% (n=46) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Heiskanen <i>et al.</i> (1987)	Sêmen refrigerado	5-7°C	24 h	---	---	---	Kenney <i>et al.</i> (1975)	82% (n=11) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Heiskanen <i>et al.</i> (1987)	Sêmen refrigerado	5-7°C	24 h	---	---	---	Kenney <i>et al.</i> (1975) - Hepes e Teofilina	70% (n=10) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Jasko <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (1994)	Sêmen refrigerado	---	41±6 h	1,5 -2,0 x 10 ⁹ totais	40 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	87% (n=15) Taxa de prenhez ao 1º ciclo
Heiskanen <i>et al.</i> (1994)	Sêmen refrigerado e centrifugado	---	41±6 h	1,5 -2,0 x 10 ⁹ totais	40 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (1999)	Sêmen refrigerado	14°C	215 minutos	400 x 10 ⁶ viáveis	15 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	56% (n=100) Taxa de prenhez /ciclo
Zidane <i>et al.</i> (1991)	Sêmen refrigerado	5°C	48 h	500 x 10 ⁶ viáveis	20 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	40,5% (n=37) Taxa de recuperação embrionária
Zidane <i>et al.</i> (1991)	Sêmen refrigerado	20°C	48 h	500 x 10 ⁶ viáveis	20 ml	Dias alternados	Kenney <i>et al.</i> (1975)	14,3% (n=14) Taxa de recuperação embrionária
Nunes <i>et al.</i> (2004a)	Sêmen refrigerado	15-20°C	24 h	300 x 10 ⁶ viáveis	40 ml	Única - com indução OV*	Kenney <i>et al.</i> (1975)	71,42% (n=35) Taxa de prenhez ao 1º ciclo

Considerações finais

No Brasil, a utilização da IA com sêmen refrigerado em equinos é permitida pela maioria das associações de raça, possibilitando, dessa forma, ampliar o uso de garanhões geneticamente superiores. O interesse dos criadores por esta biotécnica tem crescido, sendo o Brasil o segundo país no mundo que mais realiza IA com sêmen refrigerado. Adequadas taxas de refrigeração e temperatura final de estocagem são variáveis essenciais ao sucesso do uso desta técnica e têm sido motivo de estudo de vários pesquisadores com o intuito de aumentar o tempo de manutenção da viabilidade espermática quando preservados *in vitro*. 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.

Referências

- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Estrutura da membrana. *In: Alberts et al. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula.* Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. p.354-378.
- Allen WE.** The use of hormones in the control of reproductive function in the mare. *In Pract*, v.6, p.55-60, 1984.
- Amann RP.** Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. *Theriogenology*, v.63, p.698-715, 2005.
- Amann RP, Graham JK.** Spermatozoal function. *In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). Equine reproduction.* Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.715-745.
- Aurich C.** Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.65-75, 2005.
- Backman T, Bruemmer JE, Graham JK, Squires EL.** Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *J Anim Sci*, v.82, p.690-694, 2004.
- Ball BA.** An introduction to the use and application of cryopreserved equine semen. *In: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, 1998, Davis. Proceedings...*Davis: [s.n.], 1998a. p.25-41.
- Ball BA.** Evaluation and use of transported equine semen. *In: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, 1998, Davis. Proceedings...*Davis:[s.n.], 1998b. p.18-24.
- Ball BA.** Hysteroscopic and low-dose insemination techniques. *In: Congresso Nazionale Multisala Sive, 11, 2005, Pisa. Proceedings...* Pisa, 2005. 3p. Disponível em: <http://www.evsn.it/vet.journal/scheletrooutput_ricerca.php>. Acesso em 20 de setembro de 2005.
- Ball BA, Medina V, Gravance CG, 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, 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. Disponível em: <http://www.evsn.it/vet.journal/scheletrooutput_ricerca.php>. Acesso em 20 de setembro de 2005.
- Batellier F, Magistrini M, Fauquant J, Palmer E.** Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.48, p.391-410, 1997.
- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M.** Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.181-190, 2001.
- Bedford SJ, Jasko DJ, Graham JK, Amann RP, Squires EL, Pickett BW.** Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallions spermatozoa. *Theriogenology*, v.43, p.955-967, 1995.
- Bedford S, Varner D, Meyers S.** Effects of cryopreservation on the acrossomal status of stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, n.56, p.133-140, 2000.
- Boe-Hansen GB, Ersboll AK, Greve T, Christensen P.** Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*, v.63, p.2006-2019, 2005.
- Brandão FZ, Silva Filho JM, Palhares MS, Saturnino HM, Viana WS, Dantas MS, Oliveira HN.** 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 SP, Crockett EC, Squires EL.** 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 SP, Rowan KR, Varner DD, Blanchard TL.** Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.53, p.1641-1655, 2000b.
- Brinsko SP, Varner DD, Love CC, Blanchard TL, Day BC, Wilson ME.** 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 JE, Coy RC, Squires EL, Graham JK.** Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. *J Anim Sci*, v.80, p.12-18, 2002.
- Carvalho GR, Silva Filho JM, Lima MCC, Oliveira HN, Palhares MS.** Efeito de diferentes concentrações espermáticas sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen equino diluído, resfriado a 20°C e transportado. *Rev Bras Zootec*, v.27, p.695-699, 1998.
- Cheng FP, Gadella BM, Voorhout WF, Fazeli A, Bevers MM, 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. Proceedings...* Montgomery, AL: Society for Theriogenology, American Association of Equine Practitioners, 1998. p.60-70.
- Douglas-Hamilton DH, Osol R, Osol G, Driscoll D, Noble H.** A field study of fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, v.22, p.291-304, 1984.
- Ferreira MFL.** Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e fertilidade do sêmen de jumento. 1993. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, 1993.
- Foulkes JA.** 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.
- Gadella BM, Rath R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B.** Capacitation and the acrossome reaction in equine semen. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.249-265, 2001.
- Gahne S, Ganheim A, Malmgren.** Effect of insemination dose on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*, v.49, p.1071-1074, 1998.
- Garner DL, Hafez ESE.** Espermatozóide e plasma seminal. *In: Hafez ESE. Reprodução animal.* 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p.97-110.
- Goulart HM, Silva AEDF, Mcmanus C, Papa FO.** Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozoides de equinos, após o resfriamento a 5°C. *Rev Bras Zootec*, v.33, p.112-122, 2004.
- Graham JK.** Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.12, p.131-147, 1996.
- Graham J.** Assessment of sperm quality. *In: International Symposium on Stallion Reproduction, 3, 2001, Fort Collins. Proceedings...* Fort Collins: ISSR, 2001. p.23. Resumo.
- 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 ESE.** Transporte e sobrevivência de gametas. *In: Hafez, ESE. Reprodução animal.* 7 ed. Barueri: Manole, 2004. cap.6, p.83-96.
- Heiskanen ML, Pirhonen A, Koskinen E, Maenpaa PH.** Motility and ATP content of extended equine spermatozoa in different storage conditions. *J Reprod Fertil*, v.35, p.103-107, 1987.
- Heiskanen ML, Huhtinen M, Pirhonen A, Maenpaa PH.** Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. *Acta Vet Scand*, v.35, p.257-262, 1994.
- Heitland AV, Jasko DJ, Graham JK, Squires EL, Amann RP, Pickett BW.** Motility and fertility of stallion spermatozoa cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. *Biol Reprod Mono*, v.1, p.753-759, 1995.
- Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL.** Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.37, p.1241-1252, 1992a.
- Jasko DJ, Martin JM, Squires EL.** Effect of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. *Theriogenology*, v.37, p.1233-1239, 1992b.
- Jasko DJ, Squires EL, Moran DM, Farlin ME.** Comparison of pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen semen. *In: International Congress Animal Reproduction, 12, 1992, The Hague. Proceedings...* The Hague: ICAR, 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, p.267-272, 2001.
- Kayser JP, Amann RP, Shideler RK.** Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.601-614, 1992.
- Kirk ES, Graham JK, Squires EL.** Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. *In: International Symposium on Stallion Reproduction, 3, 2001, Fort Collins. Proceedings...* Fort Collins: The Symposium, 2001. p.37. Resumo
- Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL.** Minimal contamination techniques and preliminary findings. *Proc Am Assoc Equine Practit*, v.21, p.327-336, 1975.
- Kenney RM, Evenson DP, Garcia MC, Love CC.** 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, p.39-44, 1992.
- Lindsey AC, Varner DD, Seidel Jr. GE, Bruemmer JE, Squires EL.** 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 JL, Ketterson ED, Nolan VJr, Casto JM.** Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. *Gen Comp Endocrinol*, v.115, p.220-227, 1999.
- Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD.** The relationship between chromatin quality and fertility of chilled stallion sperm. In: American Association Equine Practitioners, 47, 2001, San Diego. *Proceedings...* San Diego. p.229-231. Disponível em: <<http://www.avis.org/proceedings/AAEP/2001/91010100229.pdf>>. Acesso em: 10 de setembro de 2005.
- Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD.** Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, v.63, p.1584-1591, 2005.
- Lyle SK, Ferrer MS.** 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 RC.** *Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana.* 1995. 114f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 1995.
- Metcalf ES.** Pregnancy rates with cooled equine semen received in private practice. *Proc Am Assoc Equine Practit*, v.44, p.16-18, 1998.
- Metcalf ES.** The role of international transport of equine semen on disease transmission. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.229-237, 2001.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK.** Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.63, p.2372-2381, 2005.
- Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, Amann RP.** Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.999-1012, 1992.
- Morris LHA, Allen WR.** An overview of low dose insemination in the mare. *Reprod Dom Anim*, v.37, p.206-210, 2002.
- Neild DN, Gadella BM, Agüero A, Stout TAE, Colenbrander, B.** Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.47-56, 2005.
- Nunes DB, Zúccari CESN, Ferreira CS, De Paula FAL, Costa-e-Silva EV.** Fertilidade do sêmen equino 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: SBZ, 2004. CD-ROM. MR035, 3p.
- Padilla AW, Foote RH.** Extender and centrifugation effects on the motility patters of slow-cooled stallion spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, v.69, p.3308-3313, 1991.
- Papa FO, Melo CM, Dell'Aqua JA, Macedo LP, Carvalho AG, Alvarenga MA, Medeiros ASL.** 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: SBTE, 2005. p.19-27.
- Parks JE, Lynch DV.** Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v.29, p.255-66, 1992.
- Pickett BW, Amann RP.** Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *Equine Vet Sci*, v.7, p.289-302, 1987.
- Pickett BW, Shiner KA.** Recent developments in artificial insemination in horses. *Liv Prod Sci*, v.40, p.31-36, 1994.
- Pommer AC, Linfor JJ, Meyers SA.** Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. *Theriogenology*, v.57, p.1493-1501, 2002.
- Province CA, Squires EL, Pickett BW, Amann RP.** Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.23, 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, p.103-9, 2004.
- Shore MD, Macpherson ML, Combes GB, Varner DD, Blanchard TL.** Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. *Theriogenology*, v.50, p.693-698, 1998.
- Sieme H, Bonk A, Hamann H, Klug E, Katila T.** Effects of diferent artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*, v.62, p.915-928, 2004.
- Silva Filho JM, Palhares MS, Fonseca FA.** Transporte e inseminação artificial com sêmen de equino. *Cad Téc Esc Vet UFMG*, n.11, p.3-112, 1994.



- Squires EL, Barnes CK, Rowley HS.** Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. *Proc Am Assoc Equine Practit*, v.35, p.25-30, 1989.
- Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer, JE.** *Cooled and frozen stallion semen.* Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999 p.1-38. (Bulletin, 9).
- Stradaoli 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, p.233-245, 2000.
- Stryer L.** Introdução ao estudo das membranas biológicas. In: Stryer L. *Bioquímica*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p.230-256.
- Suarez SS.** 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, p.258-265, 1989.
- Troedsson MH.** Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, v.52, p.461-471, 1999.
- Valle GR, Silva Filho JM, Palhares MS, Melo M A, Magnago LGP.** 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 GR, Silva Filho JM, Palhares MS, Sampaio IBM, Oliveira HN, Santos JEV.** 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 Diergeekd Tijdschr*, v.53, p.302-307, 1984.
- Varner DD.** Technical considerations for cool transported equine semen. In: Congresso Nazionale Multisala Sive, 9, 2003, Pisa. *Proceedings...* 7p. Disponível em: <http://www.evsre.it/vet.journal/scheletro_output_ricerca.php>. Acesso em: 20 de setembro de 2005.
- Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM.** Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v.29, p.1043-1053, 1988.
- Varner DD, Blanchard TL, Meyers PJ, Meyers SA.** Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology*, v.32, p.515-525, 1989.
- Voss JL.** Breeding efficiency. In: McKinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Apêndice 2, p.1109-1111.
- Zidane N, Vaillancourt P, Guay P, Poitras P, Bigras-Poulin M.** Fertility of fresh equine semen preserved for up to 48 hours. *J Reprod Fertil Suppl*, n.44, p.644, 1991.
- Zúccari CESN.** *Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina.* 1998. 121f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNES), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 1998.
-