



**MARINA BOTTREL REIS NOGUEIRA**

**USO DE DILUIÇÃO SERIADA DE SÊMEN  
CRIOPRESERVADO NA INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO DE ÉGUAS  
MANGALARGA MARCHADOR**

**LAVRAS - MG  
2011**

**MARINA BOTTREL REIS NOGUEIRA**

**USO DE DILUIÇÃO SERIADA DE SÊMEN CRIOPRESERVADO NA  
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO DE ÉGUAS  
MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Camisão de Souza

**LAVRAS-MG  
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Nogueira, Marina Bottrel Reis.

Uso de diluição seriada de sêmen criopreservado na inseminação artificial em tempo fixo de éguas mangalarga marchador / Marina Bottrel Reis Nogueira. – Lavras : UFLA, 2010.

78 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: José Camisão de Souza.

Bibliografia.

1. Equinos. 2. Dimetilformamida. 3. Fertilização. 4. Prenhez. 5. Criopreservação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.108245

**MARINA BOTTREL REIS NOGUEIRA**

**USO DE DILUIÇÃO SERIADA DE SÊMEN CRIOPRESERVADO NA  
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO DE ÉGUAS  
MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 05 de novembro de 2010.

Dr. Álvaro Mendes Rezende PUC

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Dr. Henrique Ribeiro Alves de Resende UFLA

Dr. José Camisão de Souza  
Orientador

**LAVRAS-MG**

**2010**

*Ao Haras Porteira de Tábua, nas pessoas dos meus avós - José Alfredo e Cacilda, onde aprendi a amar a medicina equina.*

*Ao meu marido Thomaz que, por amor e compreensão, trabalha incansavelmente por mim enquanto eu me dedico aos estudos.*

*À minha mãe Lydia e minha irmã Larissa por me fazerem feliz, lutarem e vencerem comigo. Este título também é de vocês.*

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por minha saúde e pelas oportunidades que todos os dias Ele derrama sobre a minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao departamento de pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade concedida.

Às éguas, que se entregam e tão inocentemente fornecem meu sustento e o de minha família.

À minha família pela amizade e apoio, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu tio Daniel e ao funcionário da fazenda, Nivaldo, por participarem ativamente do experimento.

Ao Professor José Camisão de Souza pela orientação e amizade e, sobretudo, por dar-me a oportunidade de entrar no mundo acadêmico, sendo eu uma veterinária de campo.

Ao Professor Luis David Solis Murgas, por me incentivar e me ajudar sempre que precisei.

Ao médico veterinário Adalberto Farinasso pelas idéias e condução do experimento.

À Professora Adalgiza Carneiro de Rezende pela amizade, apoio e correções.

À doutoranda Paula Rodriguez pelo companheirismo.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

À Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) e ao diretor da Faculdade de Veterinária, Professor Paulo Afonso da Silveira, pela oportunidade e compreensão nos meus primeiros anos de docência.

Às empresas LAVIZOO e NUTRICELL pela doação dos produtos usados no experimento.

## RESUMO

Devido à utilização cada vez mais frequente da inseminação artificial com sêmen congelado, várias pesquisas vêm sendo realizadas para melhorar os resultados desta técnica para a espécie equina. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* os efeitos da diluição seriada do crioprotetor dimetilformamida sobre o sucesso da inseminação artificial de éguas Mangalarga Marchador em tempo fixo de 20 horas após indução da ovulação. Foram testados sêmen descongelado diluído (n=14) ou não diluído (n=21). A taxa (%) de prenhez foi avaliada entre os tratamentos, diferentes classes de idade das éguas, tempo transcorrido entre ovulação e inseminação e entre presença ou não de líquido intrauterino. Os dados foram analisados como distribuição binomial após transformação logarítmica no procedimento GENMOD (SAS, Cary, NC, USA). A taxa de prenhez foi maior ( $P<0,05$ ) em éguas inseminadas com sêmen descongelado diluído (42,9%) em relação àquelas inseminadas conforme metodologia convencional (4,8%), ou seja, sem a diluição do sêmen. Éguas cuja ovulação ocorreu até 16 horas após a inseminação apresentaram maior taxa de prenhez (33,3%) em relação àquelas que ovularam após 16 horas (5,9%). A idade das éguas não influenciou a taxa de prenhez. Reduzir o estresse osmótico por meio da diluição seriada do sêmen incrementa a taxa de prenhez. Além disso, períodos inferiores a 16 horas entre a inseminação artificial e ovulação foram determinantes para a melhora da taxa de fertilização das éguas. Inseminações com menor concentração espermática e de crioprotetores são menos nocivas ao sistema reprodutivo da égua.

Palavras-chave: Equinos. Dimetilformamida. Fertilização. Prenhez.

## ABSTRACT

Equine artificial insemination with frozen semen has become more frequent and research is being undertaken to improve its results. The objective was to evaluate *in vivo* the effects of a serial dilution of the cryoprotector “dimethylphormamide” on the success of the 20 hour (post ovulation) fixed time- artificial insemination protocol in Mangalarga Marchador mares. Diluted (n=14) and non diluted (n=21) frozen thawed-semen were tested. Pregnancy rates were evaluated between the treatments, the age classes, period between ovulation and insemination and presence or not of intra-uterine liquid, as evaluated by ultra-sonography. Data were analyzed as a binomial distribution after logit transformed according to the GENMOD (SAS, Cary-NC, EUA) procedure. Pregnancy rate was higher ( $P<0.05$ ) for mares inseminated with diluted semen (42.9%) compared to those inseminated according to the conventional methodology (4.8%), with no semen dilution. Mares which ovulated until 16 hours after the AI showed higher pregnancy (33.3%) than mares ovulating afterwards (5.9%). Age did not influence pregnancy rates. It can be concluded that the reduction of the osmotic stress through the serial dilution of cryopreserved equine semen increases pregnancy rates. Moreover, a time interval between AI and ovulation equal to or bellow 16 hours was a determinant factor to improve pregnancy. Artificial insemination with lower spermatozoa and cryoprotector concentrations are less harmful to the reproductive tract of mares.

Keywords: Dimethylphormamide. Equine. Fertilization. Pregnancy.

## LISTA DE SIGLAS

DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
EPE	Extrato de Pituitária Equina
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
IA	Inseminação Artificial
LH	Hormônio Luteinizante
LIU	Líquido Intrauterino
OPI	Ovulação Pós Inseminação
SAS	Statistical Analysis Systems

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Membrana plasmática do espermatozóide</b> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Comportamento das células espermáticas frente à congelamento</b> .....	15
<b>2.3</b>	<b>Capacitação espermática</b> .....	18
<b>2.4</b>	<b>Estresse oxidativo e osmótico</b> .....	20
<b>2.5</b>	<b>Meios extensores e crioprotetores</b> .....	23
<b>2.6</b>	<b>Agentes crioprotetores não penetrantes</b> .....	23
<b>2.7</b>	<b>Agentes crioprotetores penetrantes</b> .....	25
<b>2.7.1</b>	<b>Amidas</b> .....	28
<b>2.8</b>	<b>Toxicidade dos crioprotetores</b> .....	30
<b>2.9</b>	<b>Sêmen congelado e ambiente uterino</b> .....	31
<b>2.10</b>	<b>Fertilidade com sêmen congelado</b> .....	34
<b>2.11</b>	<b>Inseminação na ponta do corno e baixas doses inseminantes</b> .....	37
<b>2.12</b>	<b>Citologia endometrial</b> .....	39
<b>2.13</b>	<b>Indução da ovulação em éguas</b> .....	41
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
<b>3.1</b>	<b>Local e animais</b> .....	44
<b>3.2</b>	<b>Seleção e avaliação dos animais</b> .....	46
<b>3.3</b>	<b>Tratamentos</b> .....	47
<b>3.4</b>	<b>Partidas de sêmen</b> .....	47
<b>3.5</b>	<b>Procedimento experimental</b> .....	49
<b>3.6</b>	<b>Requisitos para as inseminações</b> .....	51
<b>3.7</b>	<b>Avaliação do crescimento folicular e líquido intrauterino por ecografia</b> .....	52
<b>3.8</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	53
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>4.1</b>	<b>Taxas de prenhez</b> .....	58
<b>4.2</b>	<b>Tempo decorrido entre inseminação e ovulação</b> .....	59
<b>4.3</b>	<b>Efeito da idade na taxa de prenhez</b> .....	61
<b>4.4</b>	<b>Reação pós inseminação</b> .....	62
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

Os negócios que envolvem a criação e utilização do cavalo ocupam posição de destaque nos países desenvolvidos e em muitos daqueles em desenvolvimento, como o Brasil. A equideocultura é um importante ramo da agropecuária, sendo atualmente responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, e movimentação de 7,5 bilhões de reais por ano no complexo do agronegócio brasileiro.

Deve-se destacar que para animais destinados às práticas desportivas ou nos criatórios especializados, os cuidados tendem a ser mais intensos, demandando maior consumo de insumos e serviços. Cabe ressaltar também que, entre o período de 1990 a 2004, além de haver aumento no número de animais exportados, também se registrou diminuição no número de animais importados, ou seja, a qualidade do rebanho de animais de raça tem melhorado a cada ano e esforços dedicados à preservação genética destas raças estão cada vez mais frequentes.

Além do melhoramento genético, a congelamento de sêmen possibilita selecionar indivíduos e linhagens quanto à sua fertilidade e congelabilidade. A criopreservação contribui para minimizar perdas econômicas advindas da morte de reprodutores de alto valor comercial ou para a preservação contra a extinção de raças nativas e conservação de espécies ameaçadas.

Dentre as várias vantagens no uso de sêmen congelado destaca-se: éguas e potros não precisam ser transportados até os garanhões; garanhões podem participar de eventos durante a estação de coberturas; maior número de fêmeas acasaladas com determinado reprodutor; possibilidade de distribuição internacional; a eliminação da ansiedade e problemas de logística associados ao uso do sêmen refrigerado, que tanto afligem os veterinários a campo e resultam em resultados às vezes não satisfatórios.

Porém, entre as desvantagens, destacam-se a grande variabilidade da qualidade do sêmen pós-descongelamento entre os ganhos e as de taxas de prenhez inferiores quando comparado à monta natural e inseminação com sêmen refrigerado. A pouca longevidade dos espermatozoides criopreservados no sistema reprodutivo feminino determina um intervalo curto entre a inseminação e a ovulação sendo que o período considerado ótimo para inseminação com sêmen congelado compreende a faixa de 12 horas antes a 12 após a ovulação.

O intenso manejo das éguas a serem inseminadas com sêmen congelado contribui negativamente para a disseminação da técnica, pois geralmente há a necessidade de que as matrizes sejam levadas a uma central ou que plantões noturnos sejam feitos por médicos veterinários nas fazendas para garantir que a inseminação seja realizada em um período próximo à ovulação.

O sêmen congelado não induz à maior inflamação uterina do que o sêmen fresco, mas devido ao volume diminuído e à alta concentração espermática, a resposta uterina tende a ser mais forte ou duradoura do que quando utilizados outros tipos de sêmen. A presença de fluido uterino pós-inseminação está associada a um efeito negativo nas taxas de fertilidade e diminuição nas taxas de concepção.

O uso de agentes crioprotetores no processo de congelamento de sêmen mantém a viabilidade das células espermáticas, pois eles as protegem dos danos causados pelo choque térmico, decorrentes da formação de cristais de gelo. No entanto, estes agentes são hiperosmóticos com relação ao sêmen e causam efeitos deletérios às células espermáticas quando adicionados ou retirados às mesmas, predispondo a lesões semelhantes à capacitação e resultando em uma menor longevidade dos espermatozoides no sistema reprodutivo da égua.

Tentando minimizar os efeitos do choque osmótico que a célula espermática sofre ao descongelamento, Zimmermann et al. (2009) demonstraram que as diluições pós-descongelamento de sêmen equino congelado com

crioprotetor dimetilformamida a 5% proporcionaram maior sobrevivência das células espermáticas. Porém, não há estudos avaliando se estas diluições levariam a maior durabilidade *in vivo*, ou seja, no ambiente uterino da égua inseminada.

Este trabalho objetivou avaliar *in vivo* os efeitos da diluição seriada do crioprotetor pós-congelamento mediante inseminação de éguas Mangalarga Marchador, em um tempo fixo de 20 horas após a indução hormonal da ovulação e em um período médio de 10 a 24 horas pré-ovulação.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Membrana plasmática do espermatozóide**

A composição da membrana espermática constitui-se de mistura heterogênea de lipídios (fosfolipídios, esteróis e glicolipídios em taxas de aproximadamente 70, 25 e 5%, respectivamente) e proteínas. No entanto, atualmente é reconhecida que a organização dos lipídios na membrana plasmática é muito mais complexa do que o modelo proposto por Singer e Nicolson (1972), no qual lipídios e proteínas difundem livremente dentro de uma bicamada.

Hoje é amplamente aceito que as membranas não são homogêneas, constatando-se a presença de assimetrias laterais e transmembrana. Consequentemente, os lipídios e proteínas estão arranjados em um mosaico de domínios, onde a posição dos componentes é alterada à medida em que ocorrem quedas na temperatura e a membrana passa do estado sólido ao estado gel (LADHA, 1998).

Os fosfolipídios são os principais lipídios encontrados na membrana plasmática do espermatozóide, destacando-se a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolina e esfingomiéline. Entre os esteróis, o colesterol é o mais abundantemente encontrado (LADHA, 1998).

As diferenças na quantidade de colesterol na membrana plasmática podem não estar apenas relacionadas aos índices de capacitação, podendo também afetar a fertilidade, assim como a capacidade do ejaculado de um garanhão suportar o resfriamento e congelamento (YANAGUIMACHI, 1994). Minelli et al. (1998) relataram que o plasma seminal pode bloquear o efluxo de colesterol da membrana plasmática através de prostassomas que são vesículas prostáticas ricas em colesterol. A fluidez nesta membrana depende da

temperatura, do conteúdo de colesterol e da composição lipídica, sendo importante o comprimento e grau de insaturação das cadeias de ácidos graxos. Em sêmen de garanhões, a inclusão do colesterol na membrana espermática promoveu melhorias significativas nos parâmetros de motilidade e integridade de membrana pós-congelamento. No entanto, a fertilidade deste sêmen foi muito prejudicada, este fato foi atribuído ao colesterol incorporado na membrana plasmática dos espermatozóides, o qual impediu sua capacitação (ZAHN, 2001).

O resfriamento de sêmen para a congelação pode levar à transições de fase, bem como de feixes de proteínas (LEEuw et al., 1990). A fase de transição se dá por reorganização das cadeias hidrocarbonadas, que de estado fluido e desordenado passam para o estado gel, que é o de organização mais acentuada. Tal fase ocorre em função das mudanças na temperatura. Para a célula espermática equina, a fase de transição ocorre à temperatura de 20,7°C (AMMAN; GRAHAM, 1993).

Após a espermatogênese, a célula espermática perde a maioria de suas organelas e a capacidade de transcrição de DNA, de forma que a resíntese de componentes da membrana torna-se impossível. Como consequência, danos à membrana plasmática espermática podem resultar em perda irreversível de motilidade e/ou capacidade fertilizante (AURICH, 2005). Adicionalmente, alguns autores sugerem haver resistência distinta entre os diferentes compartimentos da célula espermática aos processos de refrigeração e congelamento (PARKS; GRAHAM, 1992).

Para a fertilização do ovócito, a célula espermática deve possuir atributos como metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, integridade das membranas (plasmática e acrossomal) e funcionalidade das proteínas relacionadas com os eventos da fertilização (SQUIRES et al., 1999).

## 2.2 Comportamento das células espermáticas frente à congelação

A exposição das células espermáticas a temperaturas abaixo da fisiológica, mesmo antes de ocorrer a congelação (processo de estabilização das células espermáticas), é responsável por mudanças na organização bidimensional dos lipídios da membrana espermática e também alteração das propriedades de enzimas encontradas na membrana, diminuindo a longevidade dos espermatozoides pós-descongelação, através das reações precoces semelhantes à capacitação espermática (HOLT, 2000b).

Os protocolos de criopreservação expõem as células espermáticas a várias situações de injúrias como as variações de temperaturas e exposição àquelas não fisiológicas, estresse osmótico pelos elevados gradientes de concentração de solutos do meio crioprotetor e pela formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular, os quais comprometem sua viabilidade (WATSON, 2000).

À medida em que a temperatura vai declinando, os lipídeos passam por transição de estado fluido, no qual desempenham suas funções com plena eficiência, para estado líquido cristalino, no qual as cadeias de ácidos graxos tornam-se desordenadas. Com a contínua queda da temperatura, o líquido cristalino é transformado em gel, no qual as cadeias de ácidos graxos organizam-se de forma paralela, produzindo uma estrutura rígida, o que torna estas áreas fracas, sujeitas a rupturas, fusões e permeáveis a íons (HAMMERSTED; GRAHAM, 1992).

Taxa de refrigeração lenta ( $-0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) e adição de substâncias ao meio diluente de congelação, como açúcares, gema de ovo, lipoproteínas do leite, glicerol, BSA, álcool polivinil e lipossomas reduz os danos às células espermáticas durante a fase de refrigeração, entre temperaturas de  $19^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$  (KATILA et al., 1997).

No entanto, as crioinjúrias mais significantes ocorrem durante os processos de congelamento e descongelamento (HOLT, 2000b). Quando as células espermáticas são submetidas a temperaturas de aproximadamente  $-5^{\circ}\text{C}$ , as células e o meio extracelular permanecem não congelados. Entre  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $-10^{\circ}\text{C}$ , cristais de gelo começam a se formar no meio extracelular, mas o meio intracelular ainda permanece não congelado (GAO; CRITSER, 2000). Isso indica que a membrana plasmática pode prevenir a propagação do gelo extracelular para o interior da célula até certas temperaturas (ZÚCCARI, 1998). A formação de gelo no meio extracelular faz com que aumente a concentração de solutos no meio extracelular, elevando a pressão osmótica e causando saída da água do interior das células (WOLFE; BRYANT, 1999).

Se estas forem refrigeradas rapidamente, não haverá tempo suficiente para desidratarem-se e manterem o equilíbrio osmótico, tornando-se muito refrigeradas e com possibilidade de formação de cristais de gelo intracelular, o que pode causar danos irreversíveis às mesmas. Por outro lado, se as células forem congeladas em ritmo mais lento, estas irão se desidratar por causa do meio extracelular super concentrado, eliminando a possibilidade de formação de grandes cristais de gelo intracelular, entretanto poderão sofrer danos morfofuncionais devido à desidratação celular (MAZUR, 1990).

No descongelamento, as células são expostas aos mesmos fatores, porém de forma inversa: rehidratação celular pela entrada de água na célula, passando pela membrana plasmática para balancear a osmolaridade, a qual é criada quando os cristais extracelulares são derretidos. Lipídeos e proteínas da membrana plasmática são reorganizados e o crioprotetor é difundido para fora das células (PICKETT; CHOW; WHITE, 1986). Espermatozóides são sensíveis a muitos fatores ambientais, como temperatura, luminosidade, danos físicos e químicos. O choque ou mesmo pequenas variações na temperatura causam

desarranjo nos lipídeos estruturais da membrana plasmática e, com isso, lesão aos espermatozóides (PICKETT, 1992).

Durante o descongelamento, a sobrevivência dos espermatozóides está relacionada à habilidade dos mesmos em passar novamente pela faixa crítica de temperatura. A curva preferencial de aquecimento depende do método utilizado no congelamento. Se este processo for lento, a descongelação deve também ser lenta para permitir a fusão dos cristais de gelo extracelulares, provocando a diluição do soluto e, lentamente, a rehidratação das células. Se neste caso o sêmen for descongelado muito rapidamente, os cristais extracelulares descongelam-se na mesma velocidade, e a água do meio invade muito bruscamente a célula, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática. Por outro lado, se o sêmen foi congelado rapidamente os espermatozóides não sofrerão desidratação e, portanto, quando o gelo extracelular derreter não haverá influxo rápido de água através da membrana celular. Este sêmen também deverá ser descongelado rapidamente, de modo que o gelo intracelular que se formou durante a congelação não tenha tempo de se re-cristalizar (AMMAN; PICKETT, 1987).

Muitas das características dos espermatozóides são consideradas importantes e devem ser mantidas após a criopreservação, quando se espera boa capacidade de fertilização: motilidade progressiva, metabolismo normal, membrana celular intacta, presença de enzimas acrossomais, proteínas de superfície responsáveis pela interação espermatozóide-ovócito intactas, e nucleoproteínas sem injúrias (BLANCHARD et al., 2003).

As perdas ocorridas no processo de criopreservação são compensadas com a utilização de doses inseminantes contendo grande número de espermatozóides, tanto para sêmen de touros como para outras espécies (WATSON, 2000).

### 2.3 Capacitação espermática

Nos últimos anos vários investigadores reportaram que as mudanças ocorridas no sêmen criopreservado são similares às aquelas observadas durante a capacitação, surgindo o termo “criocapacitação” (CORMIER; BAILEY, 2003; GREEN; WATSON, 2001; NEILD et al., 2003). O grau de capacitação do espermatozóide criopreservado é preocupante, porque estas modificações celulares reduzem a expectativa de vida das células criopreservadas (ELLINGTON et al., 1999). A redução da longevidade dos espermatozóides criopreservados no trato reprodutivo feminino é particularmente problemática na espécie equina, que apresenta estro relativamente longo e, por esta razão, requer maior cuidado na determinação do tempo da inseminação.

Mudanças na estrutura e integridade da membrana plasmática parecem ser importante componente associado à redução da fertilidade do espermatozóide criopreservado. A composição fosfolipídica da membrana plasmática é assimétrica na maioria das células de mamíferos adultos, porém durante a capacitação ou a criopreservação, há mescla dos fosfolípidos da membrana plasmática, resultando na externalização de alguns fosfolípidos e em fosforilação da proteína tirosina (THOMAS; MEYERS; BALL, 2006).

A desordem lipídica da membrana plasmática é determinada pelo conteúdo de colesterol da mesma. O efluxo de colesterol durante a capacitação *in vitro* aumenta a desordem fosfolipídica e resulta em maior permeabilidade bilateral (CROSS, 2003). Maior fluidez é importante para vários eventos advindos da capacitação, incluindo exocitose acrossomal e fusão espermatozóide-oócito (GADELLA; HARRISON, 2002).

As alterações semelhantes à capacitação na membrana plasmática e na fosforilação da proteína tirosina, após a criopreservação não são idênticas às aquelas ocorridas na capacitação *in vitro* do espermatozóide equino, ainda que o

produto final pareça o mesmo (THOMAS; MEYERS; BALL, 2006). Estudos avaliando em quais fases da criopreservação ocorrem as alterações semelhantes à capacitação, concluíram ser necessário prevenir o início das alterações na membrana plasmática tanto antes da centrifugação, quanto no início da curva de queda de temperatura (NEILD et al., 2003).

A adição de extensores à base de leite desnatado minimiza os efeitos ao centrifugar o sêmen, enquanto que meios crioprotetores adicionados de colesterol, aumentam a estabilidade da membrana plasmática durante a queda de temperatura, e por isso aumentam a sobrevivência destes espermatozoides. Porém, reduzem a fertilidade *in vivo* por impossibilitarem posterior reação acrossomal e fusão espermatozóide-oócito. De qualquer modo, a remoção do colesterol após o descongelamento, a fim de aumentar a fertilidade, ainda não obteve bons resultados e deve ser mais bem estudada (OLIVEIRA et al., 2010).

Espermatozoides criopreservados têm a fluidez da membrana plasmática aumentada e talvez mais fusogênica, ainda que aparentemente permaneçam estáveis (WATSON, 1995). Como consequência destas alterações, a resposta ao estresse osmótico é afetada (SCHWEISGUTH; HAMMERSTEDT, 1992).

A necessidade de inseminar éguas tão próximo quanto seja possível à ovulação, para obter bons resultados com sêmen criopreservado, reforça a hipótese de que os espermatozoides são parcialmente capacitados após a criopreservação (WATSON, 1995). As reações semelhantes à capacitação levam a uma menor longevidade da célula espermática no órgão genital da fêmea (THOMAS; MEYERS; BALL, 2006).

## 2.4 Estresse oxidativo e osmótico

As membranas espermáticas são caracterizadas por quantidade relativamente alta de ácidos graxos polinsaturados, tornando-as susceptíveis ao dano peroxidativo (BAUMBER; BALL, 2003).

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ocorrer como consequência normal do metabolismo oxidativo ou de mecanismos específicos de tipos celulares determinados. Resultam em fosforilação da tirosina, reações semelhantes à capacitação e ocasionam lesões na membrana plasmática, principalmente na peça intermediária, afetando a motilidade (BAUMBER et al., 2002).

O plasma seminal dos equinos possui atividade de catalase e superóxido dismutase com uma significativa variação entre garanhões na atividade dessas enzimas. O espermatozóide parece ter uma limitada quantidade de antioxidantes, sendo o plasma seminal potente fonte desses agentes, com função de proteger o espermatozóide ejaculado dos efeitos adversos das EROs. A retirada do plasma seminal durante o processo de congelação pode aumentar a susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo devido à remoção desses antioxidantes (BAUMBER et al., 2002).

Espermatozoides são sensíveis ao estresse osmótico associado à adição e posterior remoção de crioprotetores assim como às alterações na concentração de solutos durante a congelação (WATSON, 2000).

Quando o sêmen rico em crioprotetores é descongelado e abruptamente transferido para meio isotônico, sem crioprotetor (como diluentes à base de leite desnatado ou secreção do sistema reprodutivo da fêmea) o ambiente intracelular torna-se hiperosmótico comparado ao extracelular. E pelo fato de a permeabilidade da maioria dos crioprotetores ser muito menor que a da água, há grande influxo desta resultando em um aumento de volume celular. Isto é

refletido em perda imediata na motilidade espermática, bem como na integridade e potencial mitocondrial da membrana (BALL; VO, 2001).

Células ao serem congeladas são expostas à formação dos cristais de gelo extracelulares, que resultam em concentração hiperosmótica dos solutos (WATSON, 1995). A resposta celular a esta injúria é perder água e retrair o volume até que a concentração de solutos entre os compartimentos intra e extracelulares estejam equilibrados.

Contrariamente, assim que as células são expostas a um ambiente extracelular hipotônico, como acontece durante a descongelação, o volume celular é expandido pela difusão passiva de água em equilíbrio com as bombas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, associadas à membrana. A capacidade dos espermatozoides em responder a diferenças de osmolaridade no meio extracelular, com mudanças no volume celular, é essencial para sobrevivência das células; e esta regulação volumétrica é associada a fatores como composição de fosfolípidios, permeabilidade à água, temperatura da fase de transição dos lípidios, atividade das bombas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, canais de água e íons (MEYERS, 2005).

Em trabalho no qual foram utilizados os inibidores oubain e amiloride para canais Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase da célula espermática de garanhões, demonstrou-se que a regulação osmótica dos espermatozoides foi prejudicada (CUEVA et al., 1997).

Sabe-se que a osmolaridade do fluido seminal é de aproximadamente 300 mOsmol/L (PICKETT; AMANN, 1993). Ball e Vo (2001) observaram redução na motilidade progressiva e na integridade de membrana quando expuseram sêmen equino a condições hiperosmóticas com crioprotetores. Porém, os maiores danos foram verificados ao retornar o sêmen que estava em solução hiperosmótica para condições de isosmolaridade do sêmen *in natura*.

Pommer, Rutlant e Meyers (2002), em estudo onde objetivou avaliar a tolerância osmótica de espermatozoides de garanhões na faixa de 75 a 900

mOsm, evidenciaram sensibilidade dos espermatozoides a mudanças bruscas de osmolaridade e observaram que apesar destes possuírem capacidade de restabelecer seu volume inicial, danos irreversíveis à sua membrana plasmática podem comprometer a capacidade fertilizante.

A adição de colesterol à membrana espermática pré-congelamento aumenta o limite de tolerância osmótica dos espermatozoides, o que reduz o dano osmótico às células, e aumenta a permeabilidade de membrana dos espermatozoides equinos à água e aos crioprotetores (GLAZAR et al., 2009). Porém, como já citado anteriormente, a adição de colesterol previamente ao congelamento de sêmen reduz a fertilidade *in vivo* deste (ZAHN; PAPA; DELL'AQUA JUNIOR, 2002).

As células espermáticas são mais sensíveis ao ingurgitamento do que à desidratação (MEYERS, 2005). A diluição seriada do sêmen para reduzir a concentração de crioprotetores é usada na tentativa de limitar as mudanças no volume celular durante a remoção de crioprotetores permeáveis e, conseqüentemente, limitar o dano osmótico (GILMORE et al., 1998).

A remoção do glicerol de sêmen equino fresco, envolvido em solução hiperosmótica através de diluição seriada com meios modificados, melhorou a manutenção da motilidade comparada à remoção rápida por diluição única, porém os benefícios da diluição seriada não foram observados com o sêmen equino criopreservado (WESSEL; BALL, 2004).

Já Zimmermann et al. (2009), utilizando sêmen criopreservado com dimetilformamida como crioprotetor, obtiveram melhoras na manutenção da motilidade e integridade de membrana, após diluições seriadas com redução da concentração do crioprotetor.

## **2.5 Meios extensores e crioprotetores**

A presença de algumas substâncias tais como, açúcares, lipoproteína da gema do ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos no meio diluidor alteram as propriedades físicas deste, durante o processo de congelamento (KAROW, 2003). O diluidor também promove proteção aos espermatozoides no processo de criopreservação quanto à formação de cristais de gelo intracelular, desidratação excessiva da célula, danos osmóticos e oxidativos (HOLT, 2000a).

Para que a criopreservação tenha sucesso, é necessário que os espermatozoides sejam colocados em ambiente apropriado, que minimize os danos às membranas e não acione prematuramente os mecanismos de capacitação espermática e de reação do acrossoma (LOOMIS, 1992).

Acredita-se que a variação no volume celular decorrente da entrada e saída do crioprotetor e água (choque osmótico) seja uma das principais causas da baixa viabilidade do sêmen após a descongelação. A utilização de crioprotetores com maior permeabilidade às células espermáticas é desejável, pela possibilidade de minimizar o choque osmótico (GOMES et al., 2002).

Para inibir o crescimento de microorganismos no sêmen, são utilizados vários antibióticos como penicilina, estreptomicina, kanamicina, gentamicina entre outros, além de combinações entre estes, os quais atuam como bactericida de largo espectro (PICKETT, 1992).

## **2.6 Agentes crioprotetores não penetrantes**

Keith (1998) relatou a existência de dois grupos de crioprotetores: não penetrantes e penetrantes. Os primeiros são representados por macromoléculas com alto peso molecular, tais como açúcares, lipoproteínas da gema de ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos, eficientes na proteção dos

espermatozoides durante a congelação, contudo sem penetrar nas células. Estes crioprotectores protegem as células através de mecanismos osmóticos, promovendo meio hipertônico que induz a saída de água das células, levando à desidratação do espermatozóide e reduzindo a probabilidade de formação de cristais de gelo no interior da célula (AMANN; PICKETT, 1987).

Os açúcares desempenham importantes papéis no meio diluente de congelamento, atuando basicamente como fonte de energia exógena, e na manutenção da pressão osmótica do diluente, aumentando a quantidade de água não congelada em temperaturas abaixo do seu ponto de congelamento e, com isso, reduzindo a concentração de sais na solução não congelada (HOLT, 2000b). Os mais comumente utilizados em meios diluentes para congelamento de espermatozoides são glicose, lactose, sucrose, rafinose, manose e trealose.

A gema de ovo no meio diluente de criopreservação beneficia os espermatozoides por manter a pressão coloidal do meio, e também por conter na gema uma lipoproteína de baixa densidade, a qual estabiliza a membrana espermática durante a congelação e descongelação (WATSON, 1979).

O leite tem sido usado para a diluição e armazenamento do sêmen equino a fresco ou refrigerado. As proteínas nele presentes exercem um papel na criopreservação semelhante ao da gema de ovo. A eficiência dos meios diluentes à base de leite tem sido atribuída à sua composição protéica, que atua como tampão e à propriedade quelante frente a metais pesados, havendo relatos de sua parcial proteção contra a redução da temperatura durante o processo de refrigeração (SALAMON; MAXWELL, 2000).

O mecanismo de ação dos aminoácidos baseia-se na hipótese destas moléculas serem eletricamente carregadas e interagirem eletrostaticamente com grupos fosfatos da membrana plasmática, formando uma camada na superfície dos espermatozoides e melhorando a ação crioprotetora do glicerol. Alguns aminoácidos como a glutamina, histidina e glicina betaína têm sido utilizados na

criopreservação de sêmen de ovinos, garanhões e humanos (KUNDU; DAS; MAJUNDER, 2001).

## **2.7 Agentes crioprotetores penetrantes**

Estes são substâncias que atuam tanto no meio intra como extracelular, sendo mais comumente utilizados o glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO) e amidas (KEITH, 1998). Possuem mecanismo de ação baseado em suas propriedades coligativas ou de ligação com a molécula da água, ou seja, os agentes crioprotetores penetrantes têm estruturas que promovem ligações de hidrogênio com a molécula da água. São estas ligações que mudam a orientação dos cristais de gelo e criam um ambiente menos nocivo para as células espermáticas. Portanto, esta propriedade modifica as características durante o processo de congelamento, limitando a formação de cristais de gelo, retardando o crescimento dos cristais e reduzindo as concentrações de soluto no meio extracelular (DALIMATA; GRAHAM, 1997).

Ashwood-Smith (1987) classificou os crioprotetores penetrantes em dois grupos: alcoóis (etileno-glicol, propileno-glicol, glicerol) e amidas. Sugeriu que o crioprotetor ideal deve ter baixo peso molecular, boa solubilidade em água e mínima toxicidade aos espermatozóides. Pelo fato de a maioria das amidas possuírem peso molecular menor do que o glicerol, esses agentes crioprotetores causam menor dano osmótico, por penetrarem na membrana plasmática dos espermatozóides com maior rapidez.

O glicerol é o crioprotetor penetrante mais comumente utilizado nos meios de congelamento de sêmen de garanhões, em uma concentração variando 2 a 5% (KEITH, 1998).

Os efeitos protetores do glicerol são representados por suas propriedades coligativas, pela diminuição do ponto de congelamento e pela consequente

redução das concentrações de eletrólitos na fração não-congelada da amostra, sendo que, inicialmente, ele ocasiona um estresse osmótico na célula espermática, impedindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (WATSON, 2000). No entanto, diversos trabalhos têm demonstrado ser este crioprotetor deletério ao espermatozóide de diferentes espécies. Estes efeitos tóxicos do glicerol têm sido reportados por vários autores e revisados por Fahy et al. (1990). Hammerstedt e Graham (1992) revisaram outros efeitos causados pelo glicerol incluindo: mudanças nos eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade intracelular pelo glicerol, alteração da polimerização da tubulina, alteração da associação dos microtúbulos, efeitos no balanço bioenergético, alteração direta na membrana plasmática, alteração do glicocálix e proteínas superficiais da célula espermática.

O prejuízo à integridade e funcionalidade espermáticas proporcionado pelo glicerol ocorre principalmente quando o sêmen congelado em soluções hiperosmóticas retorna às condições de isomolaridade. Ball e Vo (2001) constataram uma queda nos parâmetros avaliados associada à baixa permeabilidade do glicerol na membrana dos espermatozóides de garanhões. Durante a incubação do sêmen em soluções hiperosmóticas ocorre a saída de água da célula espermática e o preenchimento do compartimento intracelular pelo glicerol.

Com o retorno às condições de isomolaridade a água tende a entrar novamente na célula para que ocorra o equilíbrio entre os meios intra e extracelular, mas como o glicerol possui baixa permeabilidade celular sua saída do interior da célula fica comprometida, enquanto a entrada de água ocorre rapidamente (ALVARENGA et al., 2003).

O etilenoglicol, também é quimicamente classificado como álcool; possui quatro pares de elétrons isolados e tem a possibilidade de ligação com átomos de hidrogênio em quatro sítios e a possibilidade de doar dois hidrogênios

(KEITH, 1998), podendo também efetuar ligações de hidrogênio na membrana dos espermatozóides.

Em estudo comparativo entre etilenoglicol e glicerol demonstrou-se atuação semelhante destes, sendo que quando combinados possibilitam a redução do teor de glicerol, diminuindo o seu efeito tóxico (ALVARENGA et al., 2000a). Outro estudo comparativo do glicerol e outros crioprotetores, dentre eles etilenoglicol, dimetilformamida e dimetilsulfóxido utilizando 10 ejaculados de 10 garanhões, constatou-se a equivalência no uso dos crioprotetores, com exceção do dimetilsulfóxido o qual apresentou resultado inferior (ALVARENGA et al., 2000b).

A maioria dos meios diluentes para congelamento de sêmen contém uma fonte de lipoproteínas, através da incorporação de produtos do leite, gema de ovo ou uma combinação destes dois ingredientes, que auxiliam na estabilização das membranas durante os ciclos da congelamento/descongelamento. Monossacarídeos (glicose ou frutose), dissacarídeos (sucrose ou lactose) e trissacarídeos (rafinose) também são comumente incorporados. Os dissacarídeos e trissacarídeos são açúcares não permeáveis, usados principalmente por suas propriedades osmóticas. Os monossacarídeos também possuem efeitos osmóticos, porém eles podem ser utilizados pelos espermatozóides como uma fonte de energia. Outros componentes como EDTA, detergentes, tampões e antibióticos também são incluídos nos meios (COTORELLO; HENRY, 2002).

### 2.7.1 Amidas

Ball e Vo (2001) dizem que as amidas apresentam três sítios de ligação de hidrogênio com a molécula de água, ou seja, a metade em comparação ao glicerol. No entanto, por possuírem menor viscosidade e maior solubilidade à água em relação ao glicerol, permitem maior permeabilidade da membrana diminuindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causados pelos crioprotetores.

Keith (1998) relatou que adições de grupos metil nas moléculas de acetamida e formamida foram mais efetivas quanto à capacidade crioprotetora comparado a moléculas sem o grupo metil, sugerindo assim que a estrutura da molécula das amidas determina parcialmente sua habilidade crioprotetora.

Na procura de outros crioprotetores alternativos para a congelação do sêmen equino, Keith (1998) estudou várias formas de amidas (formamida, metilformamida, dimetilformamida, acetamida e metilacetamida) como agente crioprotetor em comparação com o glicerol em meio usado para congelamento de sêmen de garanhões. Encontrou que a metilformamida foi superior em manter a motilidade total dos espermatozóides de garanhões no tempo 0 pós-descongelamento em relação ao glicerol (54,2% a 51,6%, respectivamente) e no tempo 20 (min) pós-descongelamento a metilformamida também foi superior ao glicerol (50,6% a 41,7%, respectivamente.), em relação à motilidade progressiva a metilformamida no tempo 0 foi superior ao Glicerol (34,8% a 29,4%, respectivamente) e no tempo 20 pós-descongelamento metilformamida foi mais eficiente do que o glicerol (30,0% a 23,3%, respectivamente) e na preservação da viabilidade celular.

Alvarenga et al. (2003) estudaram as variações de congelabilidade entre raças utilizando os crioprotetores dimetilformamida a 5% e glicerol a 5%. Constatou-se que, num universo de 55 garanhões de diferentes raças, os

parâmetros de motilidade total e progressiva foram superiores em relação à dimetilformamida, na maioria dos ganhões (40 de 55 indivíduos).

Em outro experimento com sêmen congelado, utilizando extensor contendo lactose EDTA com DMF ou GLY, Moffet et al. (2003) demonstraram não haver melhora na motilidade, embora as taxas de prenhez fossem maiores em éguas inseminadas com meio diluidor contendo DMF (47%, 14/30), comparadas ao grupo contendo GLY (14%, 5/34). Baseados nestes dados, concluíram que o glicerol pode reduzir as taxas de fertilidade de sêmen congelado mesmo que a motilidade e viabilidade dos espermatozóides estejam preservadas.

Medeiros (2003), ao comparar vários crioprotetores em 20 ejaculados de 10 ganhões quanto aos parâmetros de análise computadorizada do movimento espermático, percentagem de células íntegras através de sondas fluorescentes, análise ultraestrutural da integridade acrossomal através de microscopia eletrônica de transmissão e fluorescência (FITC – PNA e Iodeto de propídio) e bem como o teste de fertilidade, concluiu que o agente crioprotetor glicerol foi inferior a todos os derivados de amidas, no sentido de proteger os espermatozóides de ganhões contra os danos da congelação e descongelação. Dentre as amidas estudadas a dimetilformamida foi de uma forma geral mais eficiente em crioprotetor os espermatozóides de ganhões. A melhoria da qualidade do sêmen pós-descongelação quando do uso da dimetilformamida se refletiu em melhoria significativa da fertilidade, quando após inseminar 15 éguas com sêmen congelado com dimetilformamida como crioprotetor e 15 éguas com glicerol, obteve um índice de fertilidade com o sêmen congelado com a dimetilformamida de 40% (6/15); com o glicerol nenhuma prenhez foi constatada.

Alvarenga et al. (2005) relataram que esta característica dos crioprotetores a base de amida, de se adaptarem melhor como agentes

crioprotetores ao sêmen de garanhões que apresentam resultados insatisfatórios com o glicerol, possa estar relacionada à menor viscosidade das amidas em relação ao glicerol resultando em uma maior permeabilidade destes crioprotetores, conseqüentemente diminuindo os riscos de estresse osmótico nas células espermáticas.

Segundo Melo (2005), a associação de glicerol 1% e metilformamida 4% ao diluente Botucrio® foram eficazes na manutenção da viabilidade espermática na metodologia de congelação usual e na metodologia em que o sêmen é refrigerado por 24 horas antes da congelação. Utilizando o mesmo meio diluente de congelação (Botucrio®) em comparação ao lactose – EDTA e ao diluente INRA 82, Pasquine et al. (2007) observaram que o Botucrio® foi mais eficiente em manter a motilidade total nos tempos de 10 minutos e 60 minutos pós – descongelação.

Zimmermann et al. (2009), ao avaliar os efeitos da diluição seriada do sêmen congelado utilizando dois diluentes comerciais, Botu-Crio® e FR4®, concluíram que as diluições pós-descongelação de sêmen equino criopreservado com crioprotetor dimetilformamida a 5% proporcionaram uma maior sobrevivência das células espermáticas. E o diluente Botu-Crio® resulta em melhores resultados, comparado ao diluente FR4®.

## **2.8 Toxicidade dos crioprotetores**

Altas concentrações de crioprotetores são deletérias ao espermatozóide devido à sua toxicidade e podem resultar na redução da fertilidade no processo da inseminação artificial. Embora a função destes agentes seja a de minimizar os efeitos negativos, há evidências que o glicerol é tóxico para o espermatozóide. A toxicidade do glicerol pode resultar em desnaturação de proteínas, alteração de interações da actina e indução da liberação das proteínas do seu local na

membrana. Parte desta toxicidade é devida à injúria bioquímica, resultante da adição direta do crioprotetor sobre componentes subcelulares, apesar de ocorrerem danos osmóticos (HAMMERSTED; GRAHAM, 1992).

## **2.9 Sêmen congelado e ambiente uterino**

O ambiente uterino sadio oferece as condições ideais para que ocorra primeiramente o transporte espermático ao sítio de fecundação e posteriormente o desenvolvimento embrionário. O fluido uterino é composto de hormônios, prostaglandinas, enzimas, substratos energéticos, íons, vitaminas, aminoácidos, peptídeos, proteínas séricas e proteínas uterinas (FISHER; BEIER, 1986).

Quando introduzido no útero, o sêmen congelado que estava imerso em solução hipertônica com crioprotetores é abruptamente transferido para um meio isotônico, sem a presença do crioprotetor. Desta maneira, o meio intracelular é hiperosmótico em relação ao ambiente extracelular. Pelo fato de que a permeabilidade da maioria dos crioprotetores é bem menor que a da água, há um grande influxo de água sem que haja a total saída dos crioprotetores do meio intracelular, resultando em um aumento exagerado de volume da célula espermática (BALL; VO, 2001). Isso tem reflexo na rápida perda da motilidade espermática, integridade de membrana e potencial mitocondrial da membrana (POMMER; RUTLANT; MEYERS, 2002).

A cobertura ou monta natural é comumente associada às causas de endometrites. Todos os garanhões são hospedeiros para diversas espécies de bactérias em sua genitália externa e no seu sêmen (MILLAR; FRANCIS, 1974; SIMPSON; BURNS; SNELL, 1975). Uma pressão negativa uterina é a responsável pela deposição do sêmen dentro do útero da égua durante o coito (MILLAR, 1952). Como muitas bactérias são habitantes da flora normal da vagina (HINRICHS et al., 1988), estas são deslocadas para o interior uterino

durante a cópula. Mais de 80% das éguas são bacteriologicamente positivas em culturas cervicais 24 horas após a cobertura (BRYANS, 1962). Atualmente, com a utilização da inseminação artificial (IA) e, particularmente, com o uso da colheita de sêmen através de vagina artificial e diluição em extensores com antibióticos, o número de éguas contaminadas pós-inseminação diminuiu bastante (TISCHNER; KOSINIAK; BIELANSKI, 1974).

A introdução de espermatozóides na genitália da fêmea produz uma forte e rápida resposta neutrofílica em várias espécies animais (COHEN, 1984), inclusive em éguas (KOTILAINEN; HUHTINEN; KATILA, 1994). O propósito desta inflamação é limpar o útero do excesso de espermatozóides defeituosos ou mortos e de outros agentes contaminantes formados pela deposição do sêmen, e se debela em aproximadamente 36 horas em éguas normais (TROEDSSON, 1999).

Espermatozóides equinos, tanto in vivo quanto in vitro, são capazes de induzir quimiotaxia de PMNs através da ativação do complemento, sendo a atividade do complemento previamente identificada no útero da égua (TROEDSSON; LIU; THURMOND, 1993; WATSON; STROKES; BOURNE, 1987).

De acordo com Katila (2001), a interação sêmen-útero pode ser modificada por vários fatores como a concentração do volume inseminante, o número de espermatozóides utilizados, motilidade e viabilidade dos espermatozóides, o volume de sêmen e a presença ou ausência de plasma seminal.

Fiala et al. (2007), ao inseminarem 192 éguas com sêmen refrigerado, com concentrações de 100, 500 ou 1000 milhões de espermatozóides diluídos em 20 ml de solução de plasma seminal e leite desnatado, concluíram que os componentes da dose inseminante provocam uma resposta inflamatória e que

esta é mais severa e de resolução mais rápida, quanto maior for a concentração espermática.

Barbacini et al. (2003) concluíram que a incidência de acumulação de fluido intrauterino pós-inseminação foi de 25% das éguas inseminadas, e que a ocorrência maior deste acúmulo ocorre em éguas subférteis e velhas. Uma maior taxa de prenhez foi observada nas éguas que não acumularam líquido intrauterino após a inseminação. Outros estudos (WATSON et al., 2001; ZENT; TROEDSSON; XUE, 1998) também relatam taxas menores de gestação em éguas que apresentam acúmulo de LIU pós-inseminadas. No entanto, a ocorrência de fluido intrauterino de 12 a 18 horas após a inseminação com sêmen congelado não foi associada a uma redução na fertilidade, exceto em éguas maiores de 16 anos.

A acumulação de líquido ou a ocorrência de edema uterino pode reduzir seriamente as chances de prenhez nas fêmeas (TROEDSSON, 1995). Metcalf (2000) avaliou que as inflamações uterinas pós-inseminação ou endometrite aguda após a utilização de sêmen congelado não são mais severas do que as realizadas com sêmen fresco ou resfriado. Entretanto, elas parecem ser mais duradouras e variar conforme a concentração de espermatozóides depositada e o agente crioprotetor utilizado. Estes mesmos resultados também foram verificados por Kotilainen, Huhtinen e Katila (1994).

A ultrassonografia transretal facilita a visualização de pequenos acúmulos de líquidos no interior do útero (GINTHER; PIERSON, 1984). Acúmulos de líquidos menores que 3 mm de diâmetro são normais durante o estro. Os graus de ecogenicidade dos fluidos vistos no útero estão correlacionados com a quantidade de debris e leucócitos presentes (MCKINNON et al., 1988).

## 2.10 Fertilidade com sêmen congelado

O transporte espermático e a sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo da égua parecem diferir no sêmen fresco e no sêmen congelado. Esta observação sugere que o sêmen congelado tem vida média consideravelmente menor no trato reprodutivo da égua do que o sêmen fresco (TROEDSSON; LIU; CRABO, 1998). O programa de manejo quando da aplicação do sêmen congelado implica exames seriados em intervalos não maiores que 6 a 8 horas, ou ainda, à indução da ovulação através da administração de hormônios (VANDERWALL, 1997).

O número de espermatozóides móveis necessário para que se obtenha uma porcentagem de prenhez ótima ainda não foi??? estabelecido, embora a dose de 500 milhões de espermatozóides móveis seja recomendada (PICKETT et al., 1974). Alguns autores, no entanto, não observaram diferença nas taxas de prenhez pós-inseminação com 100 milhões de espermatozóides (63%) ou com 500 milhões de espermatozóides móveis (75%) (DEMICK; VOSS; PICKET, 1976).

Sieme et al. (2003) verificaram que o ideal em relação à inseminação com sêmen congelado, é uma única inseminação, realizada preferencialmente entre 12 horas antes e 12 horas após a ovulação. E segundo Pickett et al. (2000), o mínimo número de espermatozóides recomendado para uma dose inseminante com sêmen congelado é de 200 milhões de células progressivamente móveis.

Quando corretamente utilizado, a taxa média de prenhez por ciclo com sêmen congelado é de 30-40% . Entretanto, não é incomum encontrar-se taxas de prenhez por ciclo entre 0 e 100% (SAMPER, 2001).

Nas Tabelas 1 e 2 estão relatados os índices de fertilidade de éguas utilizando sêmen congelado.

Tabela 1 Índices de fertilidade com sêmen congelado, dados nacionais

<b>Autor(es)</b>	<b>Capacidade da palheta (ml)</b>	<b>N. de sptz. (x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>IA</b>	<b>Fertilidade (%)</b>
Papa (1987)	0,5	800	Corpo do útero	52
Neves Neto (1999)	0,5	800	Corpo do útero	40
	0,5	800	Corpo do útero	53,3
Dell' Aqua Junior (2000)	0,5	150	Corpo do útero	40 pré e pós
	0,5	150	ápice do corno	50 pré e pós
	0,5	800	Corpo do útero	20 pós
	0,5	400	Corpo do útero	30 pré e pós
	0,25	50	Corpo do útero	40 pós
	0,25	50	Ápice cornual	0 pós
	0,25	50	Corpo do útero	20 pós
Gomes (2002)	0,5	40	Corpo do útero	30
	0,5	40	Endoscopia	66,6
Leão (2002)	0,5	400	Corpo do útero	0
	0,5	10	Endoscopia	33,3
Zahn (2002)	0,5	400	Corpo do útero	75 s/colest.
	0,5	400	Corpo do útero	25 c/ colest.
Medeiros (2003)	0,5	800	Corpo do útero	0 glicerol
	0,5	800	Corpo do útero	40
Neves Neto (2004)	0,5	400	Ápice cornual	45
	0,5	400	Ápice cornual	60 MP50
	0,5	400	Ápice cornual	40 FR4

Fonte Vita (2008). IA. Inseminação artificial; N° sptz. Número de espermatozoides.

Tabela 2 Índices de fertilidade, dados internacionais

<b>Autor(es)</b>	<b>Capacidade da palheta</b>	<b>N. de sptz/ ml (x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>IA</b>	<b>Fertilidade (%)</b>
Nagase (1967)	0,3		10-30 pellets	33
Klug (1975)	pellets		18-33 pellets	27
Merkt (1975)	pellets		30 pellets	60
Tishner (1975)	2,5	400-700	2-4 ampolas	26
Nishikawa (1975)	1,0	75-125	3-5 palhetas	56
Naumenkov (1979)	0,2		1 pellet	53
Martin (1979)	4	200-400	1 palheta	63
Tishner (1979)	20-25	300	1 tubo alumínio	55
Loomis (1983)	0,5	250	1 palheta	29
Cristanelli (1984)	0,5	385	1 palheta	56
Volkman (1987)	0,5	325	1 palheta	44
Volkman (1987)	0,5	325	2 palhetas	73
Kloppe (1988)	4	600	1 palheta	60
Love (1989)	10-12	1000-1200	1 tubo alumínio	55
Love (1989)	4	400	1 palheta	46
Haard (1991)	0,5	500	1 palheta	60
Samper (1991)	2,5	200	1 palheta	51
Jasko (1992)	0,5	800	1 palheta	56
Thomassen (1993)	0,5	150	7 palhetas	43
Samper (1994)	2,5	200	1 palheta	38
Heitland (1995)	0,5	200	1 palheta	38

Fonte Vita (2008). IA. Inseminação artificial , sptz. espermatozoides

### **2.11 Inseminação na ponta do corno e baixas doses inseminantes**

Em 1998, dois artigos científicos descrevendo inseminação histeroscópica com baixo número de espermatozoides depositados na junção útero-tubal estimularam o ressurgimento da técnica da inseminação na ponta do corno uterino em éguas (MANNING et al., 1998; VAZQUEZ et al., 1998). O que, subsequentemente, resultou em inúmeras publicações provenientes de vários laboratórios. O termo “ressurgimento” é empregado porque enquanto esta técnica parece ser uma novidade, a inseminação na ponta do corno uterino na rotina da inseminação artificial equina foi reportada por profissionais russos em 1930 (SALZMAN, 1937).

Em equinos foi demonstrado que a habilidade dos espermatozoides congelados atingirem o oviduto, particularmente a região da ampola, é menor do que de sêmen fresco, e esta dificuldade no transporte espermático do sêmen congelado pode ser devido a alterações bioquímicas e físicas na célula espermática (BADER, 1982).

A despeito do alto número e concentrações específicas de espermatozoides que são requeridos para otimizar a fertilidade, Katila, Sankari e Mäkelä (2000) demonstraram que a maior parte do ejaculado é efetivamente e rapidamente evacuado do útero em estro através da cérvix relaxada. Na verdade, somente uma pequena porção do ejaculado permanece nas papilas de cada junção útero tubária (SCOTT et al., 2000) e muito poucos espermatozoides foram observados dentro do oviduto em diferentes estágios do ciclo estral de éguas (PARKER; SULLIVAN; FIRST, 1975).

O procedimento de inseminação na égua é feito utilizando-se uma pipeta rígida acoplada a uma seringa. A pipeta é guiada pela cérvix com o auxílio do dedo indicador e a deposição do sêmen é efetuada no corpo do útero. Em equinos, a inseminação com número reduzido de espermatozoides pelo método

convencional apresenta taxas de prenhez geralmente abaixo da expectativa. Este problema pode ser resolvido pela deposição do sêmen mais próximo do sítio de fecundação (FLEURY; CASSOLI, 1999).

Acredita-se que na região da junção útero-tubárica a reação inflamatória ocorre de forma menos intensa (SCOTT, 2000), pois se a reação fosse igual em todo útero, os espermatozóides que se aderem nas criptas da papila poderiam induzir uma infiltração de neutrófilos neste local, interferindo no número de gametas aderidos ao reservatório de espermatozóides funcionais.

Rigby et al. (2000) demonstraram que a deposição do sêmen na extremidade do corno uterino, ipsilateral ao folículo dominante, resultou em uma maior proporção de espermatozóides recuperados do oviduto do mesmo lado, do que quando os espermatozóides foram depositados no corpo do útero. Acredita-se que o aumento do número de espermatozóides no oviduto pode melhorar as taxas de fertilidade e a deposição do sêmen mais próximo da junção útero-tubárica pode levar a esta melhora na fertilidade (BRINSKO; VARNER; BLANCHARD, 1991).

Güvenc, Reilas e Katila (2005) avaliaram o efeito do número total de espermatozóides na dose inseminante e do local de deposição do sêmen, corpo do útero e ápice do corno *ipsis* lateral ao folículo pré-ovulatório, sobre a resposta inflamatória intrauterina. Verificaram que a inseminação no ápice do corno uterino com o uso da pipeta plástica flexível associada à palpação transretal, não aumentou a resposta inflamatória local, sugerindo que o uso de baixo número de espermatozóides é mais recomendável quando a inseminação é realizada na extremidade do corno.

A utilização de baixa concentração e volume de sêmen com deposição direta na papila da junção útero-tubárica parece reduzir a endometrite pós-inseminação (LINDSEY; BRUEMMER; SQUIRES, 2001).

Através de citologia uterina, Gomes (2002) verificou que a dose convencional de sêmen congelado de garanhões ( $800 \times 10^6$  espermatozoides) causa uma exacerbada resposta inflamatória uterina e observou também que a inseminação histeroscópica com baixa dose de sêmen congelado ( $40 \times 10^6$ ), levou a uma menor resposta inflamatória quando comparada com a inseminação com dose convencional. Entretanto, quando comparada com a inseminação com baixa dose no corpo do útero, a inseminação histeroscópica causou uma maior reação inflamatória no útero, mas não causou uma depreciação dos índices de fertilidade.

Buchanan et al. (2000) compararam as taxas de prenhez de grupos de éguas inseminadas com  $500 \times 10^6$  espermatozoides em 20mL no corpo do útero,  $25 \times 10^6$  em 1,0mL,  $5 \times 10^6$  em 1,0mL e  $5 \times 10^6$  em 0,2mL depositados na ponta do corno através do desvio de pipeta. Os resultados foram respectivamente de 90%, 57%, 30% e 40%, concluindo que a deposição de sêmen no corno uterino pode maximizar a fertilidade quando se utiliza baixo número de espermatozoides em pequeno volume.

De acordo com Squires (2001), o desenvolvimento de técnicas que permitem o uso de um baixo número de espermatozoides bem como a deposição do sêmen na região da papila, onde a reação inflamatória é menos intensa do que nas demais porções do útero, podem reduzir a incidência de endometrite após a inseminação, melhorando assim os índices de fertilidade.

## **2.12 Citologia endometrial**

O primeiro a descrever a técnica para exame da citologia endometrial foi Knudsen (1964). Hoje, ela é prática corrente no auxílio ao diagnóstico da endometrite bacteriana e das inflamações uterinas tanto clínica, como subclínicamente. Consiste na observação, ao microscópio óptico, de um

esfregaço obtido com a passagem de cefanete através da cérvix (MATTOS et al., 1984) para detectar a presença ou não de leucócitos polimorfonucleares. Estes só são encontrados se associados à inflamação (RICKETTS; WINGFIELD-DIGBY, 1982). Vários pesquisadores divergem quanto à quantidade de células inflamatórias necessárias para se considerar um esfregaço positivo (BETSCH, 1992). Freeman, Roszel e Slusher (1986) consideram que todo leucócito presente na luz do útero pode ser visto como sinal de endometrite. Couto e Hughes (1985) relacionam a presença dos polimorfonucleares ao número total de células e consideram a citologia positiva quando há uma proporção maior ou igual a 3% de neutrófilos sobre o total de células presentes. Mattos et al. (1984) afirmam que, na citologia endometrial de éguas sadias, não aparecem neutrófilos em qualquer fase do ciclo estral, exceto nas seguintes situações:

- a) amostras coletadas logo após o parto;
- b) amostras coletadas logo após a cobertura;
- c) amostras coletadas nos primeiros cios após o anestro invernal.

A citologia é um método mais sensível que o exame bacteriológico no auxílio ao diagnóstico da inflamação endometrial, pois todas as éguas com endometrite clínica devem apresentar também o exame citológico positivo (MATTOS et al., 1984).

Kenney (1978) considera que a citologia endometrial permite apenas o diagnóstico da endometrite bacteriana, assim como Reiswig, Threlfall e Rosol (1993). Mattos et al. (1984) encontraram uma correlação entre achados citológicos e taxas de fertilidade, pois em 206 éguas submetidas à inseminação artificial, apenas 5% das éguas portadoras de citologia positiva engravidaram.

### 2.13 Indução da ovulação em éguas

Em éguas cíclicas o propósito de se induzir a ovulação é melhorar o manejo reprodutivo e sincronizar a ovulação o mais próximo possível da cobertura, inseminação ou conveniência. Quando a monta natural ou sêmen fresco são utilizados, o intervalo entre a inseminação e a ovulação pode variar entre 0 a 48 horas. Quando do uso de sêmen congelado uma maior acurácia é necessária, e o intervalo deve ser menor que 24 horas (PALMER; QUELLIER, 1993).

A maneira mais apropriada para selecionar o momento de induzir a ovulação consiste na utilização de agentes indutores quando um folículo de 33mm é detectado em éguas pôneis e um de 35mm em éguas, momento em que o folículo encontra-se responsivo ao LH (PALMER; QUELLIER, 1993).

Segundo Samper (2001), quando se insemina éguas com sêmen congelado é importante usar um agente indutor da ovulação para maximizar o uso do sêmen, minimizando o número de doses por ciclo, resultando na redução do intervalo entre a inseminação e a ovulação. Há dois tipos de hormônios usados para induzir a ovulação em éguas: a Gonadotrofina Coriônica humana (hCG) e o implante de um análogo do GnRH (Desorelina). Tipicamente 2500UI de hCG administrados por via intravenosa em éguas em cio com folículos entre 30-35mm de diâmetro resulta em ovulações ocorrendo em 92% das éguas até 48h (BARBACINI et al., 2000).

O momento da administração do hCG normalmente é ditado pela associação de alguns fatores, dentre eles: a) período do ano, b) comportamento de estro, c) ecotextura uterina, tônus uterino e cervical, d) ecotextura da parede do folículo pré-ovulatório e f) diâmetro e formato do maior folículo. De todos os fatores citados, a administração do hCG é realizada quando um folículo atinge 35mm de diâmetro durante a fase folicular (BERGFELT, 2000).

Apesar de ser um agente indutor de ovulação largamente utilizado, o hCG apresenta a inconveniência de induzir a formação de anticorpo após algumas injeções sucessivas (DUCHAMP et al., 1987).

Devido à larga variação no intervalo de ovulação após indução com hCG, as éguas devem ser examinadas de 6-6 horas a partir de 24h após a aplicação do hormônio, e a inseminação realizada imediatamente após a detecção da ovulação (SAMPER, 2001).

Muitos estudos têm avaliado o uso do GnRH e seus análogos no controle do ciclo estral de éguas. A administração do GnRH sintético durante o estro estimula a liberação de LH e reduz a duração do estro (IRVINE et al., 1975). O desenvolvimento de agonistas e análogos de GnRH aumentou a meia vida deste hormônio através de modificações estruturais no GnRH natural, o que permitiu o aumento nos níveis de LH por 12 a 24 horas após a administração dos mesmos (BERGFELT, 2000).

A deslorelina é um análogo do GnRH e encontra-se disponível na forma comercial de Ovuplant, um implante de curta duração que libera 2,2 mg a cada 2 a 3 dias. Este implante de deslorelina tem-se demonstrado eficiente em aumentar as concentrações de LH e induzir a ovulação em éguas cíclicas (MUMFORD et al., 1995; SQUIRES et al., 1994).

Três estudos compararam o Ovuplant com o hCG e obtiveram um intervalo entre tratamento e ovulação, respectivamente, de 1.98 a 1.88 dias (MCKINNON; VOSS, 1993), 46,9 a 43 horas (MEINERT et al., 1993) e 2, 2 a 2,2 dias (VANDERWALL; JUERGENS; WOODS, 2001). Melo et al. (2005) compararam o uso de deslorelina (1 mg/IM) com o extrato de pituitária equina (EPE) (10mg/IV) e constataram que ambos os agentes foram eficientes na indução da ovulação, sendo que o período ovulatório após a administração da deslorelina e do EPE, foram respectivamente: 38, 9 e 34, 7 horas.

O extrato de pituitária equina tem sido usado em diversos protocolos de superovulação em éguas (ALVARENGA et al., 2001; DOUGLAS; NUTI; GINTHER, 1974; WOODS; GINTHER, 1983).

Duchamp et al. (1987) demonstraram que uma única administração de 25mg de EPE, na presença de um folículo de 35mm de diâmetro, induziu a ovulação em 75% das éguas no período entre 24 e 48 horas.

Medeiros et al. (2005) compararam o uso do EPE na concentração de 10 e 5 mg intravenoso e constataram que ambas as doses foram eficientes em induzir a ovulação em um período de 48 horas do momento da ovulação, sendo para 10 e 5mg, respectivamente,  $34,4 \pm 6,72$  e  $37,54 \pm 3,05$  horas.

O extrato de pituitária equina, ao contrário do hCG, não induz à formação de anticorpos. Entretanto, deve-se levar em consideração a heterogeneidade das amostras de EPE (PALMER; QUELLIER, 1993).

Além da eficiência do EPE na indução de ovulação em éguas, outra vantagem é o estreito do intervalo entre a indução e a ovulação, o que favorece o uso de sêmen congelado nesta espécie, por reduzir o número de inseminações sem o comprometimento da fertilidade (MELO, 2005).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local e animais**

O experimento foi realizado na Fazenda Floresta – Haras Porteira de Tábua, situada no município de Três Pontas, durante o período de setembro de 2009 a junho de 2010.

Foram disponibilizadas para o experimento 29 éguas da raça Mangalarga Marchador, férteis, sadias clinicamente e de idade entre 3 e 15 anos. Todas as éguas foram submetidas ao exame citológico uterino em fase de estro, e somente se admitiu no experimento os animais negativos para tal exame (menos de 1 célula inflamatória para cada 10 células endometriais). Somente uma égua foi positiva ao exame e não foi incorporada ao experimento. As 28 éguas restantes foram divididas em 2 classes de idade: mais jovens (entre 3 e 7 anos de idade) e mais velhas (entre 8 e 15 anos de idade) (Gráfico 1).

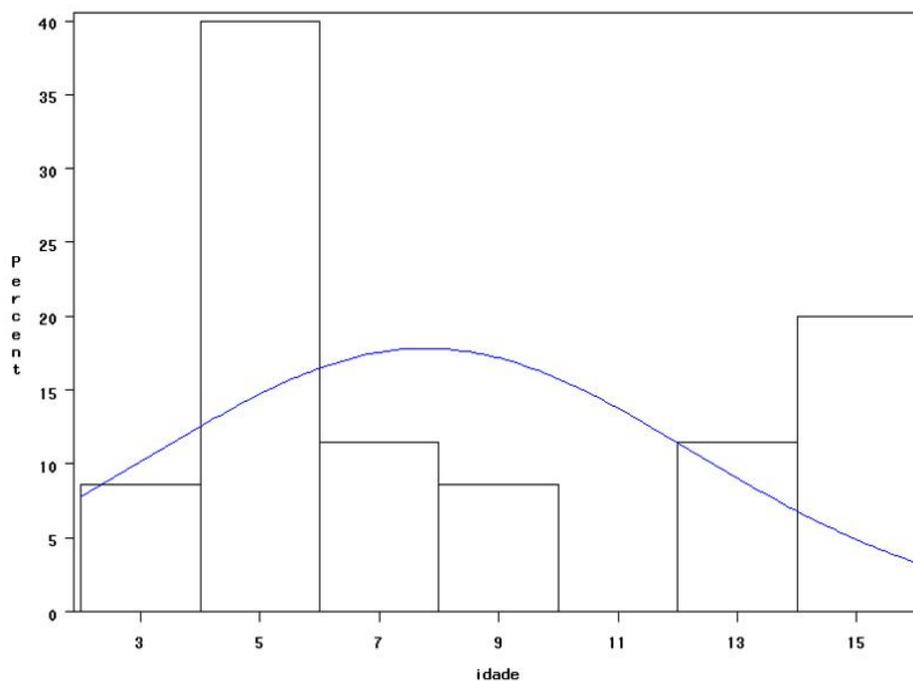


Gráfico 1 Distribuição percentual da idade das éguas disponíveis para o experimento

Os animais foram alojados em pasto natural de 30 hectares de grama batatais (*Paspalum Notatum*), capim jaraguá (*Hiparrhenia rufa*) e capim gordura (*Melinis Minutiflora*) em sistema de pastejo contínuo. Foram vermifugadas com piraverme em setembro de 2009 e desde então receberam suplementação mineral orgânica (Aminopan Haras).

Foi utilizado sêmen de apenas um garanhão, também Mangalarga Marchador, de 3 anos de idade, clinicamente saudável, apto à reprodução e de bom histórico de fertilidade. Foram congeladas 07 partidas, em dias alternados.

O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml devidamente identificadas, as quais continham 100 milhões de espermatozóides viáveis cada.

### **3.2 Seleção e avaliação dos animais**

Antes de se iniciarem no experimento, os animais foram identificados, vermifugados Lutalyse® - Pfizer e banhados com solução carrapaticida Cypermil® – Ouro Fino. Também foram fotografados e avaliados quanto ao escore corporal, no início e final do período experimental, de acordo com metodologia proposta por Carroll e Huntington (1988).

Em cada égua, na primeira palpação foi identificada a fase do ciclo estral e aquelas que se apresentavam em diestro, com corpo lúteo ativo, receberam uma injeção intramuscular de 6,71mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse®) para a indução da luteólise. Estes animais entraram em estro 5 dias após a administração do luteolítico. Em seguida, foram acompanhadas diariamente e quando apresentaram edema uterino foi coletado material para a citologia uterina. Nas demais éguas foi realizado o mesmo procedimento; a partir do momento em que entraram em diestro com corpo lúteo ativo.

Para a colheita de material para a citologia uterina utilizou-se escova ginecológica (LARBOLEX® – São Paulo) acoplada a uma haste de metal protegida pela mão com luva de palpação retal. Em seguida realizaram-se esfregaços do material obtido em lâminas, fixando-as em metanol por dez minutos. As lâminas foram coradas por corante panótico. A interpretação do exame citológico foi realizada de acordo com Brook (1993): os animais que apresentassem menos de 1 célula inflamatória para cada 10 células endometriais eram considerados negativos à citologia, ou seja, não apresentavam reação inflamatória uterina, ainda que na forma subclínica. O cio em que as éguas

foram submetidas ao exame citológico não foi utilizado para inseminações. Elas foram induzidas ao estro com luteolíticos no diestro subsequente.

### **3.3 Tratamentos**

As éguas foram distribuídas nos grupos experimentais obedecendo ao seguinte critério: cada 2 éguas com idades próximas foram sorteadas para os grupos A e B. Foram estabelecidos 2 períodos para as inseminações: período 1 foi o primeiro estro que as éguas apresentaram após o exame citológico, o qual foi utilizado para as primeiras inseminações. Já o período 2 correspondeu ao estro subsequente, no qual as éguas do grupo A1 passaram para o grupo B2 e as éguas do grupo B1, passaram para o grupo A2, caracterizando os tratamentos descritos a seguir:

**A1:** Grupo controle: inseminação sem diluição no primeiro estro após o exame citológico

**B1:** Grupo inseminado com sêmen diluído, no primeiro estro após o exame citológico

**A2:** Grupo controle: inseminação sem diluição, no segundo estro após o exame citológico

**B2:** Grupo inseminado com sêmen diluído, no segundo estro após o exame citológico

### **3.4 Partidas de sêmen**

Foram congeladas 07 partidas de sêmen do garanhão Verniz da Calciolândia. Primeiramente, testaram-se meios crioprotetores: FR4, FR5<sup>2</sup> e Botucrio<sup>3</sup>. De acordo com os fabricantes, todos eles apresentam osmolaridades similares, próximas de 1500 mOsm/L, sendo que com o uso do Botucrio os

resultados foram superiores nas amostras testadas e descongeladas, avaliando-se a porcentagem de espermatozóides móveis de modo subjetivo, concordando com resultados de outros autores (ALVARENGA, 2002; MEDEIROS, 2003; PASQUINE et al., 2007; ZIMMERMANN et al., 2009). Decidiu-se então pelo uso deste como meio de congelamento.

As coletas foram realizadas em dias alternados, utilizando-se vagina artificial do tipo rígida (modelo Hanover) e filtro de nylon próprio para remoção da fração gel. Após a coleta, foram analisadas as seguintes características: volume (em ml), aspecto, coloração, motilidade (0-100%), vigor (0-5) e concentração espermática (diluição 1:20), em Câmara de Neubauer e microscópio ótico com objetiva de 20X.

A análise da motilidade espermática foi realizada de forma subjetiva, iniciando-se antes do congelamento até pós-descongelamento. E seguia-se o seguinte padrão: diluía-se o sêmen até que se pudessem contar os espermatozóides móveis em um campo. No sêmen recém coletado, a quantidade de diluente variava conforme a concentração que apresentou o sêmen. Já no sêmen descongelado, a proporção era de aproximadamente 4 ml de diluente para uma palheta de 0,5 ml de sêmen. Elegiam-se 6 campos microscópicos aleatoriamente. Em cada campo, contavam-se os espermatozóides móveis e os imóveis. Destes 6 campos, desprezávamos as duas contagens mais discrepantes e então era considerada a média das 4 contagens restantes.

O garanhão utilizado neste estudo apresentava mais de 80% dos seus espermatozóides móveis com motilidade progressiva. Pela dificuldade de separar motilidade total e progressiva no momento destas avaliações, e por este animal apresentar alta taxa de motilidade progressiva, os espermatozóides móveis eram considerados viáveis. Os resultados estão ilustrados na tabela X.

O sêmen foi diluído com extensor à base de leite desnatado (proporção 1:1) e centrifugado a 800g/12 min. O sobrenadante foi desprezado e os *pellets*

ressuspendidos com meio de congelação Botucrio, contendo 5% de meio crioprotetor dimetil-formamida (SIGMA-ALDRICH®). O envase foi realizado em palhetas de 0,5mL, identificadas e lacradas com esferas de aço, com uma concentração final de 100 milhões de espermatozóides viáveis por palheta. Em seguida, foram resfriadas em Equitainer® até 5°C por 60min. Posteriormente, colocadas em suporte de aço inox a 3cm acima do nível de nitrogênio líquido, distribuído em uma caixa de isopor, à temperatura aproximada de -120°C por 20min. Após este período foram imersas no nitrogênio líquido em temperatura próxima de -196°C e armazenadas em botijão criobiológico.

Para avaliação pós-congelação, descongelava-se uma palheta de cada amostra, à temperatura de 45°C por 20" e armazenadas em tubos de microcentrifuga previamente aquecidos à 37 °C, aos quais eram acrescidos 4ml de diluente Botusêmen® com intuito de diluir o sêmen e assim facilitar a contagem de espermatozóides por campo para estimativa da motilidade. Pequena gotícula do sêmen sem diluição também era avaliada quanto à motilidade, de forma subjetiva.

### **3.5 Procedimento experimental**

O procedimento experimental durou 90 dias, e foi dividido em duas etapas: a primeira teve duração de 20 dias, quando foi congelado o sêmen do garanhão e realizados os exames citológicos uterinos e a sincronização de estros. A segunda etapa durou setenta dias; nesta foram feitas as induções, inseminações e acompanhamentos ultrassonográficos.

A segunda etapa foi iniciada no estro subsequente aos exames citológicos, no qual as éguas foram inseminadas com sêmen descongelado diluído ou sem diluição. Diariamente, as éguas eram acompanhadas através de palpação retal e ultrassonografia até que apresentassem folículos com no mínimo

35 mm de diâmetro e edema uterino, quando eram então induzidas à ovulação utilizando-se 6 mg de Extrato de Pituitária Equina (EPE), aplicados por via endovenosa.

De 18 a 20 horas após a indução com EPE as éguas foram inseminadas obedecendo aos seguintes protocolos:

Grupo A1: protocolo tradicional: inseminação sem diluição. Foram descongeladas 3 palhetas à temperatura de 45°C por 20 seg e introduzidas na ponta do corno uterino ipsilateral ao folículo pré-ovulatório, por meio de pipetas flexíveis e direcionamento por palpação retal.

Grupo B1: inseminação com sêmen diluído. Foram descongeladas 3 palhetas à temperatura de 45°C por 20 seg. e armazenadas em tubos de microcentrífuga, previamente esterilizados e aquecidos à 37 °C, nos quais eram acrescidos 1,5 ml de diluente Botusêmen® (diluição 1:1). Passados 3 min, eram acrescidos mais 3 ml de Botusêmen® (diluição 1:1). Ao final, 6 ml de sêmen eram depositados também na ponta do corno uterino *ipsilateral* ao folículo pré-ovulatório da mesma maneira que era realizado nas éguas do grupo A1.

Em virtude da ausência de crioprotetor no extensor de sêmen Botusêmen® (osmolaridade 350 mOsmol/L), a diluição seriada fazia com que a concentração do crioprotetor passasse de 5% (concentração de crioprotetor então presente no sêmen, proveniente do meio crioprotetor Botucurio®) nas palhetas pós descongelamento, para 2,5% à primeira diluição e à 1,25% à segunda diluição.

Após a inseminação, as éguas eram palpadas a cada 2 horas até que viessem a ovular, ou até 36 horas após a inseminação. Os animais que não ovularam até este período foram considerados, para melhor compreensão dos resultados, como se tivessem ovulado com 36 h pós-inseminação.

Passados 15 dias da data da ovulação, estes animais eram palpados e diagnosticados quanto gestantes ou não gestantes e em ambos os casos era

induzida a luteólise através de injeção intramuscular de 6,71mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse®).

No período 2 do experimento, os procedimentos com relação aos acompanhamentos ultrassonográficos, indução, hora da inseminação, inseminação e palpação até a ovulação e diagnóstico gestacional foram os mesmos já relatados no período 1. A diferença é que as éguas que foram inseminadas sem diluição (grupo A1) no período 1, passaram a ser inseminadas com sêmen diluído (grupo B2) no período 2. E já as éguas que foram inseminadas com sêmen diluído no período 1 (grupo B1), foram inseminadas com sêmen sem diluição (grupo A2) no período 2.

Depois de selecionadas as éguas, existiam requisitos para que elas fossem inseminadas e conseqüentemente utilizadas no experimento. Estes requisitos eram: apresentar folículo dominante de no mínimo 35 mm de diâmetro, edema uterino para que fosse possível induzir a ovulação e não haverem ovulado até o momento da inseminação.

### **3.6 Requisitos para as inseminações**

Das 28 éguas selecionadas para o experimento, nos grupos que foram inseminadas com sêmen sem diluição (A1 e A2): 7 animais não apresentaram folículo dominante com no mínimo 35 mm de diâmetro (requisito para que se possa induzir a ovulação), por isso não foram utilizadas nesta fase, restando 21 éguas.

Nos grupos de inseminação com diluição seriada (B1 e B2) das mesmas 28 éguas: 8 não apresentaram folículo dominante com no mínimo 35 mm de diâmetro. E 6 delas apresentaram condições de serem induzidas, porém ovularam antes de serem inseminadas e por isso também foram impossibilitadas de participar desta fase do experimento, restando 14 éguas.

### **3.7 Avaliação do crescimento folicular e líquido intrauterino por ecografia**

Após cada inseminação, independentemente do período ou do protocolo utilizado, as éguas eram palpadas e acompanhadas ecograficamente a cada 2 horas, até que viessem a ovular, ou até 36 horas após a inseminação.

A cada palpação eram avaliados:

Tamanho folicular – mensurado em milímetros.

Flutuação folicular, classificada em: 1 – rígido, 2 – pouco flutuante e 3 – flutuante e com fina membrana.

Edema uterino, classificado em: 0- nenhum edema, 1 – pouco edema, 2 – edema com dobras uterinas já evidentes e 3 – dobras uterinas bastante definidas e impressão digital marcada à palpção.

Acúmulo de líquido intrauterino (LIU), classificado em: 0 – ausência de LIU acumulado, 1 – pouco LIU acumulado entre as dobras uterinas, 2 – LIU já formando acúmulos maiores que 10 mm de diâmetro e 3 – LIU acumulado em compartimentos maiores que 20 mm de diâmetro.

Após a ovulação, as éguas deixavam de ser acompanhadas, até que se passassem 16 dias da data da ovulação. No décimo sexto dia após a ovulação, cada égua era palpada e diagnosticada quanto à presença de vesícula gestacional ou não. Todas as éguas no período 1, gestantes ou não, eram submetidas à luteólise e indução de novo estro por meio de aplicação intramuscular de 6,71mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse®). As quais retornavam ao estro aproximadamente 5 dias após a aplicação deste.

### 3.8 Análises estatísticas

O modelo inicial incluiu tratamento, etapa, interação entre tratamento e etapa e o erro aleatório. O programa estatístico utilizado para todas as análises foi o Statistical Analysis Systems Institute - SAS Institute (1998). O delineamento utilizado foi em ensaio de reversão (*Switch Back*). Para as análises foram criadas classes de idade (BALL; WOODROW; BERRY, 1987), sendo: classe 1 – animais jovens com idade entre 3 e 7 anos; classe 2 – animais mais velhos entre 8 e 15 anos. Foram ainda criadas classes para o tempo transcorrido entre a IA e a ovulação após indução, sendo: classe 1 – tempo variando de 2 a 16 horas entre a IA e a ovulação; classe 2 – tempo entre 17 e 36 horas. A variável LIU foi dicotomizada (com ou sem presença de líquido).

Com o objetivo de se comparar a taxa de éguas prenhes em cada tratamento, bem como entre as classes de idades definidas e tempo transcorrido entre a IA e a ovulação, foi utilizado o procedimento GENMOD (modelos generalizados). Os dados foram transformados segundo a função Logit, com a opção de distribuição binomial. Foi realizada ainda análise de variância (Proc GLM) entre o tempo transcorrido da ovulação até a IA, dentro de tratamentos e classes de idades. Os valores médios foram calculados pelo procedimento lsmeans, expressos em médias e erro padrão da média percentual, ou seja, médias dos quadrados mínimos que consideram o desbalanceamento entre os grupos “tratamento e classes estabelecidas”. Para todas as análises o nível de significância adotado foi de 5%. Os dados foram apresentados como efeito principal somente, uma vez que, não houve efeito interativo entre tratamento e período.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes às variações de cada partida estão apresentados na Tabela 3. As variações no volume, concentração espermática e motilidade determinavam a quantidade de doses de cada partida. Assim, mesmo que cada partida apresentasse qualidade diferente, isso era corrigido através das doses. Foi considerada dose inseminante, 300 milhões de espermatozóides viáveis, ou 3 palhetas.

Os dados referentes à qualidade seminal estão apresentados na Tabela 4. A taxa de motilidade espermática do sêmen fresco variou de 50 a 80 %, enquanto a do sêmen pós-congelamento variou de 20 a 35. O que era esperado devido às crioinjúrias sofridas pelas células nos processos de congelamento e descongelamento.

Tabela 3 Qualidade seminal e número de doses de cada partida congelada – Três Pontas – 2009/2010

Partida	Volume ejaculado (ml)	Concentração espermática (x 10 <sup>6</sup> /ml)	Número de doses
1	35	70	3
2	35	110	10
3	30	70	4
4	55	50	6
5	40	115	10
6	45	45	4
7	45	65	7

Tabela 4 Valores de motilidade total (%) pré e pós-congelamento do sêmen do garanhão Verniz da Calciolândia – Três Pontas – 2009/2010

Partida	Motilidade total (%)	
	Sêmen fresco	Sêmen descongelado
01	50	20
02	80	25
03	70	30
04	80	35
05	70	30
06	60	35
07	75	30

Das 28 éguas selecionadas para o experimento, nos grupos que foram inseminadas com sêmen sem diluição (A1 e A2): 7 animais não apresentaram folículo dominante com no mínimo 35 mm de diâmetro (requisito para que se possa induzir a ovulação), por isso não foram utilizadas nesta fase, restando 21 éguas.

Nos grupos de inseminação com diluição seriada (B1 e B2) das mesmas 28 éguas: 8 não apresentaram folículo dominante com no mínimo 35 mm de diâmetro. E 6 delas apresentaram condições de serem induzidas, porém ovularam antes de serem inseminadas e por isso também foram impossibilitadas de participar desta fase do experimento, restando 14 éguas (Tabela 5).

Tabela 5 Distribuição dos animais entre os grupos – Três Pontas – 2009/2010

	Grupos A1 e A2	Grupos B1 e B2
Animais disponíveis	28	28
Sem folículo dominante	7	8
Ovuladas antes da IA	0	6
Restante **	21	14

A ocorrência destes incidentes que impediram alguns animais de participarem de um ou outro período do experimento, não afetou a distribuição etária, nem tampouco a média de tempo transcorrido entre inseminação e ovulação nos grupos tratados. O que reforça a igualdade de condições entre os grupos mesmo que com números de animais (n) diferentes.

Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre as médias das idades dos grupos tratados (Gráficos 2 e 3).

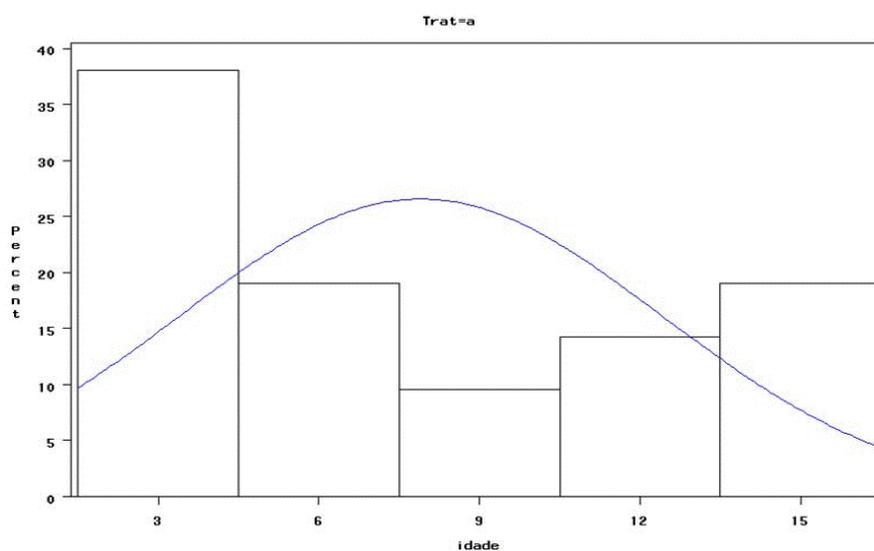


Gráfico 2 Porcentagem de animais com relação à idade dos Tratamentos A1 e A2 (sem diluição): 10,9 anos

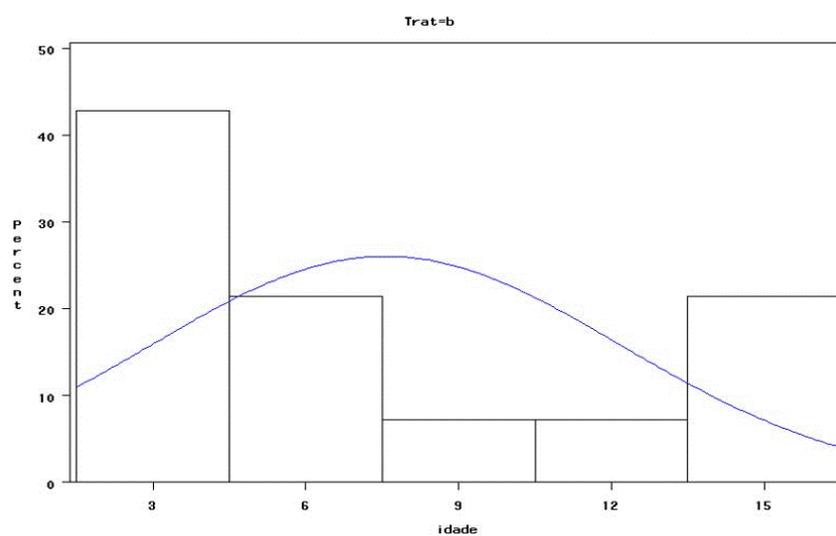


Gráfico 3 Porcentagem de animais com relação à idade dos Tratamentos B1 e B2 (sêmen diluído): 11,9 anos

#### 4.1 Taxas de prenhez

A taxa de prenhez das éguas que foram inseminadas com sêmen diluído foi superior ( $P < 0,05$ ) à das éguas que foram inseminadas com sêmen sem diluição (Tabelas 6 e 7). Provavelmente este resultado é devido a uma maior durabilidade resultante da redução do estresse osmótico na diluição seriada. Resultado semelhante a este foi observado *in vitro* por Zimmermann (2007), em sêmen equino criopreservado com crioprotetor dimetilformamida a 5% e diluído pós-congelação, onde relatou uma maior sobrevivência das células espermáticas. Wessel e Ball (2004) observaram que a rápida remoção do glicerol de sêmen equino a fresco resultou na redução da motilidade e da integridade de membrana dos espermatozoides, enquanto a diluição seriada do glicerol desse mesmo sêmen resultou na melhora na manutenção tanto da motilidade quanto da integridade de membrana dos espermatozoides. Porém, concluiu-se não haver efeito benéfico similar quando feita a diluição seriada com o sêmen criopreservado.

Tabela 6 Taxa de gestação  $\pm$  dp (n) de éguas inseminadas em tempo fixo com sêmen descongelado diluído ou não – Três Pontas – 2009/2010

Tratamento	Gestante (%)		Média trat. <sup>1</sup>
	Período 1	Período 2	
Sêmen diluído	28.6 $\pm$ 14 (2 de 7)	57.1 $\pm$ 14 (4 de 7)	42,9 $\pm$ 10 (14) a
Sêmen não diluído	0,0 $\pm$ 0,1 (0 de 11)	10,0 $\pm$ 11 (1 de 10)	5,0 $\pm$ 8 (21) b
Média período*	14,3 $\pm$ 9 (18) A	33,6 $\pm$ 9 (17) A	36,1 $\pm$ 20 (35)**

\*Médias com letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si a 5%, pelo procedimento lsmeans <sup>1</sup>Trat. = tratamento; \*\*não significativo.

Tabela 7 Efeito da diluição seriada do sêmen equino descongelado sobre a proporção de éguas gestantes após inseminação artificial – Três Pontas – 2009/2010

Tratamento*	Gestantes (%)	Vazias (%)	Total
Sêmen diluído	6 (42,9)	8 (57,1)	14
Sêmen não diluído	1(4,8)	20 (95,2)	21
Total	7	28	35

\*P=0,0058

Não houve efeito interativo ( $P>0,05$ ) entre tratamento e etapa experimental, evidenciando que no delineamento experimental não houve efeito residual da indução luteolítica.

O sêmen utilizado foi de um garanhão de fertilidade comprovada, tanto em monta natural quanto com sêmen congelado em procedimentos de descongelamento e inseminação de rotina, a interpretação dos resultados de prenhez torna-se consistente. Além da efetividade estável do sêmen em termos de crioresistência e de capacidade fecundante elimina-se a variação individual entre garanhões.

#### 4.2 Tempo decorrido entre inseminação e ovulação

Os grupos A1 e B1, nos quais os animais foram inseminados com sêmen sem diluição, funcionaram como controles negativos. Ou seja, por se tratar de inseminação em tempo fixo, não haveria o acompanhamento rigoroso da dinâmica folicular para que a inseminação ocorresse o mais próximo possível da ovulação. Quanto mais distante da ovulação fosse feita a inseminação, mais estaríamos avaliando a durabilidade do sêmen. Isso explica a baixa taxa de

concepção conseguida nos grupos inseminados sem diluição (A1 e 2), já que estes grupos não passaram pela redução do estresse osmótico através da diluição seriada.

O tempo decorrido entre a inseminação e a ovulação foram respectivamente de  $20.2 \pm 2.5$  horas e  $20.6 \pm 3.1$  horas, para os tratamentos que utilizaram sêmen não diluído e diluído. Não sendo verificada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) no tempo decorrido entre inseminação e ovulação dos grupos tratados.

No que diz respeito à idade, também não foi verificada diferença ( $P > 0,05$ ) no tempo decorrido entre inseminação e ovulação das Classes avaliadas. Este tempo foi de  $19,8 \pm 2.4$  horas para as jovens e de  $21.0 \pm 3.2$  horas para as adultas.

Como houve largo coeficiente de variação dos intervalos inseminação-ovulação entre os animais, dividimos os animais em duas classes de acordo com o tempo que levaram para ovular desde a inseminação, sendo:

Classe de ovulação 0: classe de ovulação entre 2 a 16 horas pós inseminação

Classe de ovulação 1: classe de ovulação de 17 a 36 horas pós inseminação

Observou-se diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a quantidade de éguas gestantes quando se comparou as classes de tempo que levaram para ovular após a IA (Tabela 8). Independente do tratamento, o tempo que as éguas levaram para ovular após a inseminação influenciou as suas possibilidades de desenvolver uma gestação.

Tabela 8 Efeito da classe de ovulação após IA sobre a proporção de éguas gestantes – Três Pontas – 2009/2010

Classe de ovulação	Gestantes (%)	Vazias (%)	Total
0	6 (33,33)	12 (66,67)	18
1	1(5,88)	16 (94,12)	17
Total*	7	28	35

\*P=0,0424.

### 4.3 Efeito da idade na taxa de prenhez

Como no experimento lidamos com animais com larga diferença de idade (3 a 15 anos), para melhor analisarmos os resultados, dividimos estes animais em duas classes:

Idade 1: animais jovens, de 3 a 7 anos de idade

Idade 2: animais adultos, de 8 a 15 anos de idade

Não foi verificada influência ( $P>0,05$ ) da idade sobre a proporção de éguas gestantes. No entanto, percebe-se que as éguas jovens respondem melhor ao tratamento (Tabela 9).

Tabela 9 Efeito da classe de idade sobre a proporção de éguas gestantes – Três Pontas – 2009/2010

Idade *	Gestantes (%)	Vazias (%)	Total
Jovens	6 (27,7)	16 (72,7)	22
Velhas	1(7,7)	12 (92,3)	13
Total	7	28	35

\*P=0,1617

#### **4.4 Reação pós inseminação**

A reação inflamatória uterina decorrente da inseminação foi avaliada por meio da ocorrência ou não de acúmulo de LIU e a sua intensidade (0 a 3) nas observações ultrassonográficas.

Primeiramente, os dados de presença de líquido no útero foram categorizados em presente ou ausente. Sendo que as éguas que foram inseminadas com sêmen diluído em duas etapas apresentaram acúmulo de LIU em 3,9% das vezes em que foram avaliadas ecograficamente. Já aquelas que foram inseminadas com sêmen sem diluição apresentaram acúmulo de LIU em 29,1% das observações (Tabela 10). Estes resultados estão de acordo com Kotilainen, Huhtinen e Katila (1994) que observaram reações uterinas mais duradouras, variando conforme a concentração de espermatozoides depositada e o agente crioprotetor utilizado.

Tabela 10 Efeito do protocolo de inseminação artificial com sêmen descongelado equino sobre a presença de líquido intrauterino visualizado por ultrassonografia. Médias  $\pm$  dp (n / número de observações dentro de cada tratamento e classes) – Três Pontas – 2009/2010

Variáveis	Presença de Líquido Intrauterino (%)	Probabilidade		
		Tratamento	HPIC	Idade
<b>Protocolos*</b>				
Desc. Direto	29,1 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup> (64/220)	0,0001	0,276	0,769
Duas Etapas	3,9 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup> (7/182)			
<b>Pós Inseminação</b>				
2 -12 horas	15,6 $\pm$ 2,0 (29/186)			
14-26 horas	19,4 $\pm$ 1,9(42/216)			
<b>Classe de Idade</b>				
3 – 6 anos	16,7 $\pm$ 1,8 (37/221)			
7-15 anos	18,8 $\pm$ 2,0 (34/181)			

\* letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si a 5% pelo quadrado mínimo – lsmeans.

Estes resultados estão de acordo com resultados observados por Troedsson (1995), onde concluíram que a acumulação de líquido ou a ocorrência de edema uterino pode reduzir seriamente as chances de prenhes nas fêmeas. E por outro lado, Ball e Vo (2001) relatam que uma rápida remoção de crioprotetores permeáveis pode resultar em menor choque hiposmótico quando diluídos em meios diluentes ou nos fluidos do trato reprodutivo das éguas, podendo sugerir que a diluição seriada do sêmen descongelado pode acarretar uma perda menor das células espermáticas, levando a uma menor reação uterina nas éguas inseminadas e a um provável aumento nas taxas de concepção.

## 5 CONCLUSÃO

Nas condições em que este experimento foi realizado, tendo em vista os resultados obtidos, pôde-se concluir que: Reduzir o estresse osmótico por meio da diluição seriada do sêmen pode incrementar a taxa de gestação em éguas inseminadas em períodos maiores que 6 horas pré-ovulação; Inseminações em menor concentração espermática e de crioprotetores são menos nocivas ao TR da égua; O tempo decorrido desde a inseminação até a ovulação é determinante no sucesso das inseminações; A diluição seriada do sêmen congelado leva a uma menor resposta inflamatória uterina.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. A. **Melhoria da resistência espermática à congelção e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões.** 2002. 68 p. Tese (Livro Docência em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- ALVARENGA, M. A. et al. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 32, n. 6, p. 541-545, Dec. 2000a.
- \_\_\_\_\_. Alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, Estocolmo. **Proceedings...** Estocolmo: Animal Reproduction, 2000b. p. 73.
- \_\_\_\_\_. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 105-113, Oct. 2005.
- \_\_\_\_\_. Improvement of ovarian superstimulatory: response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 56, n. 3, p. 879-887, July/Sept. 2001.
- \_\_\_\_\_. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: WORKSHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 12., 2003, Brewster. **Proceedings...** New York: Havemeyer Foundation, 2003. p. 74-76.
- AMANN, E. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 7, n. 1, p. 145-173, Jan. 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction.** Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993. p. 715-745.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K.; FULLER, B. J. (Ed.). **Temperature and animal cells.** Cambridge: Biologists, 1987. p. 395-406.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, London, v. 89, n. 1, p. 65-75, Oct. 2005.

BADER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. **Journal of Reproductive and Fertility - Supplement**, Cambridge, v. 32, n. 1, p. 59-64, 1982.

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**, Lawrence, v. 22, n. 6, p. 1061-1069, Nov./Dec. 2001.

BALL, J.; WOODROW, I.; BERRY, J. A model predicting stomatal conductance and its contribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. **Progress in Photosynthesis**, Dordrecht, v. 4, n. 1, p. 221-224, 1987.

BARBACINI, S. et al. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination program using frozen semen. **Equine Veterinary Education**, Newmarket, v. 2, n. 6, p. 404-408, Dec. 2000.

\_\_\_\_\_. Retrospective study of the incidence of post-insemination uterine fluid in mares with frozen-thawed semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 23, n. 12, p. 493-496, Dec. 2003.

BAUMBER, J.; BALL, B. A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 60, n. 3, p. 1239-1247, Feb. 2003.

BAUMBER, J. et al. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 57, n. 3, p. 1025-1033, Mar. 2002.

BERGEFELT, D. R. Estrous synchronization mare. In: \_\_\_\_\_. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 195-228.

BETSCH, J. M. Diagnostic de l'infertilité d'origine cervico-utérine chez la jument. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, Maisons, v. 168, n. 11/12, p. 1011-1027, 1992.

BLANCHARD, T. L. et al. **Manual of equine reproduction**. New York: Mosby, 2003. 117 p.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. The effect of uterine lavage performed four h post insemination on pregnancy rate in mares. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 35, n. 6, p. 1111-1119, June 1991.

BROOK, D. Uterine cytology. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 246-253.

BRYANS, J. T. Research on bacterial diseases of horses. In: \_\_\_\_\_. **Lectures for stud managers' course**. Lexington: Kentucky, 1962. p. 153-160.

BUCHANAN, B. R. et al. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 53, n. 6, p. 1333-1344, Apr. 2000.

CARROLL, C. L.; HUNTINGTON, P. J. Body condition scoring and weight estimation of horses. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 20, n. 1, p. 41-45, Jan. 1988.

COHEN, J. Immunological aspects of semen selection and transport. In: CRINGTON, D. B. (Ed.). **Immunological aspects of reproduction in mammals**. Kent: Butterworths, 1984. p. 77-89.

CORMIER, N.; BAILEY, J. L. A differential mechanism is involved during heparin and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, n. 1, p. 177-185, July 2003.

COTORELLO, A. C. P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelamento e avaliação do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 1, p. 14-25, jan./mar. 2002.

COUTO, M. A.; HUGHES, J. P. Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 4, n. 6, p. 265-273, 1985.

CROSS, N. L. Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, n. 2, p. 529-534, Apr. 2003.

CUEVA, F. I. C. et al. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 48, n. 2/4, p. 301-315, Aug. 1997.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and metyl cellulose. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 49, n. 6, p. 831-841, Oct. 1997.

DEMICK, D. S.; VOSS, J. L.; PICKET, B. W. Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoa numbers on equine fertility. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 43, p. 633-637, 1976.

DOUGLAS, R. H.; NUTI, L.; GINTHER, O. J. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 2, n. 6, p. 133-142, Dec. 1974.

DUCHAMP, G. et al. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility - Supplement**, Cambridge, v. 35, n. 1, p. 221-228, 1987.

ELLINGTON, J. E. et al. In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products. **Animal Reproduction Science**, London, v. 56, n. 1, p. 51-65, May 1999.

FAHY, G. M. et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, San Diego, v. 27, n. 3, p. 247-268, June 1990.

FIALA, S. M. et al. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 67, n. 3, p. 556-562, Feb. 2007.

FISCHER, B.; BEIER, H. M. Uterine environment in early pregnancy. In: SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G. (Ed.). **Embryonic mortality in farm animals**. Netherlands: M. Nijhoff, 1986. p. 93-108.

FLEURY, J. J.; CASSOLI, P. D. Inseminação artificial em equino com baixa dose de sêmen congelado. In: ARQUIVOS DA FACULDADE DE VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 27., 1999, Porto Alegre. **Anais...** Campos do Jordão: SBTE, 1999. p. 223.

FREEMAN, K. P.; ROSZEL, J. F.; SLUSHER, S. H. Equine endometrial cytologic smear patterns. In: COMPENDIUM OF CONTINUING EDUCATION FOR THE PRACTITIONER VETERINARIAN, 8., 1986, Washington. **Proceedings...** Washington: NAL/USDA, 1986. p. 349.

GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. P. Capacitation induces cyclic adenosine 30,50-mono-phosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of amino-phospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, n. 1, p. 340-350, July 2002.

GAO, D.; CRITSER, J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**, Washington, v. 41, n. 4, p. 187-196, Apr. 2000.

GILMORE, J. A. et al. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 58, n. 1, p. 28-36, Jan. 1998.

GINTHER, O. J.; PIERSON, R. A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 21, n. 3, p. 505-515, Mar. 1984.

GLAZAR, A. I. et al. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, San Diego, v. 59, n. 2, p. 201-206, Oct. 2009.

GOMES, G. M. **Efeito da seleção espermática por gradiente de Percoll e inseminação artificial por endoscopia, sobre a fertilidade e reação inflamatória ao sêmen congelado de garanhões**. 2002. 71 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

GOMES, G. M. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 58, n. 6, p. 131-147, Feb. 2002.

GREEN, C. E.; WATSON, P. F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, n. 6, p. 889-898, May 2001.

GÜVENC, K.; REILAS, T.; KATILA, T. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 63, n. 9, p. 2504-2512, June 2005.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, San Diego, v. 29, n. 1, p. 26-38, Feb. 1992.

HINRICHS, K. et al. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 193, n. 1, p. 72-75, July 1988.

HOLT, W. V. Basics aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, London, v. 62, n. 1/3, p. 3-22, Aug. 2000a.

\_\_\_\_\_. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 53, n. 1, p. 47-58, Jan. 2000b.

IRVINE, D. S. et al. Duration of oestrus and time of ovulation in mares treated with synthetic Gn-RH (AY-24,031). **Journal of Reproduction and Fertility - Supplement**, Cambridge, v. 23, p. 279-283, 1975.

KAROW, A. M. **Cryobiology 2001 for mammalian embryologists**. Botucatu: UNESP, 2003. Disponível em: <<http://www.xytext.com.br>>. Acesso em: 10 mar. 2010.

KATILA, T. Sperm-uterine interactions: a review. **Animal Reproduction Science**, London, v. 68, n. 3/4, p. 267-272, Dec. 2001.

KATILA, T. et al. Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 48, n. 7, p. 1217-1227, July 1997.

KATILA, T.; SANKARI, S.; MÄKELÄ, O. Transport of spermatozoa in the genital tracts of mares. **Journal of Reproduction and Fertility - Supplement**, Cambridge, v. 56, n. 3, p. 571-578, Mar. 2000.

KEITH, S. L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. 1998. 104 f. Thesis (Ph.D. in Animal Science) - Colorado State University, Fort Collins, 1998.

KENNEY, R. M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 172, n. 3, p. 241-262, 1978.

KNUDSEN, O. Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 54, p. 415-422, 1964.

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperminduced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 41, n. 3, p. 629-636, Feb. 1994.

KUNDU, C. N.; DAS, K.; MAJUNDER, G. C. Effect of amino acids on goat epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. **Cryobiology**, San Diego, v. 41, n. 1, p. 21-27, Feb. 2001.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **Journal of Membrane Biology**, New York, v. 165, n. 1, p. 1-10, 1998.

LEEuw, F. E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, San Diego, v. 27, n. 2, p. 171-183, Apr. 1990.

LINDSEY, A. C.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. **Animal Reproduction Science**, London, v. 68, n. 3/4, p. 279-289, Dec. 2001.

LOOMIS, P. R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS ANNUAL CONVENTION, 38., 1992, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore: Culturemob, 1992. p. 629-647.

MANNING, S. T. et al. Development of hysteroscopic insemination of the uterine tube in the mare. In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 44., 1998, Lexington. **Proceedings...** Lexington: AAEP, 1998. p. 70-71.

MATTOS, R. C. et al. Bakteriologische und zytologische untersuchungen von uterusabstrichen beim Pferd. **Der Praktische Tierarzt**, Vienna, v. 65, n. 10, p. 809-814, May 1984.

MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophysics**, New York, v. 17, n. 1, p. 53-92, Aug. 1990.

MCKINNON, A. O. et al. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 192, n. 3, p. 350-353, Feb. 1988.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. The estrous cycles. In: MCKINNON, A. O. (Ed.). **Equine reproduction**. Malvern: Lea & Febizer, 1993. p. 114-189.

MEDEIROS, A. S. L. **Criopreservação de espermatozoides de garanhões utilizando diferentes amidas**. 2003. 123 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

MEDEIROS, A. S. L. et al. Utilização do extrato de pituitária equina como agente indutor da ovulação em éguas. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 19., 2005, Angra dos Reis. **Anais...** Angra dos Reis: SBTB, 2005. p. 195.

MEINERT, C. et al. Advancing the time of ovulation in the mare with a short-term implant releasing the GnRH analogue deslorelin. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 25, n. 1, p. 65-68, Jan. 1993.

MELO, C. M. **Efeito do armazenamento por 24 horas em diferentes sistemas de refrigeração sobre a viabilidade e fertilidade de sêmen congelado equino**. 2005. 104 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

MELO, C. M. et al. Efeito da Deslorelina e do extrato de pituitária equina na indução da ovulação em éguas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 193-194, mar. 2005.

METCALF, E. L. The effect of post-insemination endometritis on fertility of frozen stallion semen. In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 46., 2000, Oregon. **Proceedings...** Oregon: Sherwood, 2000. p. 332-400.

MEYERS, S. A. Spermatozoa response to osmotic stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 57-64, Oct. 2005.

MILLAR, R. Observations of the bacterial flora of the vulvo-vaginal tract of mares. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 28, p. 171-173, 1952.

MILLAR, R.; FRANCIS, J. The relation of clinical and bacteriological findings to fertility in thoroughbred mares. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 50, p. 351-355, 1974.

MINELLI, A. et al. Occurrence of prostasome-like membrane vesicles in equine seminal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 2, n. 114, p. 237-243, 1998.

MOFFET, P. D. et al. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. In: SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY ANNUAL CONFERENCE, 10., 2003, New York. **Proceedings...** New York: Academic, 2003. p. 42.

MUMFORD, E. L. et al. Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 129-140, July 1995.

NEILD, D. M. et al. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 59, n. 8, p. 1693-1705, Apr. 2003.

OLIVEIRA, C. H. et al. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 2/4, p. 194-200, Apr. 2010.

PALMER, E.; QUELLIER, P. Uses of LHRH and analogues in the mare. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION ARTIFICIAL INSEMINATION, 5., 1988, Dublin. **Proceedings...** Dublin: Lea & Febiger, 1988. p. 339-346.

PARKER, W. G.; SULLIVAN, J. J.; FIRST, N. L. Sperm transport and distribution in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility - Supplement**, Cambridge, v. 23, p. 63-66, 1975.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 38, n. 2, p. 209-222, Aug. 1992.

PASQUINE, D. F. et al. Parâmetros espermáticos pós-descongelção entre três dos diluidores mais utilizados no mundo para sêmen equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. 1005-1114, jul. 2007.

PICKETT, B. W. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 38., 1992, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore: Culturemob, 1992. p. 649-660.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 769-789.

PICKETT, B. W.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. Stallion sperm and seminal plasma phospholipids and glycerylphosphorylcholine. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 207-213, Nov. 1986.

PICKETT, B. W. et al. **Collection, preparation and insemination of stallion semen**. Fort Collins: Colorado State University, 2000. 245 p. (Animal Reproduction Laboratory Bulletin, 10).

\_\_\_\_\_. The effect of extenders, spermatozoal numbers and rectal palpation on equine fertility. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 5., 1974, Chicago. **Proceedings...** Chicago: National Association of Animal Breeders, 1974. p. 47-58.

POMMER, A. C.; RUTLANT, J.; MEYERS, S. A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 58, n. 7, p. 1373-1384, Oct. 2002.

REISWIG, J. D.; THRELFALL, W. R.; ROSOL, T. J. A comparison of endometrial biopsy, culture and cytology during oestrus and dioestrus in the horse. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 25, n. 3, p. 240-241, Aug. 1993.

RICKETTS, S. W.; WINGFIELD-DIGBY, N. J. Endometrial cytology. **Journal of Reproduction and Fertility - Supplement**, Cambridge, v. 32, n. 2, p. 638-639, 1982.

RIGBY, S. L. et al. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. In: AMERICAN ASSOCIATION ON EQUINE PRACTICE, 46., 2000, San Antonio. **Proceedings...** San Antonio: Texas A&M University, 2000. p. 332-334.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1/3, p. 77-111, Aug. 2000.

SALZMAN, A. A. The injection of sperm into the horns of the uterus in the artificial insemination of mares. **Zivotnovodni Nauki**, Sofija, v. 5, p. 164-165, 1937.

SAMPER, J. C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 219-228, Dec. 2001.

SCHWEISGUTH, D. C.; HAMMERSTEDT, R. H. Evaluation of plasma membrane stability by detergent-induced rupture of osmotically swollen sperm. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 24, n. 1/2, p. 81-94, Mar. 1992.

SCOTT, M. A. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60/61, n. 1, p. 337-348, July 2000.

SCOTT, M. A. et al. The structural morphology and epithelial association of spermatozoa at the uterotubal junction: a descriptive study of equine spermatozoa *in situ* using scanning electron microscopy. **Journal of Reproduction and Fertility - Supplement**, Cambridge, v. 56, n. 3, p. 415-421, 2000.

SIEME, H. et al. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 60, n. 6, p. 1153-1164, Oct. 2003.

SIMPSON, R. B.; BURNS, S. J.; SNELL, J. R. Microflora in stallion semen and their control with a semen extender. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 21., 1975, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore: Culturemob, 1975. p. 255-261.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science, New Series**, New York, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.

SQUIRES, E. L. Low dose insemination. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON STALLION REPRODUCTION, 3., 2001, Fort Collins. **Proceedings...** Fort Collins: Stallion Reproduction, 2001. p. 28.

SQUIRES, E. L. et al. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999. 185 p.

\_\_\_\_\_. Effect of dose of GnRH analog on ovulation in mares. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 41, n. 3, p. 757-769, Feb. 1994.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE. **Procedures guide for computers**. Cary, 1998. 956 p.

THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A.; BALL, B. A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 65, n. 8, p. 1531-1550, May 2006.

TISCHNER, M.; KOSINIAK, K.; BIELANSKI, W. Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 41, p. 329-335, 1974.

TROEDSSON, M. H. T. Mechanism of sperminduced endometritis in the mare. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 52, n. 1, p. 91-92, 1995. Supplement.

\_\_\_\_\_. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 52, n. 3, p. 461-471, Mar. 1999.

TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M.; CRABO, B. G. Sperm transport and survival in the mare: a review. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 50, n. 5, p. 807-818, Oct. 1998.

TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M.; THURMOND, M. Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: phagocytosis and chemotaxis. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 49, n. 3, p. 507-514, Sept. 1993.

VANDERWALL, D. K. The challenges of using frozen semen in horse breeding. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1., 1997, Ottawa. **Proceedings...** Ottawa: Society for Theriogenology, 1997. p. 178-179.

VANDERWALL, D. K.; JUERGENS, T. D.; WOODS, G. L. Reproductive performance of commercial broodmares after induction of ovulation with hCG or Ovuplant™ deslorelin. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 21, n. 11, p. 539-542, Nov. 2001.

VAZQUEZ, J. J. et al. Nonsurgical uterotubal insemination in the mare. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 44., 1998, Georgia. **Proceedings...** Georgia: Culturemob, 1998. p. 68-69.

VITA, B. de. **Estudo de diferentes sistemas e curvas de congelamento na eficiência da congelabilidade e fertilidade de sêmen eqüino.** 2008. 110 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

WATSON, E. D. et al. Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 56, n. 1, p. 123-131, Jan. 2001.

WATSON, E. D.; STROKES, C. R.; BOURNE, F. J. The influence of administration of ovarian steroids on the function of neutrophils isolated from the blood and uterus of ovariectomized mares. **Journal of Endocrinology**, Oslo, v. 112, n. 3, p. 443-448, Mar. 1987.

WATSON, P. F. Causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60/61, n. 1, p. 481-492, July 2000.

\_\_\_\_\_. Preservation of semen in mammals. In: FINN, C. A. (Ed.). **Oxford reviews of reproductive biology.** Oxford: Oxford University, 1979. v. 1, p. 283-330.

\_\_\_\_\_. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 7, n. 4, p. 871-891, July 1995.

WESSEL, M. T.; BALL, B. A. Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 84, n. 1/2, p. 147-156, Aug. 2004.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solutewater systems: review. **Cryobiology**, San Diego, v. 39, n. 2, p. 103-129, Sept. 1999.

WOODS, G. L.; GINTHER, O. J. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 20, n. 3, p. 347-375, Sept. 1983.

YANAGUIMACHI, R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. New York: Raven, 1994. p. 189-317.

ZAHN, F. S. **Efeito da incorporação de colesterol na membrana plasmática de espermatozoides sobre os parâmetros espermáticos e índice de fertilidade do sêmen congelado na espécie equina**. 2001. 109 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

ZAHN, F. S.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 58, n. 6, p. 237-240, Apr. 2002.

ZENT, W. W.; TROEDSSON, M. H. T.; XUE, J. L. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: a field study. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 44, n. 1, p. 78-79, 1998.

ZIMMERMANN, M. F. **Efeito da diluição do crioprotetor dimetilformamida em amostras de sêmen equino descongeladas utilizando-se dois diferentes diluentes comerciais**. 2007. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

ZIMMERMANN, M. F. et al. Sobrevida das células espermáticas equinas criopreservadas após descongelação e diluição utilizando-se dois diluentes comerciais. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 1, p. 238-245, jan./mar. 2009.

ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. 1998. 121 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.