

Thatiane Kievitsbosch

Refrigeração de Sêmen de Garanhões

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário

Preceptor: Prof. Marco Antônio Alvarenga

Botucatu
2011

Thatiane Kievitsbosch

Refrigeração de Sêmen de Garanhões

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário

Área de Concentração: Reprodução

Preceptor: Prof. Marco Antônio Alvarenga

Coordenador de Estágios: Prof^a Titular Jane Megid

Botucatu
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Kievitsbosch, Thatiane.
Refrigeração de sêmen de garanhões / Thatiane Kievitsbosch. – Botucatu :
[s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado – Medicina Veterinária) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia.
Orientador: Marco Antônio Alvarenga
Capes: 50500007

1. Sêmen. 2. Refrigeração. 3. Cavalo – Reprodução.

Palavras-chave: Garanhão; Refrigeração; Sêmen.

KIEVITSBOSCH, THATIANE. *Refrigeração de sêmen de garanhões*. Botucatu, 2011. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Reprodução) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Uma vez que o uso rotineiro de sêmen congelado de garanhões apresenta algumas limitações que impedem seu uso em larga escala, faz-se necessário o uso do sêmen refrigerado. O sêmen refrigerado equino é normalmente utilizado para possibilitar que um material genético de alta qualidade seja disseminado a longa distância. Ao atingir a temperatura de refrigeração, a atividade metabólica dos espermatozoides diminui, bem como a formação de radicais livres. Estes, por sua vez, causam danos irreversíveis às células espermáticas e, portanto, a sua menor formação é muito vantajosa. No entanto, ao manusearmos o sêmen utilizando técnicas de conservação como a refrigeração, é necessário estarmos conscientes sobre as características e fragilidades dos espermatozoides, visto que, se realizada de maneira errônea, esta técnica pode prejudicar a função dos mesmos, bem como o tempo de capacitação espermática e reação acrossômica. É necessário que a taxa de refrigeração seja lenta e que o tempo e a temperatura de armazenamento do sêmen obedeçam os intervalos já estabelecidos. Além disso, deve-se fazer uso de diluentes e obter uma diluição ideal do ejaculado, para que seu uso possa ser otimizado. É importante enfatizar, também, que, para a obtenção de bons índices de fertilidade, o sêmen, depois de processado (colhido e diluído ao meio de manutenção do sêmen) deve ser acondicionado em recipientes especialmente desenvolvidos para este fim e aplicados no útero em um prazo de até 24 horas de refrigeração.

Palavras-chave: sêmen, refrigeração, garanhão

KIEVITSBOSCH, THATIANE. *Refrigeration of stallion semen*. Botucatu, 2011. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Reprodução) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Because the routine use of frozen semen has some limitation that don't permit its use in a large-scale, it is necessary to use the cooled semen. The equine cooled semen is normally used to enable that a genetic material with high quality be spread over long distances. When it reaches the temperature of refrigeration, the sperm metabolic activity decreases and the free radicals formation minimize. These ones cause irreversible damages to the sperm cells and, so, its lower formation is very advantageous. However, when we manipulate the semen using conservation techniques, like refrigeration, it is necessary to be aware about the sperm characteristics and fragilities, because, if performed erroneously, this technique can be harmful to the sperm function as well as to the time of sperm capacitation and acrosome reaction. It is necessary that cooling rate is slow and that the time and the storage temperature of the sperm obey the ranges that are already established. Moreover, we should make use of diluents and obtain the ideal sperm dilution, so that its use can be optimized. It's also important to emphasize that to obtain good fertility rates, the semen, after processed (collected and diluted) must be conditioned in recipients specially developed for this purpose.

Keywords: semen, refrigeration, stallion

SUMÁRIO

Resumo -----	3
Abstract -----	4
1 INTRODUÇÃO -----	6
2 REVISÃO DE LITERATURA -----	7
3 CONCLUSÃO -----	15
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	17

1 INTRODUÇÃO

Diante à posição de destaque que o Brasil ocupa na equideocultura internacional, tornou-se necessário a incorporação de novas biotecnologias com o objetivo de acelerar e facilitar o melhoramento genético.

Existem fatores limitantes ao uso do sêmen fresco, como a grande extensão territorial brasileira. Além disso, o alto metabolismo espermático à temperatura ambiente impede a utilização do sêmen fresco horas após a sua colheita. A refrigeração de sêmen é uma interessante alternativa para superar estas limitações.

O tempo de utilização do sêmen refrigerado é superior ao do sêmen fresco, pois a baixas temperaturas o metabolismo celular é mais baixo. A atividade metabólica leva à formação de radicais livres (RL) que prejudicam os espermatozóides. Estudos demonstraram que a cada 10 °C reduzidos na temperatura das células, o metabolismo celular é reduzido em 50%. No entanto, a refrigeração apenas reduz o metabolismo celular, mas não o cessa completamente. Logo, as 24 horas permitidas ao armazenamento do material estão intimamente relacionadas à quantidade de metabólitos presentes no diluente. Ultrapassado o tempo máximo, essa quantidade é alta o suficiente para reduzir, em muito, a fertilidade e a motilidade dos espermatozóides, tornando o material inviável para o uso (Alvarenga et al.,2007).

Por mais que a refrigeração de sêmen seja benéfica aos espermatozóides, esta técnica deve ser realizada de forma correta e cuidadosa, caso contrário, seu uso se torna prejudicial às células espermáticas.

Aurich (2005) define como conseqüências da queda de temperatura em taxas superiores àquelas indicadas para a espécie, as alterações caracterizadas por um modelo anormal de movimento e rápida queda da motilidade espermática, lesões nas membranas, redução do metabolismo, perda de enzimas e de outros componentes intracelulares. No entanto, parece haver consenso entre os pesquisadores sobre a necessidade de se utilizar uma taxa de refrigeração lenta, não superior à -0,05°C/min, entre 19 e 8°C, visto que esta é a fase crítica de

ocorrência das lesões nas membranas espermáticas (Kayser et al., 1992; Moran et al., 1992; Stryer, 1992; Amann e Graham, 1993; Squires et al., 1999).

Resultados de pesquisas cuja finalidade é verificar a temperatura ideal de estocagem para o sêmen equino, mostraram que há controvérsias. Alguns autores mostraram que a preservação entre 15 e 20°C é mais eficaz na manutenção das características seminais e fertilidade, enquanto outros confirmaram que a estocagem a 4 e 5°C é superior. No Brasil, a refrigeração entre 15°C e 20°C é a mais utilizada rotineiramente por apresentar menor custo e por não se fazer necessário o uso de containers com controle da queda de temperatura (Alvarenga et al., 2007).

Além da curva de refrigeração e temperatura de armazenamento ideal, o uso de diluentes na refrigeração de sêmen, também apresenta extrema importância, já que são capazes de estabilizar as membranas espermáticas durante a fase de transição, momento no qual ocorrem as maiores lesões celulares. Para minimizar os danos causados pelo choque térmico, uma variedade de substâncias pode ser adicionada ao meio diluidor (Kenney et al., 1975).

A dose inseminante é outro fator que deve-se dar importância quando fala-se em refrigeração de sêmen. Atualmente, no Brasil, preconiza-se uma concentração de 800×10^6 a 1×10^9 de espermatozoides móveis.

E para finalizar, é importante enfatizar que, para a obtenção de bons índices de fertilidade, o sêmen, depois de processado (colhido e diluído ao meio de manutenção do sêmen) deve ser acondicionado em recipientes especialmente desenvolvidos para este fim. No Brasil já existem sistemas eficientes para transporte de sêmen equino, entre eles, o transporte à 15°C (Botu-Box, Max-Sêmen), um outro para transporte à 5°C (Botutainer) e, recentemente foi desenvolvido o transporte tanto à 5°C quanto à 15°C (Botuflex) (Carmo & Almeida, 2011).

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é hoje um país de referência no estudo e na utilização de biotécnicas aplicadas à reprodução equina, como a Inseminação Artificial (IA). Esta técnica tem sido utilizada, principalmente, para aumentar o número de produtos obtidos de um determinado garanhão, bem como para superar os problemas relacionados à extensão geográfica do país e riscos físicos e sanitários do transporte de éguas, ou seja, tem sido bastante útil para vencer as dificuldades do uso rotineiro do sêmen, deixando-o mais competitivo (Alvarenga et al., 2007).

A IA com sêmen congelado ainda tem questões técnicas a serem solucionadas, como a variação individual frente à criopreservação, o baixo rendimento de doses por ejaculado, o intenso manejo das éguas durante as inseminações, maior custo por prenhez, além da grande oscilação das taxas de prenhez em relação às obtidas com Monta Natural (MN) ou IA com sêmen a fresco ou refrigerado (Ball, 1998a; Backman et al., 2004). Dessa forma, a IA com sêmen refrigerado vem sendo amplamente utilizada nas últimas décadas, visto que os resultados obtidos com o seu uso têm sido bastante satisfatórios. Jasko et al. (1992c) relatam que taxas de gestação obtidas com sêmen refrigerado por 24 horas são semelhantes às obtidas com sêmen a fresco. Douglas-Hamilton et al. (1984), utilizando sêmen equino refrigerado a 4 °C por 6 a 23 horas, inseminaram 46 éguas de diferentes categorias reprodutivas, em dias alternados, até a detecção da ovulação, registrando taxa final de gestação de 91%.

Ao manusearmos o sêmen utilizando técnicas de conservação como a refrigeração, é necessário estarmos conscientes sobre as características e fragilidades dos espermatozoides, visto que, se realizada de maneira errônea, esta técnica podem prejudicar a função dos mesmos, bem como o tempo de capacitação espermática e reação acrossômica. (Squires et al., 1999).

Espermatozoides são células especializadas com a função peculiar de fertilizar óvulos. Apresentam mecanismos eficientes de movimentação, entretanto possuem capacidade limitada de biossíntese e reparação de danos (Squires et al., 1999). Embora um espermatozoide contenha somente os componentes essenciais

para realizar a fertilização, trata-se de uma célula bastante complexa. Para fertilizar um óvulo é necessário que a célula espermática apresente:

- A) processos metabólicos para produção de energia;
- B) motilidade progressiva;
- C) proteínas necessárias para sua sobrevivência no trato reprodutivo feminino;
- D) enzimas (no acrossomo) essenciais para penetração no óvulo e
- E) distribuição adequada de proteínas e lipídeos na membrana plasmática que permita a reação acrossomal em período de tempo ideal para a fusão com o óvulo.

Para desenvolver essas funções, o espermatozóide é compartimentalizado em cabeça (acrossomo), pescoço, porção intermediária, porção principal e cauda. A membrana plasmática de cada um destes compartimentos é composta de proteínas e lipídeos distintos, o que lhes confere diferentes propriedades físicas (Squires et al., 1999).

Parece haver consenso entre os pesquisadores sobre a necessidade de se utilizar uma taxa de refrigeração lenta, não superior à $-0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$, entre 19 e 8°C , pois esta é a fase crítica de ocorrência das lesões nas membranas espermáticas, já que nesta faixa de temperatura, os lipídeos da membrana estão passando pela fase de transição, indo do estado fluido para o gel (Kayser et al., 1992; Moran et al., 1992; Stryer, 1992; Amann e Graham, 1993; Squires et al., 1999).

Aurich (2005) define como conseqüências da queda de temperatura em taxas superiores àquelas indicadas para a espécie, as alterações caracterizadas por um modelo anormal de movimento e rápida queda da motilidade espermática, lesões nas membranas, redução do metabolismo, perda de enzimas e de outros componentes intracelulares.

Sabe-se que à temperatura corpórea e ambiente o metabolismo espermático é máximo e resulta na formação de ácido láctico e dióxido de carbono. Estes produtos metabólicos aumentam a acidez do sêmen e estimulam a peroxidação

dos lipídeos da membrana, causando danos permanentes à célula (Squires et al.; 1997).

As células espermáticas são sensíveis a lesões peroxidativas devido à grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados em sua membrana. Estas lesões induzem a geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS), grandes responsáveis por danos na viabilidade e fertilidade de espermatozóides (Alvarez e Moraes, 2006). Os ácidos graxos insaturados são essenciais para propiciar à membrana plasmática dos espermatozóides a fluidez necessária no evento de fusão com o ovócito e conseguinte fertilização. Quando ROS atacam as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, inicia-se uma reação em cadeia de peroxidação lipídica que, caso não seja interrompida, conduzirá a perda da função espermática (Aitken e Krausz, 2001). Os efeitos da reação peroxidativa incluem perda de motilidade, de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fertilizante do espermatozóide (White, 1993).

A fim de minimizar os danos celulares decorrentes do alto metabolismo que o sêmen fresco apresenta, a refrigeração passou a adquirir extrema importância na utilização de técnicas da reprodução. Estudos demonstraram que a cada 10 °C reduzidos na temperatura das células, o metabolismo celular é reduzido em 50%. Conseqüentemente, espermatozóides armazenados à 5°C não produzem a grande quantidade de produtos metabólicos que produziam à temperatura corpórea e ambiente e assim, a peroxidação de lipídeos da membrana ocorre de forma mais lenta, prolongando a longevidade das células (Squires et al., 1999).

Por mais que a técnica de refrigeração de sêmen consiga reduzir o metabolismo celular e, portanto, a produção de radicais livres, estes continuam presentes e trazendo prejuízos às células espermáticas. As 24 horas permitidas ao armazenamento do material estão intimamente relacionadas à quantidade de metabólitos presentes no diluente. Ultrapassado o tempo máximo, essa quantidade é alta o suficiente para reduzir em muito a fertilidade e a motilidade dos espermatozóides, tornando o material inviável para o uso (Alvarenga et al., 2007).

Com relação ao tempo e à temperatura de armazenamento e seus efeitos sobre características distintas do ejaculado, estudos concluíram que o sêmen armazenado à temperaturas de 20°C e 15°C por 36h apresentou valores de motilidade superiores quando comparados ao armazenamento à 10°C e 5°C (Province et. al., 1985). Este resultado contrasta com diversos experimentos realizados posteriormente que demonstraram que a estocagem entre 4°C e 5°C por 24h levou à uma melhor motilidade espermática, quando comparada à temperatura de estocagem de 20°C e 0°C ou 2°C (Varner et al., 1988; Moran et al., 1992).

Desta forma, verifica-se que há controvérsias entre os resultados de pesquisas cuja finalidade é verificar a temperatura ideal de estocagem para o sêmen equino diluído. Alguns autores mostraram que a preservação entre 15 e 20°C é mais eficaz na manutenção das características seminais e fertilidade, enquanto outros confirmaram que a estocagem a 4 e 5°C é superior. Entretanto, a refrigeração entre 15°C e 20°C é a mais utilizada rotineiramente no Brasil por apresentar menor custo e por não se fazer necessário o uso de containers com controle da queda de temperatura (Alvarenga et al., 2007).

Além da curva de refrigeração e temperatura de armazenamento ideal, o uso de diluentes na refrigeração de sêmen, também apresenta extrema importância. Uma característica importante dos diluidores utilizados na preservação do sêmen refrigerado é sua capacidade de estabilizar as membranas espermáticas durante a fase de transição, momento no qual ocorrem as maiores lesões celulares. Assim, para minimizar os danos causados pelo choque térmico, uma variedade de substâncias pode ser adicionada ao meio diluidor (Kenney et al., 1975).

A maioria dos meios diluentes tem por base de sua composição, leite desnatado, glicose, gema de ovo e antibióticos. A ação protetora da gema de ovo se deve às lipoproteínas de baixa densidade (Amann e Graham, 1993), que permanecem firmemente ligadas aos espermatozóides, em especial a lipoproteína 3 (Foulkes, 1977). Além disso, a gema de ovo estabiliza a membrana espermática pela neutralização dos componentes deletérios existentes no plasma seminal (Aurich, 2005).

Embora não se conheça o exato mecanismo de proteção do leite contra o choque térmico, provavelmente as proteínas do leite agem de modo similar às lipoproteínas da gema de ovo, ou seja, estabilizando as membranas (Amann e Graham, 1993). Batellier et al. (2001) relatam que a proteção conferida pelos componentes do leite estaria relacionada aos seus efeitos antioxidantes.

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

De acordo com alguns autores (BATELLIER et al., 1997; MAGISTRINI et al., 1992; BATELLIER et al., 2001), a utilização de diluentes contendo leite é mais adequada quando as amostras de sêmen equino são armazenadas em torno de 4°C. Já na refrigeração a 15°C, as amostras de sêmen são favorecidas quando se utiliza um diluente sem leite (MAGISTRINI et al., 1992; BATELLIER et al., 2001). No entanto, no estudo realizado por Farrás et al (2008), onde foram comparados diluentes à base de leite desnatado (Botu-Semen® e Botu-Turbo®) e outro contendo apenas frações purificadas do leite (INRA 96®), observou-se que todos os diluentes podem ser utilizados sem prejuízos para a motilidade e viabilidade espermáticas, tanto a temperaturas em torno de 5°C como de 15°C.

Bruemmert et al. (2002) e Squires et al. (1999) descreveram que a adição de antioxidantes aos diluentes pode ser benéfica para a preservação da motilidade e da integridade da membrana espermática. Entretanto, Ball et al. (2001) não relataram efeito benéfico de diferentes substâncias antioxidantes sobre a preservação da motilidade durante 72 horas de estocagem.

Goulart et al. (2004), tentando minimizar os efeitos provocados pelo estresse térmico causado pela refrigeração do sêmen equino, adicionaram a pentoxifilina ao ejaculado diluído e refrigerado a 5°C, *in vitro*. Esta substância, por sua vez, melhorou a maioria dos parâmetros espermáticos relacionados à motilidade, provavelmente, devido ao aumento da concentração intracelular de

nucleotídeos cíclicos, em especial da adenina monofosfato cíclica (AMPc) e da guanosina monofosfato cíclica (GMPc).

A utilização de antibióticos nos meios diluentes, se dá a fim de minimizar o crescimento bacteriano durante o armazenamento do sêmen até o momento da inseminação (Darenius, 1998). A superfície do pênis e do prepúcio do garanhão é habitada por uma grande variedade de bactérias comensais e por algumas espécies patogênicas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Taylorella equigenitalis*) que podem promover endometrites na fêmea equina e redução na qualidade seminal, ocasionando subfertilidade dos garanhões (Pickett et al., 1999). Vários agentes antimicrobianos têm sido utilizados no sêmen equino: amicacina, amoxicilina, ampicilina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, ácido nalidíxico, polimixina B, estreptomina, ticarcilina, penicilina G e ceftiofur. Back et al. (1975) utilizaram um ejaculado de sete garanhões para avaliar o efeito de oito antibióticos (eritromicina, sulfato de gentamicina, ácido nalidíxico, sulfato de kanamicina, lincomicina, penicilina G sódica, polimixina B e sulfato de estreptomina) sobre a motilidade progressiva espermática. Este autores verificaram que o sulfato de estreptomina teve efeito deletério no sêmen fresco quando adicionado em altas concentrações (1.500, 2.000 e 2.500 µg/mL), ao passo que os demais tiveram efeito semelhante na manutenção da motilidade, tanto no sêmen fresco como no resfriado.

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

Varner et al. (1998), avaliando o sêmen de garanhões diluído com antibióticos e resfriado no Equitainer® por 12 e 24 horas a 5°C por meio de cultura bacteriana e da motilidade espermática progressiva, verificaram superioridade da amicacina e gentamicina G potássica em relação aos demais (penicilina G sódica, tircacilina dissódica, sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina, sulfato de estreptomina e polimixina B).

A utilização de amicacina (1.000UI/mL) ou penicilina G potássica (1.000UI/mL), ou de ambas, para o controle do crescimento bacteriano no sêmen equino resfriado foi recomendada por Pickett et al. (1999).

Outro fator que deve-se dar importância quando fala-se em refrigeração de sêmen, é a diluição do ejaculado, ou seja, a concentração de espermatozóides existentes por mL. A fim de se determinar a concentração espermática a ser utilizada na inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado, vários estudos foram realizados, desde a década de 70. Preconiza-se uma dose de inseminante de 500×10^6 espermatozóides móveis (Ball, 2005). Assim, um total de 1×10^9 de espermatozóides deve ser enviado para os haras, o que normalmente garante uma inseminação com 500×10^6 espermatozóides móveis após o transporte. Em alguns casos, principalmente quando se trabalha com ejaculados que apresentam grandes volumes de plasma seminal, a centrifugação é necessária a fim de se concentrar o sêmen antes da diluição (Ball, 1998b). Analisando-se os efeitos da centrifugação e da remoção parcial do plasma seminal sobre o sêmen refrigerado de equinos, Brinsko et.al. (2000) chegaram à conclusão de que a remoção do plasma seminal é benéfica para garanhões cujo ejaculado apresenta baixa tolerância à refrigeração e ao armazenamento acima de 24h.

Como regra geral deve-se respeitar as taxas de diluição, com faixa de valor ideal de diluição de 25 milhões de espermatozoides/mL. Varner et al. (1987) demonstraram que esta diluição foi superior a de 50 milhões ou 100 milhões de espermatozoides, para sêmen refrigerado a 5°C, e estocado por 24 horas. Contudo, a diluição pode ser de 50 milhões ou 100 milhões de espermatozoide/ml, e pode ser utilizada quando boa parte do plasma seminal for removido por centrifugação e quando o sêmen for estocado nas mesmas condições anteriores (Jasko et al., 1992a).

Mais pesquisas têm sido realizadas para avaliar a eficiência da utilização de técnicas de IA com baixa concentração espermática (Sieme et al., 2004; Ball, 2005; Güvenc et al., 2005; Lyle e Ferrer, 2005). Esta baixa concentração na dose inseminante tem como principal objetivo maximizar o uso de um ejaculado, inseminando um maior número de éguas (Carvalho et al; 1998 e Brandão et al.;

2003. Varner (2003) afirma que a concentração espermática utilizada na inseminação artificial com sêmen refrigerado pode ser reduzida em até 100 vezes caso o sêmen seja depositado perto da junção úterotubária.

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

É importante enfatizar que, para a obtenção de bons índices de fertilidade, o sêmen, depois de processado (coletado e diluído ao meio de manutenção do sêmen) deve ser acondicionado em recipientes especialmente desenvolvidos para este fim (Carmo & Almeida, 2011). Silva Filho et al. (1994) relatam que estes recipientes devem apresentar completo isolamento térmico do meio exterior, fornecer uma taxa de resfriamento lenta, proporcionar a manutenção da temperatura pelo maior tempo possível após a estabilização e proteger o sêmen. Além disso, devem ser de estrutura forte, para permitir o uso de diferentes meios de transporte e serem simples, baratos, leves e de fácil manuseio.

No Brasil já existem sistemas eficientes para transporte de sêmen equino, entre eles, o transporte a 15°C (Botu-box, Max-Sêmen), um outro para transporte a 5°C (Botutainer) e, mais recentemente, foi desenvolvido o Botuflex, cujo transporte de sêmen se dá tanto à 5° quanto à 15°C. O sistema Botutainer segue a mesma curva de queda de temperatura do Equitainer (sistema americano) e se mostrou tão eficiente quanto a este na preservação da motilidade, bem como na proteção às variações de temperatura externa (Carmo & Almeida, 2011).

Além disso, considerando o período de sobrevivência dos gametas no trato reprodutivo feminino, Ball (1998b) recomenda que as inseminações sejam

realizadas 24 horas antes da ovulação, pois intervalos maiores poderão ocasionar redução nas taxas de fertilidade.

3 CONCLUSÃO

Desta forma, conclui-se que, se realizada de maneira correta, a refrigeração de sêmen equino é capaz de acelerar e facilitar o melhoramento genético. Uma vez que o Brasil encontra-se em posição de destaque na equideocultura mundial, o uso de novas biotecnologias da reprodução torna-se necessária e a refrigeração de sêmen é uma ótima alternativa para tal, visto que esta técnica proporciona um rápido transporte de material genético de alta qualidade a longas distancias. Além disso, sob a temperatura de refrigeração, a atividade metabólica dos espermatozóides diminui, bem como a formação de radicais livres, o que gera um menor dano às células espermáticas.

No entanto, é necessário enfatizar que, a refrigeração de sêmen equino deixa de ser benéfica e trazer vantagens, quando executada de forma errônea. É de extrema importância que esta técnica seja realizada obedecendo os padrões e os intervalos já citados, ou seja, que a taxa de refrigeração do sêmen seja lenta (não superior à $-0,05^{\circ}\text{C}$ entre 19 e 8°C), que a temperatura de armazenamento esteja entre 5 e 15°C , que o ejaculado seja diluído em um meio diluente eficiente na proteção das células espermáticas, que a concentração do ejaculado atinja, no máximo 50×10^6 espermatozóides viáveis por mL, que o sêmen refrigerado seja armazenado em recipientes especialmente desenvolvidos para tal, como o Botutainer, Botu-box e Max-sêmen e, por último, que a inseminação artificial seja realizada, no máximo, 24 horas antes da ovulação, obedecendo o limite de sobrevivência dos gametas no trato reprodutor feminino. Se estas exigências forem atendidas, a refrigeração de sêmen torna-se uma ferramenta de grande valor para facilitar a difusão de material genético de alta qualidade.

REFERÊNCIAS

1. AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, v. 122, p. 497-506, 2001.
2. ALVARENGA, M. A.; M. T. CARMO. Biotecnologia em reprodução equina: O que há de novo para o veterinário de campo. *Brazilian Journal of Equine Medicine*, p.26-30, 2007.
3. ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e da vitamina C sobre o sêmen. *Sabioss: Revista de Saúde e Biologia*, v. 1, p. 45-51, 2006.
4. AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K.. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger. p.715-745, 1993.
5. AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.65-75, 2005.
6. BACK, D. G.; PICKETT, B. W.; VOSS, J. L.; SEIDEL, G. E. Effect of antibacterial agents on the motility of stallion spermatozoa at various storage times, temperatures and dilution ratios. *Journal Animal Science*, v.41, p.137-143, 1975.
7. BACKAM, T.; BRUEMMER, J. E.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *Journal of Animal Science*, v.82, p.690-694, 2004.
8. BALL, B. A. An introduction to the use and application of cryopreserved equine semen. In: *Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, 1998, Davis. Proceedings...* Davis: [s.n.], p.25-41, 1998a.

9. BALL, B. A. Evaluation and use of transported equine semen. In: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, 1998, Davis. Proceedings...Davis:[s.n.], p.18-24, 1998b.
10. BALL, B. A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C. G.; BAUMBE, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology*, v.56, p.577-89, 2001.
11. BALL, B. A. Hysteroscopic and low-dose insemination techniques. In: Congresso Nazionale Multisala Sive, 11, 2005, Pisa. Proceedings... Pisa, 2005. 3p. Disponível em: <http://www.evsre.it/vet.journal/scheletrooutput_ricerca.php>. Acesso em 20 de setembro de 2005.
12. BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 48, 391-410, 1997.
13. BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J. M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.181-190, 2001.
14. BRANDÃO, F. Z.; SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; SATURNINO, H. M.; VIANA, W. S.; DANTAS, M. S.; OLIVEIRA, H. N. Efeito da concentração espermática e do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, p.61-67, 2003.
15. BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriongenology*, v. 54, p. 129-136, 2000.

16. BRUEMMERT, J. E.; COY, R. C.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. *Journal of Animal Science*, v.80, p.12-18, 2002.
17. CARMO, M. T.; ALMEIDA, M. T. Biotecnologias da reprodução aplicadas na criação de equinos. Associação Brasileira do Quarto de Milha (ABQM). Disponível em: <http://www.abqm.com.br/SecaoTecnica/biotecnologias_reproducao.html>. Acesso em: 08 de Agosto de 2011.
18. CARVALHO, G. R.; SILVA FILHO, J. M.; LIMA, M. C. C.; OLIVEIRA, H. N.; PALHARES, M. S. Efeito de diferentes concentrações espermáticas sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen equino diluído, resfriado a 20 °C e transportado. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.27, p.695-699, 1998.
19. DARENIUS, A. Experiences with chilled, transported equine semen. In: Stallion Reproduction Symposium, 1998. Proceedings... Montgomery, AL: Society for Theriogenology, American Association of Equine Practitioners, p.60-70, 1998.
20. DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, v.22, p.291-304, 1984.
21. FERREIRA, M. F. L. Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e fertilidade do sêmen de jumento. 1993. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, 1993.
22. FOULKES, J. A. The separation of lipoproteins from egg yolks and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction & Fertility*, v.49, p.277-284, 1977.
23. GOULART, H. M.; SILVA, A. E. D. F.; MCMANUS, C.; PAPA, F. O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos

espermatozoides de equinos, após o resfriamento a 5°C. Revista Brasileira de Zootecnia, v.33, p.112-122, 2004.

24. GÜVENC, K.; REILAS, T.; KATILA, T. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology*, v.63, p.2504-2512, 2005.
25. HOYUMPA, A. H.; MCLINTOSH, A. L.; VARNER, D. D.; SCANLAN, C. M. Normal bacterial flora of equine semen: Antibiotic effects of amikacin, penicilin, and an amikacina penicilin combination in a seminat extender. In: 12th International Congress of Animal Reproduction. Proceedings... v.3, p.1427-1429, 1992.
26. JASKO, D. J.; HATHAWAY, J. A.; SCHALTENBRAND, V. L.; SIMPER, W. D.; SQUIRES, E. L.. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.37, p.1241-1252, 1992a.
27. JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E. Comparison of pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen semen. In: International Congress Animal Reproduction, 12, 1992, The Hague. Proceedings... The Hague: ICAR, v.3, p.1439-1441, 1992c.
28. KAYSER, J. P.; AMANN, R. P.; SHIDELER, R. K. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.601-614, 1992.
29. KENNEY, R. M.; EVENSON, D. P.; GARCIA, M. C.; LOVE, C. C. Relationship between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and
30. seasonal pregnancy rate. *Biology of Reproduction Mono*, v.1, p.647-653, 1995.
31. LYLE, S. K.; FERRER, M. S. Low-dose insemination - Why, when and how. *Theriogenology*, v.64, p.572-579, 2005.
32. MAGISTRINI, M.; COUTY, I.; PALMER, E. Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh

stallion sperm survival. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 88 (Suppl.), p.97-110, 1992.

33. MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.999-1012, 1992.
34. PICKETT, B. W.; SHINER, K. A. Recent developments in artificial insemination in horses. *Livestock Production Science*, v.40, p.31-36, 1994.
35. PICKETT, B. W.; VOSS, J. L.; JONES, R. L. Control of bacteria in stallions and their semen. *Journal of equine veterinary science*, v.19, n.7, 1999.
36. PROVINCE, C. A.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 23, p. 925-934, 1985.
37. SIEME, H.; BONK, A.; HAMANN, H.; KLUG, E.; KATILA, T. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*, v.62, p.915-928, 2004.
38. SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M.S.; FONSECA, F. A. Transporte e inseminação artificial com sêmen de equino. *Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG*, n.11, p.3-112, 1994.
39. SQUIRES, E. L.; BARNES, C. K.; ROWLEY, H. S. Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. *Proc American Association of Equine Practitioners*, v.35, p.25-30, 1989.
40. SQUIRES, E. L.; BRUBAKER, J. K.; MCCUE, P. M.; PICKETT, B. W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares bred with cooler semen. *Theriogenology*. Accepted. 1997.
41. SQUIRES, E. L.; PICKETT, J. K.; GRAHAM, D. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Cooled and frozen stallion semen. In: *Animal Reproduction and Biotechnology*

laboratory. Colorado. College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences- Colorado States University, 1999.

42. STRYER, L. Introdução ao estudo das membranas biológicas. In: Stryer L. Bioquímica. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.230-256, 1992.
43. VARNER, D. D. et al. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v. 28, n. 5, p. 709-723, 1987.
44. VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriongenology*, v. 29, p. 1043-1054, 1988.
45. VARNER, D. D.; SCANLAN, C. M.; THOMPSON, J.A.; BMMBAUGH, G. W.; BLANCHARD, T. L.; CARLTON, C. M.; JOHNSON, L. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, v.50, p.559-573, 1998.
46. VARNER, D. D. Technical considerations for cool transported equine semen. In: Congresso Nazionale Multisala Sive, 9, 2003, Pisa. Proceedings... 7p. Disponível em: <http://www.evsre.it/vet.journal/scheletro_output_ricerca.php>. Acesso em: 20 de setembro de 2005.
47. WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 5, p. 639-658, 1993.