

COLHEITA E ANÁLISE SEMINAL DE EQUINO

BAUMHARDT, Juliana Belles^{1*}

D'AVILA, Leonardo Ritta¹

ROSSATO, Andressa Dutra Piovesan²

SIMÕES, Michele da Rosa Scholant²

TEIXEIRA, Bruno Borges Machado²

VAN DER LINDEN, Liana De Salles²

CORADINI, Márcia Goulart Lopes²

RESUMO: As biotecnologias da reprodução existem como uma importante ferramenta da equideocultura, como um caminho direto para o melhoramento genético. A avaliação seminal deve ser realizada com o objetivo de se determinar a qualidade do ejaculado do garanhão. Objetivou-se com este estudo coletar e analisar macroscopicamente e microscopicamente o sêmen de um equino da raça crioula. A metodologia empregada para colheita do sêmen foi utilizando uma vagina artificial, posteriormente foi realizada uma análise microscópica do sêmen para verificação da qualidade do mesmo. Conforme os resultados obtidos, o sêmen analisado apresentou-se abaixo do padrão esperado.

Palavras-chave: Biotecnologias, Reprodução equina, Vagina artificial.

ABSTRACT: Reproduction biotechnology exists as an important equideoculture tool, as a direct path of genetic improvement. The seminal evaluation should be performed with the purpose of determining the quality of the ejaculate of the stallion. The objective of this study was to collect and analyze macroscopically and microscopically the semen of an equine of the Creole breed. The method used to collect the semen was that of an artificial vagina, after which a microscopic analysis of the semen was performed to verify the quality of the semen. According to the results obtained, the semen analyzed was below the expected standard.

Keywords: Biotechnologies, Equine reproduction, Artificial vagina.

¹ Discentes do Curso Medicina Veterinária, Nível 4 2017/2- Faculdade IDEAU – Bagé/RS.

² Docentes do Curso Medicina Veterinária, Nível 4 2017/2 - Faculdade IDEAU – Bagé/RS.

*E-mail para contato: julianabellesb@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o rebanho efetivo de equinos é de aproximadamente 8,5 milhões. A produção equina mundial exerce importante papel como fonte geradora de empregos. A equideocultura no país é responsável pela geração de 600 mil empregos diretos e 3,2 milhões de empregos indiretos (CNA, 2006). A importância da reprodução na criação de equinos é porque não há equideocultura sem a mesma.

As funções reprodutivas do macho abrangem a formação de esperma e sua deposição na fêmea. Os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos e logo depois transportados para o epidídimo, onde são armazenados e maturados. A produção de espermatozoides é um processo contínuo. (REECE, 2006)

As biotecnologias da reprodução existem como uma importante ferramenta da equideocultura, como um caminho direto para o melhoramento genético.

A avaliação seminal deve ser realizada com o objetivo de se determinar a qualidade do ejaculado do garanhão. São avaliados parâmetros macroscópicos e microscópicos. Dentre os macroscópicos pode-se citar o volume e o aspecto e dentre os microscópicos citam-se a motilidade espermática, vigor e as patologias maiores e menores (LUCENA et.al 2014).

Tendo em vista as vantagens obtidas por quem utiliza este recurso de inseminação artificial, esta biotecnologia tem maior impacto na produção equina, pois apenas um ejaculado pode dar origem a muitos descendentes.

A inseminação artificial em equinos é altamente praticada em todo o mundo, e a maneira mais comum de ser usada é mediante o resfriamento seminal e posterior transporte. (LOOMIS, 2006).

O transporte de sêmen resfriado equino, não é realmente um fato atual, podendo até mesmo ter sido responsável pela primeira citação na literatura, onde a inseminação artificial nos animais domésticos, são relatados em textos árabes no ano de 1322, quando um chefe determinou que coletassem sêmen de um garanhão de uma tribo rival para realizar a inseminação de uma de suas éguas (DAVIES-MOREL, 1999).

No mundo, os países que mais realizam inseminação artificial com sêmen resfriado transportado são Estados Unidos e Brasil (PAPA et al., 2005).

A inseminação artificial pode ser realizada tendo diferentes formas de processamento do sêmen: in natura; diluído, diluído transportado; diluído resfriado transportado e congelado.

Porém cada um dos métodos de processamento tem suas vantagens, desvantagens e indicações (CARVALHO, 1992).

Independente da técnica utilizada, o sêmen deve ser colhido, avaliado e processado. Outros métodos para a colheita de sêmen de garanhões seria a utilização de um preservativo de látex especial, a colheita por manipulação do pênis com auxílio de compressas aquecidas e a manipulação medicamentosa, mas o método mais atualizado e atual é utilizando é a vagina artificial fechada. Em casos especiais utiliza-se a vagina artificial aberta, que tem como finalidade a colheita de sêmen fracionada. (TRISCHNER, 1979; BOCHIO 2006).

Objetivou-se com esse projeto coletar e analisar macroscopicamente e microscopicamente o sêmen de um equino da raça crioula, sendo os parâmetros analisados, cor, densidade, vigor espermático, motilidade total, motilidade progressiva, número de espermatozoides por ml, número total de espermatozoides, integridade da membrana citoplasmática e patologia espermática.

2 DESENVOLVIMENTO

Nesta parte do trabalho, será detalhado o referencial teórico, a metodologia empregada e os resultados encontrados. Contém a exposição ordenada e pormenorizada do assunto tratado do estudo.

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Desde o início do século, cientistas têm buscado desenvolver métodos laboratoriais para aprimorar a qualidade e do sêmen. Porém, estes objetivos ainda não foram alcançados, uma vez que a maior parte dos problemas estão nos diferentes atributos que o espermatozóide deve possuir para fertilizar o ovócito, e em como a fertilização é definida. No entanto, nenhum teste isolado é capaz de prever a qualidade de uma amostra de sêmen, mas o exame de várias características pode determinar uma maior fertilidade potencial (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2004, 2005, 2006a, b).

A utilização da técnica de manequim para realizar a colheita é a forma mais segura para o garanhão, para a égua e para o médico veterinário, ela consiste em o garanhão subir no manequim ao invés de subir na égua (BOCHIO, 2006).

A vagina artificial que é um instrumento que simula as condições anatômicas normais da vagina de uma égua, para a colheita de sêmen dos garanhões, havendo diversos modelos,

sendo ela composta por um tubo rígido com válvula, mucosa de borracha, cone flexível e tubo de colheita, recoberto por capa de térmica. A temperatura interna da vagina artificial deve estar entre 39 e 42°C (BOCHIO, 2006; FREITAS, 2017).

Existem vários tipos de vaginas artificiais fechadas como: Hanover, Colorado, Botucatu, Nishikawa ou Japonesa, Missouri, entre outros, sendo que as mais utilizadas em todo território nacional são o modelo alemão (Hanover), seguido pelo modelo brasileiro Botucatu (SAMPER, 2007).

Segundo o autor citado a cima, outra modalidade de colheita, utilizada em casos de o garanhão apresentar incapacidade de monta ou disfunção comportamental, utiliza-se a combinação de dois fármacos, iminaprina e xilazina para a obtenção do ejaculado, obtendo-se sucesso razoável de 30 a 50%.

Após a colheita é importante que se realize a separação da fração gelatinosa do ejaculado da fração rica em espermatozoides, uma vez que esta primeira apresenta efeitos nocivos à célula espermática. Para isso, o procedimento mais utilizado é a filtragem, que permite a retenção da fração gelatinosa, parte dos contaminantes bacterianos, além de sujidades (elementos estranhos) presentes no sêmen. A filtragem é realizada através do acoplamento de um filtro ao copo coletor de sêmen, ou realizada imediatamente após sua coleta (SQUIRES et al., 1999).

Após a separação das frações, o sêmen deve ser avaliado quanto ao volume da fração rica em espermatozoides e quanto à coloração seminal. Para o garanhão, o normal é a coloração branca acinzentada e havendo qualquer alteração na cor, pode indicar processo patológico ou simplesmente contaminação com urina, e/ou sujidades (LOVE, 2007).

Para que o espermatozóide seja metabólico a presença de membranas íntegras é indispensável para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema possam ocorrer (YANAGIMACHI, 1994; RODRIGUEZ et al., 1997; ARRUDA et al., 2004, 2006b).

A motilidade, a concentração e a morfologia espermáticas são as principais características avaliadas nas amostras de sêmen. Normalmente, a motilidade espermática é estimada em análise do sêmen entre lâmina e lamínula, enquanto as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados. Ambas as técnicas são realizadas sob uso de microscopia óptica. Entretanto, estudos apontam que este tipo de análise é imprecisa, mesmo quando executada por investigadores experientes, as análises são influenciadas por uma alta variação

entre observações e observadores. Esta imprecisão acontece, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2004, 2005, 2006b, CELEGHINI, 2005).

A motilidade espermática é um dos principais métodos de avaliação da preservação de espermatozoides e constitui um elemento importante na estimativa da viabilidade espermática (KENNEY et al., 1983, VARNER et al., 1988; PICKETT, 1992).

A motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. No entanto, é a técnica mais utilizada na rotina laboratorial e continua tendo grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade.

A avaliação da motilidade espermática tem por objetivo determinar a porcentagem de espermatozoides totais com movimento em um ejaculado. No entanto, para se obter uma avaliação mais precisa, é possível avaliar a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva, visto estes representarem alta aptidão. (PICKETT & VOSS, 1972).

A avaliação isolada da morfologia espermática pode não indicar o potencial de qualidade de um ejaculado. Porém, pode indicar se o potencial de qualidade é baixo, principalmente quando houver altas porcentagem de anormalidades espermáticas de primeiro e segundo grau (DOTT, 1975).

As alterações primárias ocorrem durante o processo de espermatogênese e as alterações de segundo grau ocorrem durante o percurso dos espermatozoides pelos ductos seminíferos, epidídimo e durante o ejaculado. (BLOM, 1973)

A presença de mais de 10% de anormalidades primárias, no ganhão, está relacionada à baixa qualidade, enquanto ganhões apresentando somente anormalidades secundárias, mesmo superando 30% de alterações em um ejaculado, não apresenta necessariamente baixa qualidade. (BIELANSKI, 1975).

De acordo com LOVE (2007), o volume do ejaculado é muito variável com a idade, época do ano, raça, regime de coleta de sêmen, estimulação sexual prévia, entre outros fatores.

A maioria dos ganhões ejacula entre 25 e 80 ml de fração rica em espermatozoides (SILVA FILHO, 1994; SAMPER et al., 2007).

Outro parâmetro importante é a avaliação morfológica, uma vez que, deformidades na célula espermática podem diminuir a capacidade de fertilização (KAVAK et al., 2004; PUGLIESI, 2009).

As características morfológicas dos espermatozoides equinos são diferentes das demais, a cabeça do espermatozoide possui formato assimétrico, o acrossoma é relativamente pouco desenvolvido e a inserção abaxial da cauda é considerada normal. São associadas com a inviabilidade as células que apresentam cabeça e o acrossomo com defeito (CANISSO et al. 2008; BIELANSKI & KACZMARSKI, 1979).

A fração rica é avaliada com auxílio de microscópio ótico e placa aquecedora. Uma gota de sêmen é colocada entre uma lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 35-37°C em placa ou mesa aquecedora, sendo então levada ao microscópio para serem avaliadas as características de motilidade total e progressiva em escala percentual (0 a 100%) e vigor (1 a 5) (CBRA, 1998). A motilidade total para a maioria dos garanhões varia de 40 a 80%, de 35 a 75% para a motilidade progressiva e vigor médio de três. Durante a avaliação de motilidade e vigor, amostras devem ser retiradas para avaliação da concentração e morfologia espermática. A concentração espermática varia de 50 a 400 milhões de espermatozoides por ml de ejaculado para a maioria dos garanhões (LOVE, 2007).

As proteínas do plasma seminal são parcialmente originárias do plasma sanguíneo e parcialmente sintetizadas e secretadas pelo testículo, epidídimo e visículas seminais (KATO et al., 1985; TURNER & REICH, 1987; MANJUNATH et al., 1994).

Nos equinos foram identificadas uma série de proteínas no plasma seminal (BRANDON et al., 1999) correlacionaram 3 proteínas com a fertilidade (SP-2, SP-3, SP-4), estas ocorrem em alta concentração em cavalos classificados como de baixa qualidade espermática. (SCHMITT, 2002).

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 MATERIAIS UTILIZADOS PARA COLHEITA E ANÁLISE MICROSCÓPICA

Para realização da colheita do sêmen foram usados vários materiais, sendo eles: Vagina artificial modelo Botucatu, composta por um tubo de látex flexível acoplado a um tubo rígido, estes formarão uma bolsa que simula as condições da genitália de uma égua; tubo plástico interno que será a mucosa descartável e esta sim entrará em contato com o pênis do animal; copo coletor de sêmen; água aquecida à 45°C para simular a temperatura da vagina de uma égua e ar para adequar a pressão que irá exercer; por fim um gel lubrificante para diminuir o atrito do garanhão.

Para execução da parte microscópica foi usado um microscópio, mesa aquecedora, câmara de Neubauer, lâminas para análise microscópica, lamínulas, água destilada, pipeta automática, ponteira para pipeta automática, eppendorfs, corante espermático, filtro para coleta sêmen e caneta permanente para identificação das lâminas.

2.2.2 COLHEITA DE SÊMEN

Após o posicionamento do manequim, o garanhão foi direcionado para fazer a monta, com 28 segundos o animal começou a rufiar, com 54 segundos ele montou no manequim, o pênis ereto foi desviado em direção a vagina artificial, na qual ele ejaculou com o tempo de 1 minuto e 30 segundos. Notou-se que o garanhão demonstrou comportamento como morder a cernelha da égua manequim.



Imagem 1: Colheita de sêmen equino. Fazenda Santa Leodora, Dom Pedrito – RS. Foto: Gabriela Canepa

2.2.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO SÊMEN

Inicialmente o sêmen foi filtrado para retirada do gel, após isso, foi pipetado 20µp de sêmen concentrado e colocado entre uma lâmina e lamínula para verificação de motilidade, vigor e concentração.

A motilidade se faz uma pequena gota de sêmen entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C e realiza-se a visualização em microscópio com aumento de 40 vezes. Caso a amostra esteja muito concentrada deve-se realizar uma diluição em meio diluidor, esta diluição pode ser 1:1.

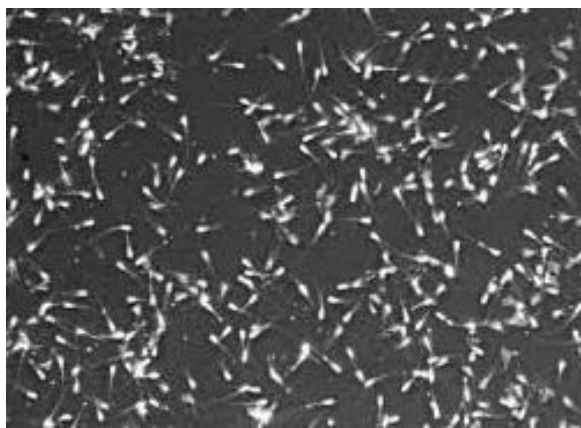


Imagem 2: Visualização dos espermatozoides em lâmina para avaliação dos parâmetros motilidade, vigor e concentração. Foto: Ilustrativa.

Em outra lâmina foi feita a coloração supra vital do sêmen concentrado, uma gota de sêmen para uma gota de corante a base de eosina (Botuvital^R) para análise da integridade das membranas dos espermatozoides, avaliadas no aumento de 100x em imersão.



Imagem 3: Espermatozóides vermelhos: Membrana Citoplasmática lesada. Espermatozóides brancos: Membrana Citoplasmática íntegra. Foto: Ilustrativa.

Após os feitos citados acima, foi feita a diluição em um eppendorf do sêmen, sendo 19 gotas de água destilada e 1 gota de sêmen concentrado. Em uma lâmina foi feito um esfregaço com uma gota deste sêmen diluído para coloração de células e posteriormente a análise morfológica.

Por fim, para a contagem total de espermatozoides, foi colocado 1 gota de sêmen concentrado em cada grade de contagem da câmara de Neubauer.



Imagem 4: Análise microscópica. Fazenda Santa Leodora, Dom Pedrito – RS. Foto: Juliana Baumhardt.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise do sêmen do equino Terêncio de São Pedro, da raça crioula, de 14 anos, foram encontrados os seguintes resultados, conforme descritos na tabela 1.

Tabela 1: Características ou fatores físicos e biotecnológicas encontradas na análise de sêmen de um equino, Rio Grande do Sul, 2017.

ITEM AVALIADO	RESULTADO OBTIDO
Volume	30 ml
Cor	Branco leitoso
Vigor espermático	2
Integridade de membrana	65,3%
Motilidade Total	25%
Motilidade Progressiva	5%
Concentração espermática/ml	$861,5 \times 10^6$
Número total de espermatozoides	$25,845 \times 10^9$

Não se obteve resultados referentes à análise de patologia espermática (morfologia), pois devido o sêmen estar diluído não foi possível realizar a fixação dos corantes nas células, sendo assim, a impossibilidade de gerar um resultado.

Segundo a apostila “Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino” disponibilizado pela Botupharma, o sêmen deve ser analisado segundo suas características macroscópicas e microscópicas, sendo os seguintes padrões para um bom resultado.

Tabela 2: Resultados padrão dos exames imediatos e mediatos da avaliação seminal. Botupharma, 2014.

ITEM AVALIADO	RESULTADO ESPERADO
Volume	Podendo variar de 20 á 100ml
Cor	Desde branco acizentado até um branco leitoso.
Motilidade espermática	A motilidade espermática é analisada segundo uma escala de porcentagem variando de 0 a 100%. Motilidade Total é a porcentagem de células móveis e Motilidade progressiva é a porcentagem de células que se movem para frente. (Motilidade ideal $\geq 70\%$).
Vigor espermático	Simultaneamente com a motilidade espermática se avalia o vigor espermático na escala de 0 a 5 (velocidade com que o espermatozoide se desloca, quanto maior a velocidade maior o valor). (Vigor ideal ≥ 3)
Integridade da membrana	Espermatozóides que possuem membrana citoplasmática íntegra. Avaliado utilizando-se

Comparando com o estudo de GRANEMANN, 2006, cujo os resultados de motilidade e vigor foram respectivamente: 80% e 4, contantou-se uma elevada diferença, sendo que nessa pesquisa os resultados foram de 25% e 2.

Ainda em comparação com o estudo citado acima, outro resultado que mostrou grande contraste foi o número total de espermatozoides, sendo que o autor cita uma média de 14.77 e neste trabalho o valor encontrado é de 25,845.

De acordo com SILVA FILHO, 1994 o sêmen avaliado está dentro dos padrões de volume, pois o autor cita que a maioria dos garanhões ejacula entre 25 e 80 ml de fração rica em espermatozoides.

Segundo HAFEZ e HAFEZ (2004), a concentração espermática de equino varia entre 150 a 300 milhões de espermatozóides por mililitros, portanto o valor encontrado nesta análise está acima do citado na literatura.

Um fator que pode ser responsável pela baixa qualidade seminal é o repouso sexual que o garanhão passou nos últimos 10 meses. Com a repetição das coletas poderia acontecer um melhoramento na qualidade seminal, excluindo o fator de envelhecimento espermático.

3 CONCLUSÃO

De acordo com o estudo do caso conclui-se que o sêmen equino analisado foi de baixa qualidade, de acordo com os resultados obtidos das análise macroscópica e microscópica e comparando com os dados obtidos da referência literária.

Enfatizando que o trabalho foi feito avaliando apenas um indivíduo e não uma população, podemos considerar que este animal não se encaixaria nos padrões esperados em um programa comercial de reprodução.

REFERÊNCIAS

1. ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.
2. ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; GARCIA, A. R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; SOUZA, L. W. O. **Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF**. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2004, Londrina, PR. Londrina: [s.n.], 2004. v.1, p. 166-179,
3. ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; PERES, K. R. **Biotécnicas Aplicadas a la Evaluación de Sêmen Criopreservado Bovino**. In: Seminário Internacional de Reproduccion en Grandes Animales, 5, Bogotá, Colômbia. Bogota: [s.n.], 2006.
4. ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; PERES, K. R.; NEVES, L. C. **Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF**. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, PR. Londrina: [s.n.], 2006b. p.157-164, 2006.
5. ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; SOUZA, L. W. O.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; GARCIA, A. R. **Importance of semen quality in fixed-time artificial insemination and embryo transfer program**. Acta Sci Vet, v.33, p.145-150, 2005.
6. BIELANSKI, W.; KACZMARSKI, F. **Morphology of spermatozoa um sêmen from stallions of normal fertility**. J Reprod. Fertil. Suppl. 1979.
7. BLOM, E. **Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram**. Nord Vet. Med, 25:7-8, 383, 1973
8. BOCHIO L., **Inseminação Artificial**, ABQM. Disponível em:
<<http://www.abqm.com.br/SecaoTecnica/Inseminação.asp>> Acesso em: 30 de agosto de 2017.
9. BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A. B.; FAYRER, H. R.A. **Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma**

- proteins and their correlation with fertility.** Theriogenology, v. 52, n.5, p. 863-873. 1999.
10. CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; KER P. G.; RODRIGUES, A. L.; SENA, T. C.; CARVALHO, G. R. **Coleta de sêmen de jumentos (*Equus asinus*) utilizando-se éguas em estro como manequim.** Ciênc. Vet. Tróp. 11(213):57-64, 2008.
 11. CARVALHO, G. R. **Fertility of the diluted equine semen, Cold to 20°C and transported.** 1992. 87 f. Thesis (Magister Scientiae) – Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1992.
 12. CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.** 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.
 13. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.
 14. CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA. **Estudo do Complexo do agronegócio do cavalo no Brasil.** Brasília: CNA, 2006.
 15. DAVIES, M.; M. C. G. **Equine artificial insemination.** Wallingford, Oxon: CAB International, 1999.
 16. DOTT, D. M. **Morphology of stallion spermatozoa.** J. Reprod. Fertil, 1975.
 17. FREITAS, V. J. **Colheita e Avaliação Seminal.** Universidade Estadual do Ceará. Disponível em: <http://www.uece.br/lfcr/dmdocuments/11_colheita%20semen.pdf> Acesso em: 30 de agosto de 2017.
 18. GRANEMANN, L. **Avaliação Comparativa do Sêmen Equino Colhido com Vagina Artificial e por Lavado Intraluminal da Cauda do Epidídimo Pós-Orquiectomia,** 2006. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp011261.pdf> > Acesso em: 25 de setembro de 2017.
 19. HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal.** 7ªed. Barueri. Manoele, 2004.

20. KATO, M.; SUNG, W.K.; KATO, K.; GOODMAN, D.S. **Immunohistochemical studies on the localization of cellular retinal binding protein in rat testes and epididymis**. Biology of Reproduction, v 32, p. 172-189, 1985.
21. KAVAK, A.; LUNDEHEIM, N.; AIDNIK, M.; EINARSSON, S. **Sperm morphology in Estonian and Tori breed stallions**. Acta Vet. Scand. 45:11-18, 2004.
22. KENNEY, R. M; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion**. Hastings E. U. A., Society for Theriogenology, 1983.
23. LOOMIS, P. R. **Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen**. Veterinary Clinics North American Equine Practice, v. 22, n. 3, p. 663-676, 2006.
24. LOVE, C. C. **Reproductive examination of the stallion: evaluation of potential breeding soundness**. In: YOUNGQUIST, R. S.; THARELFALL, W. R. Current therapy in large animal. Theriogenology. 2nd. ed. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2007. p. 10-14.
25. LUCENA, C.A.O.; MAIA, M.S.; MAIA, J.J.A.; SILVA, G.F.; SOUSA, T.M.L.; MOURA, C.E.B. **Influência da época do ano sobre os parâmetros seminais de garanhões pôneis**. Acta Veterinária Brasilica. V.8. supl.2. 2014.
26. MANUAL DE ANDROLOGIA E MANIPULAÇÃO DE SÊMEN EQUINO, 2014. Disponível em: <<http://www.botupharma.com.br/arq/Andrologia.pdf>> Acesso em: 20 de setembro de 2017.
27. MANUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOD, E.; DESNOYERS, L. **Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa**. Biology of Reproduction, v. 50, p. 27-37, 1994.
28. NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C.E.S.N.; SILVA, E.V.C. **Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado**. Bras Reprodução Animal. Belo Horizonte. V.30. p.42-56.2006. Disponível em: <<http://www.cbpa.org.br>> Acesso em: 10 de setembro de 2017.
29. PAPA, F. O. et al. **Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen**. Acta Scientiae Veterinariae, v. 33, p. 19-27, 2005. Suppl. 1.

30. PICKETT, B. W. **Seminal extender and cooled semen.** In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction, Filadelfia: Lea & Febiger, p. 746-754, 1992.
31. PUGLIESI, G. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores.** Dissertação de Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 103p, 2009.
32. REECE; WILLIAM, O. Dukes - Fisiologia dos Animais Domésticos. 12. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006.
33. RODRIGUEZ, M. Z. H.; ZHANG B. R.; LARSSON, B. **Bovine semen quality and the ability to produce embryos in vivo and in vitro.** Arq Fac Vet UFRGS, v.25, supl, p.108-126, 1997
34. SAMPER, J. C. **Techniques for artificial insemination.** In: YOUNGQUIST, R. S.; THREFALL, W. R. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 37-42.
35. SAMPER, J. C.; ESTRADA, A. J.; MCKINNON, A. O. **Insemination with frozen semen.** In: _____. Current therapy in equine reproduction. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2007. p. 285-288.
36. SCHMITT, F. L. **A Concentração, A Composição e a Qualidade do Plasma Seminal na Preservação Do Sêmen Equino a +4°C.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. Disponível em:
<<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/1824/000358826.pdf?sequence=1>
> Acesso em: 20 de setembro de 2017.
37. SILVA FILHO, J. M. **Aspects of the reproductive handling and of the semen in the artificial insemination in mares.** 1994. 402 f. Thesis (Doctor Scientiae) – Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1994.
38. SILVA FILHO, J. M. **Aspects of the reproductive handling and of the semen in the artificial insemination in mares.** 402 f. Thesis (Doctor Scientiae) – Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1994.
39. SQUIRES, E. L. et al. **Cooled and frozen stallion semen, fort collins: animal reproduction biotechnology laboratory.** Colorado State University, **Bulletin** n. 9, 1999.

40. TRISCHNER, M. **Evaluation of deep-frozen semen in stallions.** Journal of Reproduction and Fertility Suppl, v. 27, p. 53-59, 1979.
41. TURNER, T.T.; REICH, G.W. **Influence of protein in rat cauda epididymal lumenfluid on cauda sperm motility.** Gamete and Research, v. 18, p. 267-278, 1987.
42. VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R. M. **Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters.** Theriogenology, v. 29, n. 5, p. 1043-1054, 1988.
43. YANAGIMACHI, R. **Mammalian fertilization.** In: Knobil E, Neill JD. The physiology of reproduction. New York: Raven Press, p.189-317, 1994.