

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n10a430.1-9>

Princípios básicos da manipulação, análise e envio do sêmen equino

Valquíria da Silva Oliveira^{1*}, Karine Galhego Morelli², Giancarlo Thadeu Ramos Montalvão Coutinho³

¹Médica veterinária, graduada pelo Centro Universitário Presidente Antônio Carlos. Juiz de Fora – MG Brasil.

²Médica Veterinária da Saúde Equina Vets (Juiz de Fora, MG Brasil).

³Professor do Centro Universitário Presidente Antônio Carlos, Departamento de Veterinária. Juiz de Fora – MG Brasil.

*Autor para correspondência, E-mail: valquíria_so@outlook.com

Resumo. O crescimento das biotecnologias reprodutivas proporcionou o aprimoramento das técnicas utilizadas para colheita, análise, manipulação e envio do sêmen, tornando as mesmas necessárias para garantir a qualidade espermática e aumentar as taxas de fertilidade. Esta revisão objetivou-se elucidar de forma prática as recentes técnicas empregadas, na análise imediata, mediata, conservação e envio do sêmen equino. As análises da viabilidade espermática iniciam-se na colheita do sêmen e são classificadas em análises imediatas (volume, cor, aspecto, odor, motilidade e vigor) e mediatas (concentração e morfologia), as mesmas precisam estar dentro do considerado normal para espécie. Para envio do sêmen é necessário resfriar ou refrigerar a amostra adequadamente em caixas isotérmicas para promover sua conservação. A correta manipulação, análise e envio do sêmen é de extrema importância dentro da reprodução equina, pois com ela conseguimos avaliar as características morfofuncionais dos espermatozoides de cada garanhão e adequar às técnicas e meios disponíveis de acordo com a necessidade de cada indivíduo, aumentando a taxa de fertilização desses animais.

Palavras chave: andrologia, equino, sêmen, reprodução

Fundamental principles of the equine's semen manipulation, analysis and sending

Abstract. The development of the reproductive biotechnologies has provided improvements on the techniques that are used to collect, analyze, handle and send the semen. This fact makes these techniques totally necessary to guarantee the spermatic quality and also increase the fertility rates. This review aimed to elucidate in a practical way the most recent techniques applied to the immediate and mediate analyses in addition to the equine's semen deliver. The viability spermatic analyses are initiated with the semen collecting and they are ranked into immediate analysis (considering color, volume, appearance, odor, mobility and vigor) and mediate analysis (considering concentration and morphology). Both analyses need to be taken as regular to the species. To the semen's sending is necessary refresh or refrigerate the sample properly in isothermal boxes to provide their conservation. The proper semen's manipulation, analysis and sending are of utmost importance to horse breeding because this way it is possible to evaluate each stallion's spermatozoon's morph functions characteristics and to adjust the techniques and available means to the necessity of every individual, increasing these animals' breeding rate.

Keywords: andrology, equine, semen, reproduction

Principios fundamentales de la manipulación, análisis y envío del semen equino

Resumen. El crecimiento de las biotecnologías reproductivas proporcionó perfeccionamientos en las técnicas que son utilizadas para recoger, analizar, manipular y transportar el semen. Tornando estas necesarias para asegurar la calidad espermática y aumentar las tasas de fertilidad. Esta revisión tuvo como objetivo dilucidar de manera práctica las más recientes técnicas aplicadas a los análisis inmediatos, mediatos, conservación y transporte del semen equino. Los análisis de la viabilidad espermática son comenzados durante la colecta del semen y son clasificados en análisis inmediatos (considerando el color, el volumen, la apariencia, el olor, la movilidad y el vigor) y análisis mediatos (que consideran la concentración y la morfología). Los dos análisis requieren estar normales para la especie. Para el envío del semen es necesario refrescar o refrigerar la muestra adecuadamente en cajas isotermas para promover la conservación. La manipulación correcta, el análisis y el envío correcto del semen son de máxima importancia para la reproducción equina pues así es posible evaluar las características de las funciones morfológicas de los espermatozoides de cada semental y ajustar las técnicas y los medios disponibles de acuerdo con las necesidades de cada individuo, aumentando la tasa de reproducción de esos animales.

Palabras clave: andrología, equino, semen, reproducción

Introdução

A equideocultura brasileira está em expansão. Hoje o efetivo total é de aproximadamente 5.501.872 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2019). Só o estado de Minas Gerais é responsável por 808.349 mil cabeças (ANUALPEC, 2019). O agronegócio do cavalo é responsável por movimentar R\$ 16.15 bilhões do Produto Interno Bruto nacional e gera três milhões de empregos indiretos e diretos (Brasil, 2016). Devido à expansão da equideocultura, houve um crescimento e intensificação das biotecnologias reprodutivas, que estão sendo cada vez mais utilizadas (Palmer et al., 1990).

A inseminação artificial (IA) ainda tem grande aplicação, por isso a correta colheita e manipulação do sêmen são essenciais, pode-se utilizar o sêmen fresco, fresco resfriado ou congelado. Porém, os criadores selecionaram os garanhões com base no seu desempenho atlético e não reprodutivo o que tornou a manipulação espermática um pouco mais delicada que nas outras espécies, devido sua sensibilidade (Oliveira et al., 2013; Woods et al., 1990). Na IA, é de extrema importância a realização do exame andrológico, pois ele reflete as atuais condições reprodutivas do macho. O potencial reprodutivo do animal deve ser verificado sempre antes do início da estação de monta para diagnóstico de sub ou infertilidade e adequação do melhor método para comercialização do sêmen (Contri et al., 2010; Papa et al., 2007).

Existem diversos métodos de avaliação da viabilidade espermática que se iniciam na colheita do sêmen (Bortot & Zappa, 2013). Os mesmos são divididos em análise imediata e mediata. As análises imediatas devem ser realizadas logo após a colheita, com os espermatozoides ainda vivos. Essas análises incluem: volume (ml), cor, aspecto, odor, motilidade e vigor; já as análises mediatas, por não necessitarem do espermatozoide vivo, podem ser realizadas posteriormente, sendo elas: concentração e morfologia (Machado et al., 2006; Maia, 2010; Mies Filho, 1970).

O presente trabalho teve como objetivo elucidar os princípios básicos da análise imediata e mediata do sêmen equino, e formas de preservação para seu transporte.

Anatomia e fisiologia do garanhão

Na reprodução, as funções do macho vão desde a formação de espermatozoide até sua deposição no útero da fêmea. As principais estruturas que compõem o sistema genital masculino são: os testículos, onde ocorre a produção dos espermatozoides; os epidídimos, que promovem a maturação e capacitação espermática; os ductos deferentes, que conduzem os espermatozoides até a uretra; as glândulas acessórias, denominadas ampola do ducto deferente, glândula vesicular, próstata e glândula

bulbouretral, que secretam o plasma seminal; o pênis e a glândula são constituídos por músculo cavernoso; e o prepúcio, que envolve a parte exposta do pênis, o mesmo é constituído de dupla camada que favorece a deposição do esmegma (Dyce et al., 2004; Reece, 2008).

Diferentemente de outras espécies domésticas, os equinos apresentam o eixo longitudinal dos testículos quase na horizontal (Reece, 2008). Já seu desenvolvimento ocorre na região sublombar, ainda na vida fetal, a descida do testículo para o escroto, ocorre durante ou logo após o nascimento, se não ocorrer o animal é denominado Criptorquídico, uni ou bilateral (Frandsen et al., 2011).

Os componentes do ejaculado são os espermatozoides, e as secreções das glândulas acessórias, que fornecem um ambiente favorável aos espermatozoides e agem como um tampão contra acidez natural do trato genital feminino, formando o plasma seminal (Frandsen et al., 2011; Reece, 2008). O volume do ejaculado e concentração sofre variações, de 40 a 60 ml e de 100 a 200 milhões por ml, respectivamente (Palmer et al., 1990).

A função testicular do garanhão é reduzida nos dias curtos, devido a influência do fotoperíodo, o que interfere diretamente na qualidade espermática. Nos dias longos ocorre a diminuição da produção de melatonina produzida pela glândula pineal, e estimulação da produção e liberação do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo (Frandsen et al., 2011). O GnRH atua na glândula pineal estimulando a produção de dois hormônios importantes na espermatogênese, o Hormônio Folículo Estimulante (FSH), que atua nas células de Sertoli, a qual fornece nutrição as células germinativas, e o Hormônio Luteinizante (LH) que atua nas células de Leydig, estimulando a produção de Testosterona. A testosterona é responsável pelo início da maturação espermática, desenvolvimento dos órgãos e características sexuais masculinas (Figura 1) (Reece, 2008).

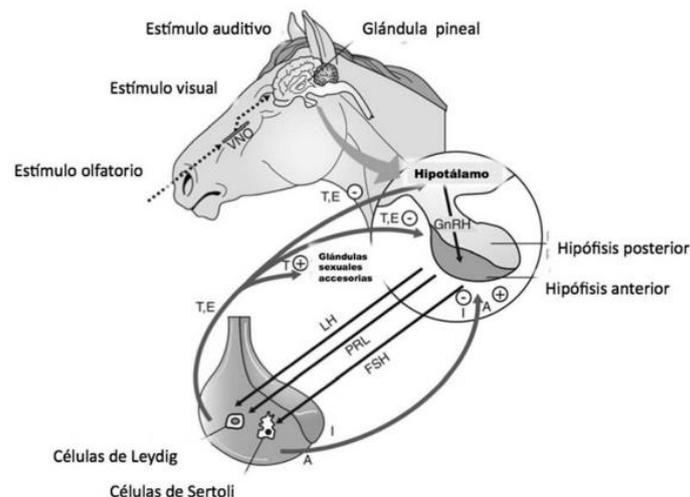


Figura 1 Eixo hipofise-hipotálamo-gônadal do garanhão. **Fonte:** Obregón & Torres-Díaz (2012).

Colheita de sêmen

A colheita depende muito da libido do animal; a qual sofre influências principalmente por fatores ambientais ou comportamentais, por isso a importância da rufiação antes de iniciar o procedimento. O local deve ser limpo, espaçoso, com piso antiderrapante e livre de barulhos. Os equipamentos que entrarem em contato com o sêmen devem ser aquecidos a aproximadamente 37° C. A forma mais utilizada para colheita de sêmen equino é com vagina artificial; porém, existem outros métodos como indução farmacológica e massagem das glândulas anexas (Dascanio & McCue, 2014). Com a vagina artificial pode-se realizar a colheita simulando a monta em manequim artificial ou em manequim natural, com a égua preferencialmente no cio e devidamente contida, ou ainda com o animal em estação através de excitação mecânica (Samper et al., 2009). Existem diversos modelos de vagina artificial, como por exemplo, o modelo de Botucatu (brasileira), Hanover, Colorado, Missouri e a japonesa (Dascanio & McCue, 2014).

A colheita em estação é indicada em animais que apresentam dificuldade de realizar a monta, seja por lesões musculoesqueléticas ou descoordenação motora. Em estação também se utiliza a indução

farmacológica com associação de imipramina na dose de 2,2 mg/kg/EV e xilazina na dose de 0,3 a 0,4 mg/kg/EV ou detomidina na dose de 0,01 mg/kg/EV. A emissão passiva do sêmen ocorre de 3 a 5 minutos após a aplicação da xilazina. Na massagem das glândulas acessórias por via retal a concentração espermática é menor. Nos dois métodos é necessária a colocação de um dispositivo sobre o prepúcio para coleta (Samper et al., 2009).

Avaliação imediata

A avaliação imediata inclui a análise de volume, cor, aspecto, odor, motilidade e vigor. Para remoção da fração de gel e de qualquer sujidade presente no ejaculado, o sêmen é filtrado durante ou imediatamente após a colheita (Fürst et al., 2005). Inicia-se a avaliação pelas características macroscópicas. O volume ejaculado é expresso em mililitro (ml) e varia de acordo com raça, idade, método de coleta, tempo de excitação, entre outros (Fürst et al., 2005). O método da vagina artificial apresenta valores próximos aos fisiológicos de 40 a 60 ml e livre de gel (Carvalho, 1992). A coloração considerada normal varia de branco a acinzentado, porém poderá apresentar variações de acordo com o componente (sangue, pus, urina e sujidades). O aspecto é leitoso e o odor *sui generis* (Fürst et al., 2005).

Após avaliação macroscópica, inicia-se a análise microscópica, com auxílio de microscópio óptico. Entre lâmina e lamínula pré-aquecida e mantida a aproximadamente 37°C, coloca-se uma gota de sêmen e utilizando a objetiva de 10x, iniciamos a avaliação pela motilidade (Brasil, 2013). Expressa em porcentagem (0 a 100%) e considerada importante para estimativa da viabilidade espermática, a mesma consiste no número de espermatozoides móveis. Desta forma a motilidade é considerada uma avaliação subjetiva, para avaliação objetiva utiliza-se o software computer-assisted sêmen analyses (CASA) (Contri et al., 2010; Fürst et al., 2005). Por fim, o vigor espermático é avaliado concomitantemente à motilidade e é classificado utilizando uma escala de 1 a 5 e representa a intensidade do movimento espermático (Tabela 1) (Queiroz, 2003).

Tabela 1 Classificação do vigor da motilidade espermática.

Escore	Definição
5	Progressivo retilíneo e muito rápido
4	Progressivo retilíneo rápido
3	Intermediário
2	Lento
1	Exclusivamente oscilatório

Avaliações mediatas

As avaliações mediatas incluem concentração e morfologia espermática que não necessitam dos espermatozoides vivos, e por isso podem ser realizadas posteriormente, porém para diluição adequada e envio do sêmen é necessário fazer a concentração. O morfológico é interessante realizar no mínimo três vezes, antes, durante e depois da estação de monta (Monteiro et al., 2011). A concentração consiste no número de espermatozoides por milímetro (mm³) ou centímetro cúbico (cm³) quando multiplicado por 1000. A concentração espermática pode ser influenciada por fatores intrínsecos como idade, raça, estado de higidez testicular e fatores extrínsecos como frequência da atividade sexual, método de colheita e período da colheita, se está ou não em estação de monta. O procedimento para contagem espermática pode ser realizado utilizando a câmara de Neubauer, espectrofotometria ou ainda a contagem computadorizada (CASA) (Oliveira et al., 2013). Para realizar a concentração é necessária uma diluição que pode variar de 1:10 a 1:100, dependendo da concentração do ejaculado, porém a mais utilizada para equinos é a de 1:20. A diluição pode ser realizada com solução de formol-salino, citrato de sódio formolado ou água destilada. Não existe uma diluição correta, porém a mesma deve ser realizada de maneira que na câmara de Neubauer (Figura 2) os espermatozoides não se sobreponham (Feranti et al., 2013; Mies Filho, 1970). A contagem mais comumente realizada é na câmara de Neubauer, devido seu baixo custo e praticidade. Após diluição e homogeneização adequada da amostra em becker ou tubo de ensaio com uma micropipeta, monta-se a câmara de Neubauer com lamínula específica, depositando a alíquota sob a lamínula, até preencher a superfície dos dois lados da câmara, deixar a câmara em repouso horizontal por 5 minutos para as células se sedimentarem no fundo (Papa

et al., 2007). Utilizando o microscópio óptico ou de contraste de fase com objetiva de 40X, conta-se 5 quadrados grandes de cada lado do retículo, na diagonal ou o central e um em cada ponta do quadrado, sendo que a contagem deve ser realizada em 'L' ou 'L' invertido (Figura 2), uma variação de 10% entre os retículos é aceitável, além desse valor indica preenchimento ou homogeneização errônea. Após contagem realiza-se a média aritmética, através de um cálculo exemplificado (Figura 3). O resultado encontrado estará em mm^3 , para obter a concentração em ml deve-se multiplicar o resultado por 1000 (Bortot & Zappa, 2013).

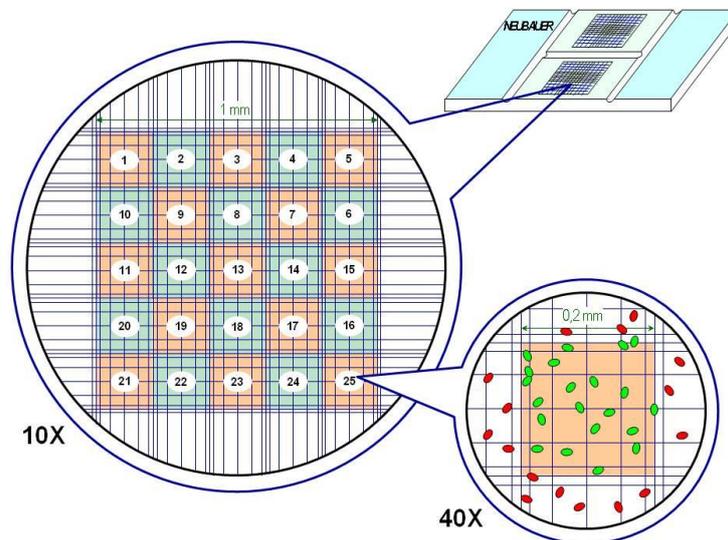


Figura 2. Câmara de Neubauer, cada retículo contém 25 quadrados sendo que cinco deles devem ser contados, os cinco quadrados contados podem ser na diagonal (1, 9, 13, 17 e 25 ou 5, 7, 13, 19 e 21) ou a central e um em cada ponta do quadrado (1, 5, 13, 21 e 25) e a contagem em "L" invertido dos espermatozoides que tiverem com a cabeça até a 3ª linha. **Fonte:** Bikandi & Millan (2014).

$$N \text{ SPTZ} = \frac{A}{\frac{1}{10} \times \frac{N}{25} \times \frac{1}{B}}$$

Figura 3. Fórmula para cálculo da concentração onde: A= número de espermatozoides contados nos dois retículos (10 quadrados), B= fator de diluição (varia de 1:10 a 1:100), N= número de quadrados grandes contados 10 quadrados, 1/10= altura da câmara (0,1mm), 1/25 = área total de um retículo.

Para analisar as características morfológicas podemos utilizar dois métodos, o esfregaço corado em microscópio óptico ou preparação úmida em microscópio de contraste de fase e/ou de interferência diferencial, sendo que o segundo método é mais indicado que esfregaços corados por métodos convencionais (Arruda et al., 2011).

O esfregaço corado deve ser realizado colocando uma gota de sêmen associada ou não ao corante, na lâmina e realiza-se o esfregaço (Figura 4). Indica-se uma breve avaliação antes de corá-las para avaliar a distribuição das células na lâmina. Existem diversos corantes hoje no mercado. Inicia-se então a contagem de 200 células, percorrendo a lâmina de forma homogênea (Figura 5), classificando os espermatozoides de acordo com sua patologia, obtendo no final a porcentagem de espermatozoides normais e de cada patologia (Arruda et al., 2011).

Para preparação úmida é necessário fazer a diluição em formol-salino tamponado, a diluição adequada é de 1 ml de diluente para uma quantidade de gotas de sêmen que formem um aspecto leitoso.

Para evitar a aglutinação espermática é indicado agitar a amostra até o exame. Retira-se uma alíquota da diluição e coloca sobre uma lâmina, cobrindo-a com uma lamínula, o excesso de líquido é retirado aplicando pressão suave sobre a lamínula recoberta com papel filtro. A lâmina deve ser levada ao microscópio de contraste ou interferência diferencial de fase, com objetiva de 100x sob óleo de imersão, da mesma forma conta-se 200 células e classifica os espermatozoides (Freneau, 2011).

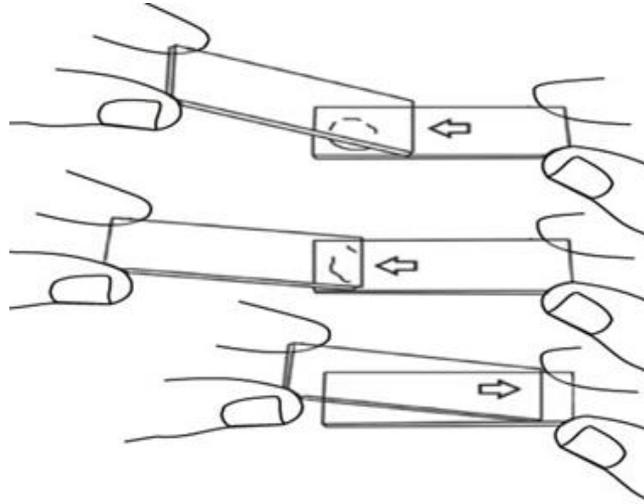


Figura 4. Preparação de esfregaço. Fonte: Salvador & Folhadella (2009).

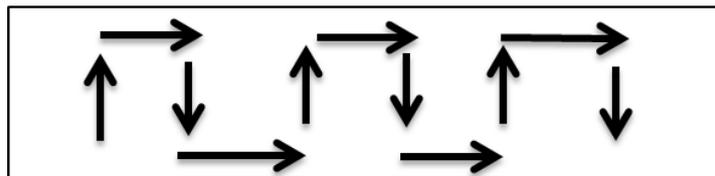


Figura 5. Esquema de como percorrer a lâmina. Fonte: Arquivo pessoal.

As patologias espermáticas são classificadas em defeitos menores que não interferem diretamente na fertilidade e defeitos maiores que podem gerar infertilidade ou inviabilidade embrionária, as mesmas podem estar presentes no acrossoma, cabeça, peça intermediária, cauda ou ainda apresentar anomalias e malformações (Figura 6 e 7) (Freneau, 2011; Papa et al., 2007).

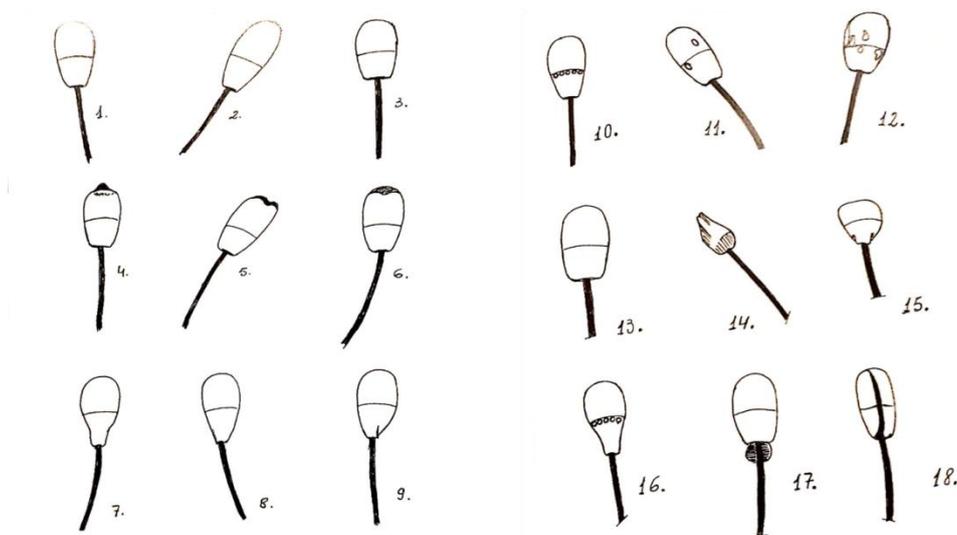


Figura 6. Representação dos defeitos espermáticos: 1, 2 e 3 cabeça normal com suas variações; 4, 5 e 6 grânulos no acrossoma e suas variações; 7 piriforme; 8 e 9 estreito na base e sua variação; 10, 11 e 12 aspecto de diadema, vacúolos e suas variações; 13 cabeça gigante; 14 e 15 cabeça pequena anormal; 16 cabeça piriforme com diadema; 17 gota citoplasmática proximal e 18 cabeça com crista nuclear.

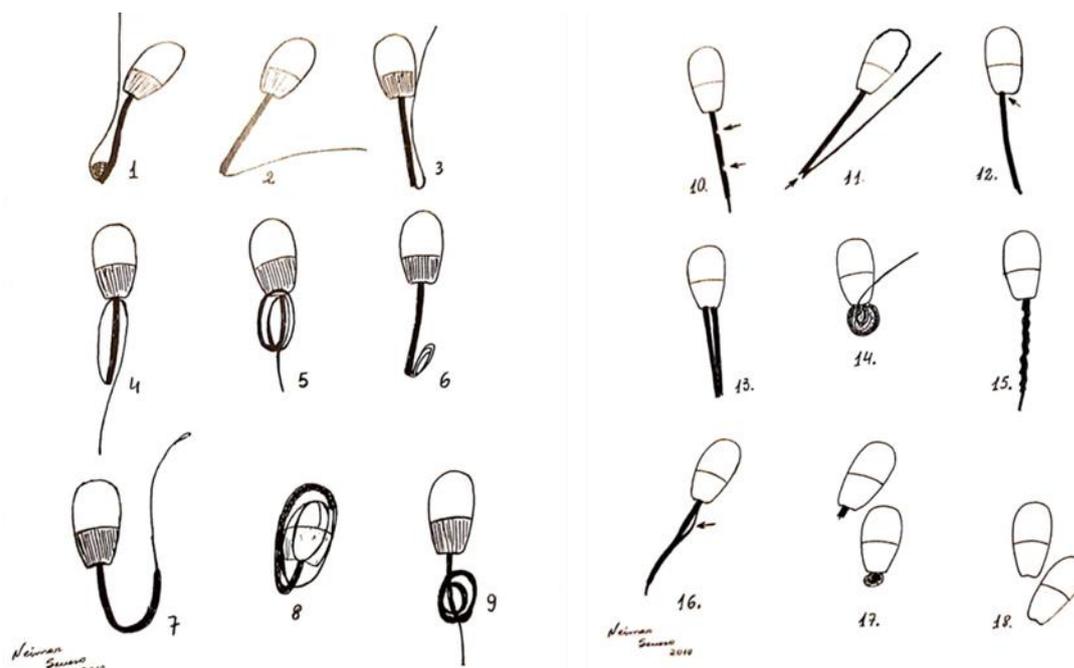


Figura 7. Representação dos defeitos espermáticos: 1 cauda dobrada com gota distal; 2 cauda dobrada simples; 3 cauda dobrada; 4 cauda fortemente dobrada; 5 cauda fortemente enrolada envolvendo a peça intermediária; 6 cauda dobrada na porção terminal; 7 peça intermediária encurvada; 8 cauda enrolada na cabeça; 9 peça intermediária fortemente enrolada; 10 aplasia segmental da peça intermediária; 11 peça intermediária fraturada; 12 implantação abaxial; 13 cauda dupla ou formas teratológicas; 14 defeito de Dag; 15 peça intermediária em saca-rolha; 16 pseudogota; 17 agenesia de peça intermediária e 18 cabeça isolada normal.

Envio do sêmen

O sêmen *in natura* apresenta temperatura aproximada de 37^o C e alta atividade metabólica, os resíduos dessa atividade podem levar a perda da viabilidade e motilidade espermática. Já foi comprovado cientificamente que quando resfriamos ou congelamos algo, conseguimos diminuir o metabolismo celular e consequentemente preservar o produto por mais tempo (McKinnon et al., 2011).

Uma das formas de preservação do sêmen para seu transporte é seu resfriamento ou refrigeração (dependendo da temperatura empregada), pode-se utilizar a forma automatizada ou convencional. O equipamento automatizado tem o decréscimo de temperatura gradual sem influência do meio externo e o modo convencional pode ser realizado utilizando containers ou caixas isotérmicas com gelo artificial e sofre influência do meio externo, o tempo de preservação depende da curva de resfriamento, a qual varia de 5 °C a 15 °C (Figura 8) (Brasileiro et al., 2019).

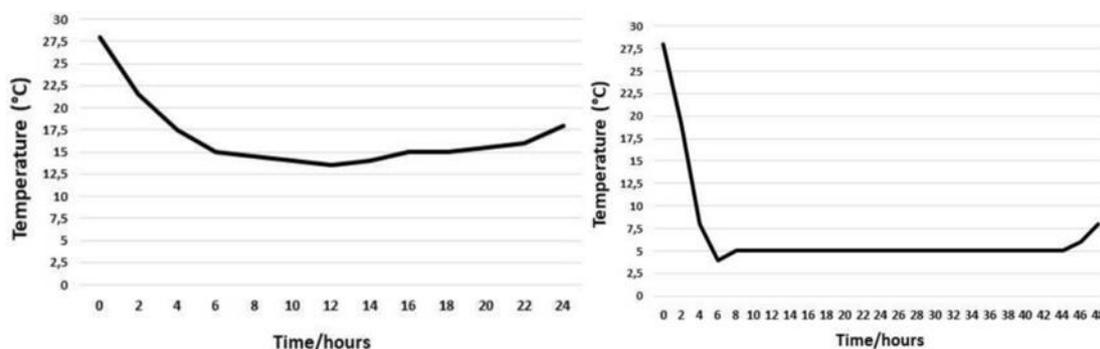


Figura 8. Curvas de resfriamento. Fonte: (Brasileiro et al., 2019).

O sêmen equino normalmente é armazenado entre 4-6^o C, seu acondicionamento pode ser de até 48 horas, porem para reduzir o dano a membrana fosfolipídica do espermatozoide, pode-se utilizar o armazenamento de 15-20^o C, com tempo de armazenamento de 24 horas, principalmente em garanhões que não resfriam muito bem (McKinnon et al., 2011; Monteiro et al., 2013).

Para que os espermatozoides não sofram com o choque térmico é recomendado resfriar o sêmen lentamente, com queda de 0,5^o C por minuto em diluente. As alterações mais comuns que os espermatozoides apresentam ao sofrerem choque térmico são: cauda dobrada, cauda fortemente enrolada ou alterações no acrossoma (Figura 9) (Brasileiro et al., 2019; Monteiro et al., 2013).

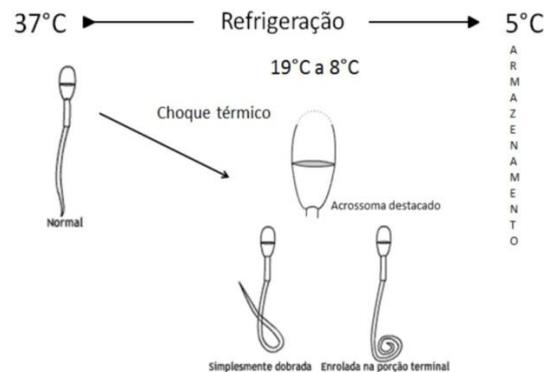


Figura 9. Esquema representativo dos danos morfológicos que podem ser causados pelo resfriamento. **Fonte:** Silva et al. (2017).

Considerações Finais

A correta avaliação e manipulação do sêmen são de extrema importância na reprodução equina, pois com ela conseguimos avaliar as características morfofuncionais dos espermatozoides e aumentar a fertilidade do garanhão utilizando métodos que melhor se adequam as características individuais de cada garanhão, aumentando assim o número de descendentes de um mesmo indivíduo geneticamente superior, prolongando a vida reprodutiva desse indivíduo e satisfazendo o cliente.

Referências bibliográficas

- ANUALPEC. (2019). *Anuário da Pecuária Brasileira* (20th ed. Vol. 1). São Paulo, São Paulo, Brasil: Instituto FNP.
- Arruda, R. P., Celeghini, E. C., Alonso, M. A., Carvalho, H. F., Oliveira, L. Z., Nascimento, J. & Jaimes, J. D. (2011). Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35(2):145-151.
- Bikandi, J. & Millan, R. S. (2014). *Cámara de contaje Neubauer improved*. Mikros, Lejona, Viscaya, Espanha.
- Bortot, D. & Zappa, V. (2013). Aspectos da reprodução equina: Inseminação artificial e transferência de embrião: Revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 21(1):1-23.
- Brasil, (2013). Ministério de Agricultura e Abastecimento (MAPA) portaria nº 109 de 25 maio de 2009 e 393 de 16 de julho de 2010. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte (MG); 3 ed:104.
- Brasileiro, L. S., Segabinazzi, L. G. T. M., Menezes, E., Salgueiro, C. C., Novello, G., Scheeren, V. F. C. & Nunes, J. F. (2019). Coconut water as an extender component for cooled equine sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7869-73.
- Carvalho, G. R. (1992). *Fertility of the diluted equine semen, cold to 20° C and transported*. Master of Science, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- Contri, A., Valorz, C., Faustini, M., Wegher, L. & Carluccio, A. (2010). Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, 74(3):424-435.
- Dascanio, J. J. & McCue, P. M. (2014). *Equine reproductive procedures*. Iowa, USA: Wiley- Blackwell.
- Dyce, K. M., Wensing, C. J. G. & Sack, W. O. (2004). *Tratado de anatomia veterinária*. São Paulo: Elsevier Brasil.
- Feranti, J. P., Brun, M. V., Zanella, E., Messina, S. A., Schuh, R., Santos, F. R. & Brambatti, G. (2013). Viabilidade de duas novas técnicas para inseminação intrauterina laparoscópica em ovinos. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(3):687-693.

- Frandsen, R. D., Wilke, W. L. & Fails, A. D. (2011). *Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda*. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Freneau, G. (2011). Aspectos da morfologia espermática em touros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35(2):160-170.
- Fürst, R., Carvalho, G. R., Fürst, M. C. O., Ruas, J. R. M., Borges, A. M. & Mafilli, V. (2005). Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(5):599-607.
- Machado, V. P., Nunes, J. F., de Araújo, A. A., Fernández, D. R. P., Cordeiro, M. A., Medeiros, C. H. N. & Monteiro, A. W. U. (2006). Fertilidade após a inseminação artificial intra-cervical ou laparoscópica intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43(Supl.):43-49.
- Maia, M.S. (2010). *Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos* (Vol. 1). Natal: EMPARN.
- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. & Varner, D. D. (2011). *Equine reproduction*. USDA: John Wiley & Sons.
- Mies Filho, A. (1970). *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Sulina.
- Monteiro, G. A., Guasti, P. N., Rocha, A. S., Martin, I., Sancler-Silva, Y. F. R., Dell'Aqua, C. P. F. & Papa, F. O. (2013). Effect of storage time and temperature of equine epididymis on the viability, motion parameters, and freezability of epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(3):169-173.
- Monteiro, G. A., Papa, F. O., Guasti, P. N., Freitas, N. P. P., Melo, C. M., Avanzi, B. R. & Dell'Aqua Júnior, J. A. (2011). Fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis. *Veterinária e Zootecnia*, 18255-263.
- Obregón, E. B. & Torres-Díaz, L. (2012). Reproducción estacional en el macho. *International Journal of Morphology*, 30(4):1266-1279.
- Oliveira, G. C., Oliveira, B., Celeghini, E. C. C., Fernandes, C. B. & Mattos, C. B. (2013). Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 37(1):23-28.
- Palmer, E., Bezar, J., Magistrini, M. & Duchamp, G. (1990). *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. *Journal of Reproduction and Fertility*, 44375-384.
- Papa, F. O., Alvarenga, M. A., Dell'qua, J. & Monteiro, G. M. (2007). *Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino*. São Paulo, São Paulo, Brasil: Botupharma.
- Queiroz, V. S. (2003). *Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (Leopardus pardalis, Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides*. Master of Science, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Reece, W. O. (2008). *Anatomia funcional e fisiologia dos animais domésticos*. São Paulo: Editora Roca.
- Salvador, D. F. & Folhadella, I. M. (2009). *Avaliações microscópicas do sêmen*. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil: Educação Pública.
- Samper, J. C., Pycoc, J. F. & McKinnon, A. O. (2009). *Current therapy in equine medicine*. Philadelphia, Pensilvânia, USA: Saunders Elsevier.
- Silva, L. T., Maia, M. S., Aquino, J. J. M. & Moura, C. E. B. (2017). *Comparação morfológica da célula espermática equina no sêmen fresco e refrigerado*. Paper presented at the Encontro Anual da Biofísica, Recife, Pernambuco, Brasil.
- Woods, J., Bergfelt, D. R. & Ginther, O. J. (1990). Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. *Equine Veterinary Journal*, 22(6):410-415.

Recebido: 6 de setembro, 2019.

Aprovado: 7 de outubro, 2019.

Publicado: 26 de novembro, 2019.

Licenciamento: Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados