

## INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E TECNOLOGIA DE SÊMEN EM JUMENTOS

*(Artificial insemination and semen technology in donkey)*

Carlos Enrique PEÑA ALFARO<sup>1\*</sup>; Rodrigo Alves MONTEIRO<sup>2</sup>;  
Lawrence de Oliveira BARROS<sup>3</sup>; Valdir de Almeida MORAIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília. Cx Postal 61, Patos/PB. CEP: 58.708-110, <sup>2</sup>Programa de Ciência e Saúde Animal da; <sup>3</sup>Tierärztliche Hochschule de Hannover, Alemanha. \*E-mail: [cpena55@gmail.com](mailto:cpena55@gmail.com)

### RESUMO

A presente revisão enfoca a inseminação artificial e as tecnologias de sêmen de jumento (*Equus asinus*) que servem de apoio à implantação de programas de melhoramento genético, preservação da espécie ou na implantação de programas produtivos como a produção de muare, produção de rebanhos de jumentas leiteiras ou na produção de carne e derivados. O uso destas técnicas, se justificam pelo fato de que pode ser usado o potencial zootécnico das mesmas, como também por ter apresentado uma redução do efetivo mundial nos últimos 10 anos, fato este que pode colocar a espécie em perigo de extinção ou de comprometimento de diversos ambientes ao redor do mundo. Os jumentos têm prestado grande ajuda em diversas sociedades onde os mesmos servem ainda como meio de transporte ou tração em regiões com dificuldades topográficas e de menor poder aquisitivo. É apresentada uma relação histórica da inseminação artificial nos equídeos, com ênfase ao uso dos jumentos em nível mundial e no Brasil. Apresenta-se a técnica da inseminação artificial de forma simples e nos seus diversos processos técnicos, na execução, preparativos, avanços no uso de sêmen refrigerado, congelado e vitrificado

**Palavras-chaves:** Jumentos, inseminação, sêmen.

### ABSTRACT

This review focuses on artificial insemination and donkey semen technologies (*Equus asinus*) that support the implementation of genetic improvement programs, preservation of the species or in the implementation of productive programs such as the production of mules, production of dairy herds or in the production of meat and derivatives. The use of these techniques is justified by the fact that their zootechnical potential can be used, as well as by the fact that they have presented a reduction in the world herd in the last 10 years, a fact that can put the species in danger of extinction or compromise of several environments around the world. The donkeys have provided great help in several societies where they still serve as a means of transportation or traction in regions with topographical difficulties and less purchasing power. A historical relation of artificial insemination in horses is presented, with emphasis on the use of donkeys worldwide and in Brazil. The technique of artificial insemination is presented in a simple way and in its various technical processes, in the execution, preparations, advances in the use of chilled, frozen and vitrified semen

**Key words:** Donkey, insemination, semen.

### INTRODUÇÃO

Os asininos acompanham a humanidade desde 4000 anos A.C., havendo desempenhado importantes funções em diversas regiões do mundo no transporte e tração animal, fornecendo alimentação, carne e leite, ultimamente no uso da indústria de cosméticos e de medicamentos, indústria alimentar medicinal e em alguns países asiáticos como a China pelo uso da pele na obtenção de gelatina destinada a medicina milenar chinesa. No Brasil e no mundo, os jumentos têm tido importante papel zootécnico nos cruzamentos com equinos, visando a produção de muare, animais estes de grande utilidade na lida do campo e uso de

carga, desde a conquista de territórios na época da colônia até nossos dias (PEÑA- ALFARO *et al.*, 2012).

De acordo com o IBGE (2017), existem no Brasil cerca de 376.874 cabeças de asininos, com uma maior concentração na Região Nordeste, onde os estados de Bahia, Piauí e Maranhão ocupam os três primeiros lugares e uma predominância do jumento nordestino. Nos últimos anos tem se observado uma redução significativa desta espécie em todas as regiões do mundo, no Brasil com uma redução que representou 37% do efetivo dessa espécie no período de 5 anos.

A espécie asinina é considerada com potencial produtivo pouco explorado zootecnicamente, principalmente no uso preventivo e medicinal do leite seja in natura ou processado, considerando as propriedades nutricionais e medicinais que este leite apresenta (POLIDORI *et al* 2009).

Nesta espécie o uso de tecnologias reprodutivas tem sido pouco estudado ao comparar com equinos, assim tem sido realizados estudos caracterizando os parâmetros biológicos do sêmen, Utilização de diversos diluentes e protocolos para avaliação laboratorial de sêmen refrigerado e congelado, uso do sêmen de jumentos para inseminação artificial em jumentas e éguas, assim como linhas de pesquisa visando o comportamento sexual dos mesmos e a dinâmica folicular de jumentas em programas de inseminação artificial e associação com programas de transferência de embriões (PEÑA-ALFARO *et al.*, 2012).

Desta forma a presente revisão tem por objetivo apresentar informações sobre a inseminação artificial em jumentas e sobre aspectos tecnológicos no processamento do sêmen de jumentos. Considerando que existem poucos trabalhos com asininos na área da inseminação artificial, algumas referências com equinos são utilizadas dadas as semelhanças biológicas entre estas espécies da família equidade

## DESENVOLVIMENTO

### Histórico da inseminação artificial nos equídeos

Existem relatos lendários de que a primeira inseminação artificial em equídeos teria acontecido no século XIV, no ano de 1322, em regiões de países árabes, quando teria sido extraído sêmen de um reprodutor equino de tribo inimiga usando chumaço de algodão para inseminar uma égua (KLUG e SIEME 2003), no entanto coube a Lázaro Spalanzani em 1776 relatar as primeiras inseminações em éguas, inspirado em inseminações anteriores com sucesso em cadelas (BRINSCO e VARNER, 1993).

A fins do século XIX diversos pesquisadores na Europa utilizaram a inseminação artificial em equinos (CHELCHOWSKY, 1894; REPIQUET, 1896; IWANOW, 1903; HOFFMANN, 1905). A finalidade era principalmente prevenir a Durina, doença que acometia os equídeos na Europa, nesse período relatado. Considerasse que a inseminação em nível de rebanhos nos animais domésticos foi iniciada na espécie equina na Rússia e posteriormente na China e Japão e países dos Balcãs (BIELANSKY, 1982).

A inseminação artificial em éguas foi intensificada na Rússia depois da primeira guerra existindo registros de mais de 300.000 éguas inseminadas. No final dos anos 50 foram inseminadas na China 600.000 éguas com taxas de gestação de 61%, em Estados Unidos o uso

da inseminação artificial em equídeos avançou com mais de 25 mil éguas inseminadas anualmente. O impulso da inseminação em éguas foi consequência do desenvolvimento das primeiras vaginas artificiais pra coleta de sêmen, por parte da equipe do Prof. Ivanov na Rússia (BRINSCO e VARNER, 1993).

No Brasil, as primeiras informações sobre a inseminação artificial em equídeos foram dadas por Epaminondas de Souza, 1912, Paulo Lima Correia, 1935 e Edelberto Hermsdorff 1940, os quais descreveram a técnica e sugeriram seu uso (SEVERO, 2015).

Em asininos, os primeiros trabalhos envolvendo e a tecnologia do sêmen foram relatados por Polge e Minotakis (1964) e Krause e Grove (1967), os quais testaram gema de ovo e glicerol, assim como adicionando glicose, lactose, rafinose, gema de ovo e glicerol, respectivamente.

As primeiras observações do uso de congelamento de sêmen asinino no Brasil foram realizadas pelo grupo de pesquisa da USP comandado pelo Prof. Rubem Paes de Arruda, com as publicações de Vieira *et al.* (1985) e Arruda *et al.* (1986), os quais congelaram sêmen de jumento da raça Pega em palhetas de 0,5mL e realizaram inseminação intercornual.

O primeiro relato do nascimento de um produto nascido da utilização de sêmen congelado em jumentas foi feito por Oliveira *et al.* (2011) no estado de São Paulo.

Diversos trabalhos têm focado a inseminação artificial em jumentos tanto nos estudos das características biológicas e metabólicas do sêmen como no uso de diluentes no sêmen refrigerado, congelado e vitrificado (ARRUDA *et al.*, 1989; GASTAL, 1991; PEÑA-ALFARO *et al.*, 1999; PAPA *et al.*, 1999; CANISSO, 2008; ROTA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2016; DIAZ *et al.*, 2020).

### **Sincronização da ovulação em jumentas**

Para realizar a inseminação artificial em jumentas pode-se induzir a ovulação de maneira a realizar a inseminação em tempo fixo. Vários protocolos tem sido utilizados tendo como referencial aqueles usados na égua. Peña Alfaro *et al.* (2012), utilizaram 1500 e 2000 UI de HCG. Carlucio *et al.* (2007) compararam o uso de análogo de GnRH (Licerelina e hCG na indução da ovulação em jumentas. Os autores recomendam o uso da análogo de GnRH pela redução da resposta observada no uso repetido do hCG.

Le Chang *et al.* (2019) utilizaram LH e hCG na indução da ovulação de jumentas. A taxa de concepção utilizando sêmen congelado foi maior nos grupos tratados. Os autores observaram que a preparação de LH utilizada continha mais FSH do que a preparação de hCG e suplementar o tratamento de hCG com FSH melhorou significativamente a sincronização da ovulação. Verificaram ainda que as ovulações em jumentas tratadas em dias de chuva foram significativamente adiadas e menos sincronizadas em comparação com aquelas em jumentas tratadas em dias de sol.

### **Técnica da inseminação artificial na jumenta**

O aparelho genital da jumenta apresenta semelhança com o da égua, guardando as devidas diferenças do tamanho entre estas espécies, isto possibilita que o procedimento da técnica da inseminação artificial nas éguas seja utilizado nas jumentas. O material utilizado, a abordagem manual e os cuidados necessários serão os mesmos na inseminação de éguas e jumentas. Antes do procedimento da inseminação artificial devem-se tomar alguns cuidados

com respeito à manipulação do sêmen a ser utilizado, à limpeza ou esterilização do material necessário, a contenção e limpeza da fêmea. (PEÑA- ALFARO *et al.*, 2012).

Fêmeas equídeas destinadas ao uso da técnica de inseminação artificial, necessitam um acompanhamento ultrassonográfico para avaliar tanto a dinâmica folicular como a eco textura uterina, resultantes das modificações do quadro hormonal durante o ciclo estral, especialmente no estro (PEÑA- ALFARO *et al.*, 2012).

Nas fêmeas dos equídeos a deposição do sêmen pode ser realizada utilizando duas técnicas, a primeira chamada de Inseminação por inspeção visual, na qual é utilizado um espelho vaginal equídeo, modelo Polansky, uma pinça cervical que irá fixar a entrada da cérvix e segurada externamente, a pipeta de inseminação é introduzida pela vulva, passando pelo vestíbulo vaginal até alcançar o “portio cervicalis” ou entrada da cérvix e cuidadosamente se faz a introdução até o corpo uterino. Uma vez havendo introduzida a pipeta deve-se fixar à seringa ou recipiente plástico contendo o sêmen ao adaptador de borracha ou silicone da pipeta, (KLUG e SIEME 2003).

A segunda técnica é a mais utilizada na rotina, denominada Inseminação manual, nesta não é utilizado o espelho vaginal nem a pinça de fixação cervical. Se introduz a mão esquerda, devidamente protegida por luva plástica lubrificada, pela vulva, com movimento de avanço da mão de forma delicada, até alcançar a abertura cervical, com o dedo indicador localizasse a mesma e se introduz a pipeta de inseminação, guiada pela mão esquerda no interior da vagina e pela mão direita desde o exterior. Coloca-se a seringa com o sêmen no adaptador colocado na extremidade da pipeta. Deve-se depositar o sêmen no interior do útero no corpo uterino ou na extremidade na união útero tubarica. (BIELANSKY, 1982; BADER e SIEME, 2010). Brinsko e Varner (2003), chamam a atenção para o uso de material de inseminação atóxico, realizar o procedimento com o mínimo de contaminação realizando a limpeza da vulva e região perineal de forma adequada sem deixar resíduos e evitando a introdução de material contaminado no vestíbulo vaginal, pois além da ação espermicida do sabão pode ser irritante para a mucosa interna da vagina. Recomendam ainda a contenção adequada da fêmea.

Para realizar a inseminação na jumenta pode ser utilizado sêmen a fresco ou processado em laboratório, sêmen refrigerado a 5 °C e mantido até 24 horas, sêmen congelado mantido a -196 °C (BADER e SIEME, 2010) ou processado através da técnica da vitrificação (DIAZ JIMENEZ *et al.*, 2020), ainda em fase experimental. Torna-se prudente realizar uma avaliação microscópica de uma alíquota do sêmen a ser inseminado para verificar sua viabilidade.

### **Tecnologia do sêmen de jumentos**

A indústria da inseminação artificial em nível mundial alcançou níveis elevados de efetividade na espécie bovina com o desenvolvimento do congelamento de sêmen, a partir do uso de substância crioprotetores, o glicerol, proposto por Polge *et al.* (1949) citado por Sales (2011), o que provocou uma revolução na inseminação artificial, tecnologia e processamento de sêmen em nível mundial.

O nascimento do primeiro bezerro nascido de sêmen congelado no mundo foi, no ano de 1952 nos Estados Unidos. Nos bovinos, existe um domínio e controle das diversas fases do processamento do sêmen na relação dos espermatozoides com os meios diluentes utilizados e com os procedimentos laboratoriais estabelecidos. As variáveis que interferem na qualidade do

sêmen têm sido na sua maioria controladas de forma progressiva, fruto de décadas de pesquisas nos diversos centros acadêmicos e nas empresas envolvidas no processamento e comercialização do sêmen congelado ao redor do mundo (LONERGAN, 2018).

Por razões zootécnicas, essa realidade não é vista na inseminação artificial e tecnologia de sêmen de equinos e muito menos em asininos. Embora as primeiras inseminações em animais domésticos tenham disso realizadas em equinos em diversos países europeus, usando sêmen a fresco, conforme relata Bielansky (1982), o fator econômico e zootécnico na produção de alimentos, leite, carne e seus derivados, desempenhou importante papel para desenvolvimento e crescimento da inseminação em bovinos.

Em equinos foi obtida a primeira gestação e nascimento de um potro, em Ontario, Canada, no ano de 1956, através do congelamento de espermatozoides retirados do epidídimo por lavagem e diluição em leite integral contendo 10% de glicerol. (BARKER e GANDIER 1957).

A aptidão zootécnica dos equídeos, monta, salto, tração, esporte equestres, pode ser desenvolvida mesmo sem uma atividade reprodutiva satisfatória, além disso a seleção destes por atributos de beleza e tipo racial, não permitiu uma seleção para características reprodutivas satisfatórias em machos e fêmeas (MERKT, 1986).

Durante muitos anos as associações de criação de raças equinas não permitiam o registro de animais oriundos de inseminação artificial, este fato representou um importante fator limitante nos avanços científicos tecnológicos da indústria da inseminação artificial em equídeos (SAMPER, 2009).

A partir do ano 2000, com o registro de animais das raças Quarto de Milha e Paint Horse, oriundos de inseminação artificial e posteriormente no Brasil, com registro de jumentos da raça Pega, a tecnologia de sêmen de equídeos, teve importante avanço científico e econômico (CANISSO *et al.*, 2008).

Cada vez mais são apresentados avanços significativos no desenvolvimento de protocolos, diluentes, procedimentos laboratoriais, visando aumentar os índices de fertilidade do sêmen congelado de asininos (CANISSO, 2008; SALES, 2011).

### **Uso de sêmen refrigerado**

O uso de sêmen jumento, refrigerado e mantido a 5 °C em até 24 horas usando protocolos e diluentes propostos para equinos, tem possibilitado resultado promissor tanto na inseminação de jumentas como de éguas. Já o uso do sêmen congelado de jumentos, somente obteve sucesso comercial, na inseminação de éguas (PEÑA-ALFARO *et al.*, 2012).

No Brasil, a utilização da IA com sêmen refrigerado em equinos é permitida pela maioria das associações de raças, possibilitando, dessa forma, ampliar o uso de garanhões geneticamente superiores (CANISSO, 2008).

Os protocolos adequados na técnica de refrigeração de sêmen de equídeos incluindo entre eles as taxas de refrigeração e de temperatura final de estocagem, são importantes parâmetros para obter sucesso no uso desta técnica (NUNES *et al.*, 2006). Estes autores ainda consideram que o acompanhamento do ciclo estral da égua é de grande importância para estabelecer o momento adequado da inseminação. O transporte do sêmen é outro aspecto a ser considerado, além de o estabelecimento de volume e concentração da dose inseminante

adequados na busca de obter boas taxas de prenhez, estas observações devem ser aplicadas também aos asininos.

O uso da inseminação artificial em equídeos possibilitou um aumento considerável na venda de sêmen de reprodutores considerados de valor zootécnico, assim como insumos e material da indústria equestre, alimentos, medicamentos, produtos para o manejo dos animais entre outros (CANISSO, 2008)

Ferreira (1993) ao inseminar éguas com sêmen asinino fresco diluído ou resfriado a 5 °C por 24 ou 48 horas, obteve taxas de gestação de 82,7% (23/29), 80% (24/30) e 75,9% (22/29), respectivamente, sendo utilizadas doses inseminantes contendo  $250 \times 10^6$  espermatozoides móveis.

Outra alternativa no uso de sêmen de asinino é através da refrigeração, em equinos essa tecnologia se mostra bastante consolidada. A técnica consiste em, após a colheita, o sêmen deve ser diluído em diluente específico para refrigeração e gradualmente ser refrigerado em temperaturas de 5 a 8° C, podendo ser transportado e usado entre 12 a 36 horas (SAMPER, 2009).

Observando os efeitos das temperaturas de armazenamento e os diluentes usando em refrigeração de jumentos (COTTORIELLO *et al.*, 2002), observou que a temperatura de 5 °C é a temperatura ideal para refrigeração de sêmen asinino. Para tanto é necessário realizar uma curva de refrigeração adequada para o sucesso da técnica. As taxas de refrigeração em torno de -0,6 e -1,0 °C/min são as ideias para o uso de sêmen asinino refrigerado (SANTOS *et al.*, 1995).

Outro ponto fundamental no sucesso da técnica de refrigeração são os diluentes, usando diluentes comercial INRA96®, INRA 82 e INRA82 adicionado de gema de ovo a 2%, o grupo acrescido de gema de ovo apresentou os melhores resultados (ROTA *et al.*, 2008).

Contri *et al.* (2010) realizando trabalhos com a raça Martina Franca usando dois diferentes diluentes comerciais INRA96 (INRA – IMV Technologies, L’Aigle, France) e E-Z Mixin BF (Animal Reproduction Systems, Chino, CA, USA). Nesse estudo foi observado que os diluentes usados podem manter por até 48 horas com boa viabilidade espermática.

Os diluentes à base da gema de ovo mostram uma grande capacidade de preservar as células espermáticas Zhang *et al.* (2018) observando as concentrações de gema de ovo em sêmen refrigerado de jumentos, nas contrações de 0%, 0,5%,1,0%, 1,5%, 2,0% e 2,5% em amostras submetidas a temperatura de 4 °C por 24 horas. Foi observado que a contração de 1,0% de gema de ovo apresentou maior motilidade total permanecendo até 96 horas.

Estudos mais recentes vêm tentando demonstrar a eficiência da estimulação com irradiação de luz vermelha. A irradiação por luz vermelha observou uma melhora na função mitocondrial dos espermatozoides. Catalán (2020) e colaboradores realizaram tratamentos com protocolos de exposição de irradiação de luz vermelha. Nesse trabalho foi observado que a irradiação com luz vermelha, de 1 a 4 minutos, em sêmen de jumento refrigerado em 4 °C por 24 horas melhorou os parâmetros espermáticos como motilidade total e progressiva nas amostras de sêmen, quando submetido a 4min de tratamentos de luzes foi observado um aumento na atividade mitocondrial, sendo essa técnica uma ótima alternativa tanto para amostras de sêmen fresco como refrigerado.

## **Sêmen congelado**

A tecnologia do sêmen congelado nos equídeos exige a utilização de protocolos adequado e cuidados, que devem ser tomados, incluindo a qualidade do sêmen, individualidade do reprodutor, as taxas de diluição e curvas de refrigeração (MONTEIRO, 2020).

Após o processo de colheita do sêmen, remoção da porção gel e avaliações laboratoriais, as amostras recebem um diluidor de refrigeração. Esses diluentes são a base de leite desnatado e açúcares, outros diluentes usados na pré-congelação são a base de sacarose a 11% (PIAO *et al.*, 1988), solução com ringer lactato adicionado de leite em pó desnatado e glicose (MIRÓ *et al.*, 2005) e solução glicose-EDTA (MARTIN *et al.*, 1979). A diluição deve ser realizada em duas etapas, no qual é adicionado um diluidor primário, geralmente um diluente de refrigeração, com o objetivo de realizar a centrifugação, e posteriormente a adição de um segundo diluidor de congelação, esse tem por objetivo proteger as células espermáticas dos efeitos criogênicos. Ainda não existe um diluidor, padronizado, que tenha uma perfeita aceitação como a utilizada na espécie bovina (BADER e SIEME, 2010).

Os diluentes de congelação são compostos basicamente por uma fonte de energia (açúcares), uma fonte de lipoproteínas (gema de ovo, leite ou ambos combinados), antibióticos, com o intuito de inibir o crescimento bacteriano e evitar possíveis infecções uterinas, e tampões para equilibrar o pH e a Pressão osmótica (BADER e SIEME, 2010).

Um dos pontos críticos na criopreservação de sêmen em equídeos é o processo de congelação, devido a uma série de fatores nocivos para a célula espermática. Mudanças radicais de temperatura, estresse osmótico, exposição à agentes tóxicos e formação de cristais de gelo intracelular são as causas mais frequentes para esta criticidade (WATSON, 2000; MARSHBURN *et al.*, 1992; BLACH *et al.*, 1989). Além do mais, o sêmen congelado desencadeia uma reação inflamatória mais acentuada no útero do que o sêmen fresco (KOTILAINEN *et al.*, 1994).

Essas condições afetam diretamente a funcionalidade e a viabilidade das células espermáticas, levando à diminuição da longevidade e viabilidade no trato reprodutor feminino (ROTA *et al.*, 2012). Além do mais, o sêmen congelado desencadeia uma reação inflamatória mais acentuada no útero do que o sêmen *in natura*.

Em asininos, os primeiros trabalhos envolvendo e a tecnologia do sêmen foram relatados por Polge e Minotakis (1964) e Krause e Grove (1967), os quais testaram gema de ovo e glicerol, assim como adicionando glicose, lactose, rafinose, gema de ovo e glicerol, respectivamente.

No Brasil, os primeiros trabalhos no congelamento de sêmen de asininos foram realizados por Vieira *et al.* (1985) e Arruda *et al.* (1986) usando diluidor à base de lactose acrescido de gema de ovo e EDTA e 300 a 400 x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, foi obtida taxa de prenhez de 66,7% e 44%, respectivamente.

Trimeche *et al.* (1998) na França inseminaram jumentas da raça Poitou, com sêmen congelado de jumento, contendo 600x10<sup>6</sup> de espermatozoides, envasado em palhetas de 0,5mL, motilidade progressiva mínima de 35% após o descongelamento e fertilidade de 38% de gestação. Jepsen *et al.* (2010), utilizaram dose inseminante de 300x10<sup>6</sup> espermatozoides móveis, para inseminar com o sêmen congelado de jumento a base de diluentes com gema de ovo e etilenoglicol. As inseminações foram realizadas de seis horas pré ovulação até seis horas pós-ovulação. A taxas de gestação foi até 58,3%,

Ferrante *et al.* (2018) testaram a ação dos diluentes a base de leite desnatado, com 7% de dimetilsulfóxido (DMSO), 11% de lactose, 0,5% Equex e 20% de gema de ovo centrifugada. Esse estudo demonstrou que é possível congelar sêmen de jumento com 7% de dimetilsulfóxido (DMSO) e que a gema de ovo a 3,2% mostrou resultados benéficos nas amostras centrifugadas.

Para o sucesso na técnica de congelação é de extrema importância a refrigeração lenta e gradual das amostras de sêmen, normalmente, essas amostras irão reduzir da temperatura ambiente até 5 °C, (redução de 0,1 °C por minuto; SIEME, 2007; VIDAMENT *et al.*, 2000). O espermatozoide pode suportar uma taxa de refrigeração rápida, partindo de temperaturas de 37 a 20 °C, mas é interessante manter uma redução progressiva da temperatura, podendo ser essa mais lenta entre 20 a 5 °C.

Novos protocolos de refrigeração usando diluidores comerciais (Botu-Crio™) que contém uma mistura de dois crioprotetores penetrantes (1% de glicerol e 4% de metilformamida) têm sido usados com sucesso na rotina de congelação de sêmen de garanhão. Com a utilização desse diluente pode ser realizada a curva de refrigeração mais rápida, usando uma taxa de refrigeração por 20 minutos até os 5 °C, em refrigerador doméstico. As amostras são levadas a vapor de nitrogênio líquido (3 a 6cm de nível de nitrogênio), por 15 a 20 minutos, atingindo a temperatura final de -60 a -80 °C o processo é finalizado quando atingir a temperatura de -120 °C e armazenadas em botijão criogênico (PAPA *et al.*, 2008).

Outro sistema efetivo e pragmático usado na congelação de sêmen de equídeos é o método automatizado (TK Tecnologia em Congelação, Brasil). Nesse sistema é usada uma curva de refrigeração de -15 °C por minutos até os 5 °C e -10 °C por minuto até os -40 °C, finalizando o processo com a taxa de -10 °C até atingir os -140 °C (DIAS MAZIERO *et al.*, 2013). Em jumentos foram realizados estudos observando taxas de refrigeração de 0,3 °C, 541 0,5 °C e 0,6 °C por minuto, nesses trabalhos não foram observadas diferenças nos parâmetros seminais, concluindo que essas taxas de refrigeração podem ser usadas em sêmen de jumento (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Em trabalhos realizados por Rota *et al.* (2012) e Ferrante *et al.* (2018) foi observado que a curva rápida (4 °C por minuto) é a mais indicada para a espécie asinina.

MONTEIRO (2020) comparou a separação do plasma seminal de jumentos pelo método da filtração e pela centrifugação, comparando ainda o método manual e automatizado do congelamento do sêmen, concluindo que para remoção do plasma seminal, a centrifugação é um processo mais rápido, eficaz e seguro, processa grande número de amostras de sêmen em curto período de tempo, e é eficaz desde que seja realizada na rotação correta. A filtração não é uma técnica viável para remoção do plasma seminal de jumentos. O método de criopreservação automatizado é o indicado para espécie asinina, no entanto sugere que sistema convencional pode ser uma alternativa para a congelação de sêmen asinino, desde que seja realizada curva de congelação rápida nas condições das propriedades.

### **Sêmen vitrificado**

A vitrificação é um método de criopreservação proposto recentemente para preservação de espermatozoides, como forma alternativa ao método convencional de congelamento de sêmen de jumento, uma vez que tem sido sugerido que os resultados baixos na inseminação de jumentas, seja motivado pela presença de glicerol (TRIMECHE *et al.*, 1998).

A técnica de vitrificação utilizada em espermatozoides difere daquela empregada em embriões e ovócitos, a qual contém alta concentração de crioprotetores permeáveis e tanto o meio intra celular e extra celular devem ser vitrificados. Essa técnica é chamada de Vitrificação Cinética por exigir altas taxas de resfriamento e aquecimento, mas evitando o uso de Crioprotetores permeáveis, o meio extracelular não será vitrificado. O protocolo de aquecimento comumente empregado após a vitrificação do esperma no método de duas palhetas consiste na imersão da palheta em 2–5mL de diluente de sêmen pré-aquecido (37-43 °C) e então centrifugado. Este procedimento foi descrito pela primeira vez por *Sanchez et al.* (2012) citado por *Diaz-Jimenez et al.* (2020), a qualidade de esperma foi satisfatória após a vitrificação.

O procedimento de aquecimento é uma das principais desvantagens deste método de vitrificação, pois pode ser caro e demorado. Para uma única inseminação em equinos, uma grande quantidade de diluente de aquecimento seria necessários e um grande número de palhetas descongeladas, que devem ser centrifugados separadamente após o aquecimento. Durante o último ano, o processo de vitrificação do esperma foi otimizado em jumentos em relação à concentração, volume e embalagem do esperma e diferentes taxas de aquecimento foram testado para vitrificação em grandes volumes (0,5mL) (*DIAZ-JIMENEZ et al.*, 2021).

*Diaz-Jimenez et al.* (2020) obtiveram um percentual de 22% de gestações no uso da técnica de semen vitrificação e inseminado em jumentas, houve uma menor resposta inflamatória do útero no uso da técnica ao comparar com o uso de semen congelado convencional. Sugerem que esta técnica pode ser promissora no uso na inseminação artificial em jumentas com semen criopreservado.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A demanda econômica e social da presença do jumento na realidade do Brasil, principalmente no Nordeste do país, impõe maior atenção à exploração zootécnica dos mesmo e a adoção de tecnologias produtivas e reprodutivas que possibilitem sua maior utilização na indústria alimentar, farmacêutica, industrial da cosmetologia e de comercio exterior. O uso mais intensivo da inseminação artificial possibilita o melhoramento genético e o aumento da produtividade dos asininos com repercussão econômica e social. Por outro lado, o domínio tecnológico dos procedimentos na conservação de germoplasma possibilitaram contribuir com a preservação na ameaça de extinção. Mais estudos sobre o uso do semen congelado em jumentas tornasse necessário, para possibilitar o domínio tecnológico da mesma e obter resultados satisfatórios.

## BIBLIOGRAFIA

- ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; MANZANO, A. Inseminação artificial de eqüídeos com sêmen congelado em palhetas de 0,5 mL. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Cuiabá, MT: Universidade Federal de Mato Grosso, p.181, 1986.
- BADER, H.; SIEME, H. Inseminação artificial de la yegua. In: BUSCH, W.; WABERSKY, D. Manual de Inseminação Artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica. 1ª ed., Acribia, p.257-297,2010.

BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididimal spermatozoa. *Canadian Comparative Medicine Veterinary Science*, v.21, n.2, p.47-51, 1957.

BIELANSKI, W. Künstliche Besamung beim Pferd. In: BUSCH, W.; LÖHLE, K.; PETER, W. Künstliche Besamung beim Nutztieren. Stuttgart: 1<sup>a</sup> ed., Enke, p.464-490, 1982.

BLACH, E.L.; AMANN, R.P.; BOWEN, R.A.; BOWEN, D. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristic. *Theriogenology*, v.58, n.58, p.99-104, 1989.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination. In Mc. KINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine Reproduction*. 1<sup>a</sup> ed., Lea & Fabiger, p.790-797, 1993

CANISSO, F.C.; SOUZA, F.A.; KE, 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. *Ciência. Veterinária nos Trópicos, Recife*, v.11, n.2/3, p.57-64, 2008

CARLUCCIO, A.; PANZANI, S.; TOSI, U.; FAUSTINI, M.; DE AMICIS, I.; VERONESI, M.C. Efficacy of hCG and GnRH for inducing ovulation in the jenny. *Theriogenology*, v.68, n.6, p.914-919, 2007.

CATALÁN, J.; PAPAS, M.; TRUJILLO-ROJAS, L.; BLANCO-PRIETO, O.; BONILLA-CORREAL, S.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; YESTE, M. Red LED light acts on the mitochondrial electron chain of donkey sperm and its effects depend on the time of exposure to light. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.8, p.15-26, 2020.

CONTRI, A.; DE AMICIS, I.; VERONESI, M. C.; FAUSTINI, M.; ROBBE, D.; CARLUCCIO, A. Efficiency of different extenders on cooled semen collected during long and short day length seasons in Martina Franca donkey. *Animal reproduction science*, v.120, n.4, p.136-141, 2010.

COTTORELLO, A.C.P.; AMANCIO, R.C.; HENRY, M.; BORGES, I. Effect of storage temperature and extenders on 'in vitro' activity of donkey spermatozoa. *Theriogenology*, v.88, n.2/4, p.325-328, 2002.

DIAS MAZIERO, R.R.; NASCIMENTO, G.P.; MONTEIRO, G.A.; AVANZI, B.R.; HARTWIG, F.P.; LISBOA, F.P.; MARTIN, I. Evaluation of Sperm Kinetics and Plasma Membrane Integrity of Frozen Equine Semen in Different Storage Volumes and Freezing Conditions. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, n.3, p.165-168, 2013.

DIAZ-JIMENEZ, M.; ROTA, A.; DORADO, J.; CONSUEGRA, C.; PEREIRA, B.; CAMILLO, F.; HIDALGO, M. First pregnancies in jennies with vitrified donkey semen using a new warming method. *Animal*, v.15, n.1, p.97-100, 2021.

FERRANTE, A.; CASTEX, C. B.; BRUNO, S.; ARRAZTOA, C.; PLAZA, J.; NEILD, D.; MIRAGAYA, M. Comparison of whole and centrifuged egg yolk added to Kenney's and lactose-EDTA extenders for donkey semen cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.65, p.12-18, 2018.

FERREIRA, M.F.L. Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e fertilidade do sêmen de jumento (*Equus asinus*). 1993. 94p. (Dissertação de Mestrado em

Medicina Veterinária). Programa de Pós graduação em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.

GASTAL, M.M.O. Estudo do comportamento sexual e características seminais de asininos. 1991. 101p. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Programa de Pós graduação em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1991.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agro, 2017. Disponível em: <[https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo\\_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75642](https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75642)>. Acesso em: 20 nov. 2020.

JEPSEN, R.J.; EVANS, L.E.; YOUNGS, C.R. Use of direct thaw insemination to establish pregnancies with frozen: thawed semen from a standard jack. *Journal Equine Veterinary Science*, v.30, n11, p.651-656, 2010.

KLUG, E.; SIEME, H. *Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis*. 5ª ed., M. & H. Schaper-Hannover, 2003. 148p.

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, v.41, n.8, p.629–636, 1994.

KRAUSE, D.; GROVE, D. Deep-freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.14, n.1, p.139-141, 1967.

LONERGAN, P. Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*, v.12, n.1, p4-18, 2018.

MARSHBURN, P.B; MCINTIRE, D.; CARR, B.R.; BYRD, W. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertility and Sterility*, v.58, n.1, p.179–186, 1992.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*, supl.27, p.47-51, 1979.

MERKT, H. Exame andrológico e problemas de cobertura no garanhão. Esquema para o exame andrológico. In: Encontro Nacional de Equideo cultura, 4, 1986, São Paulo, SP. Anais... São Paulo: Sociedade Brasileira de Hipologia, p.33–34, 1986.

MIRÓ, J.; LOBO, V.; QUINTERO-MORENO, A.; MEDRANO, A.; PEÑA, A.; RIGAU, T. Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology*, v.63, n.6, p.1706-1716, 2005.

MIRÓ, J.; VILÉS, K.; GARCÍA, W.; JORDANA, J; YESTE, M. Effect of donkey seminal plasma on sperm movement and sperm - polymorphonuclear neutrophils attachment in vitro. *Animal Reproduction Science*, v.140, n.1, p.164-172. 2013.

MONTEIRO, R.A. Avaliação das práticas de criopreservação sobre espermatozoides de jumento (*equus asinus*).2020. p.74 (Dissertação de Mestrado em Ciência Animal). Programa de Pós graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, 2020.

NUNES, D.B.; ZÚCCARI, C.E.S.N.; COSTA e SILVA, E.V. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.30, n.1/2, p.42-56, 2006.

OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, P.V.L.F.; OÑA, C.M.M.E; GUAISTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; SANCLER SILVA, Y.F.R.; PAPA, F.O. Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. *Theriogenology*, v.85, n.7, p.1267–1273, 2016.

OLIVEIRA, J.V.; SCHMIDEK, A.; PAPA, F.O. Nascimento do primeiro jumento gerado através de sêmen congelado. *Pesquisa & Tecnologia*, v.8, n.2, p.35-38, 2011.

PAPA, F.O.; MEIRA, C.; SIMON, J.J.; FERREIRA, J.C.P.; DELL’AQUA JR, J.A.; LEME, D.P. Pregnancies in mare using donkey (*Equus asinus*) frozen semen. *Arquivo Faculdade Veterinária*, v.27, n.1, p.262-267, 1999.

PAPA F.O; ZAHN F.S.; DELL’ÁQUA JÚNIOR J.A; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP 50 para a criopreservação de sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.26, n.4, p.184-187, 2002.

PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.G.; DELL’AQUA JR, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, v.107, n.3/4, p.293–301, 2008.

PEÑA-ALFARO, C.E.; AZEVEDO NETO, J.; TORRES, V.L.L.; SOUZA, N.L.; LIMA, S.M. Parâmetros seminais em jumentos nordestinos criados no semi-árido da Paraíba. In: 26º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1999, Campo Grande. *Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, 1999.

PEÑA-ALFARO, C.E.; SOUZA, N.L.; BARROS, L.O.; VITORINO, P.V; MAXIMO, V.T.; SILVA da, A.G.P.F.; OLIVEIRA, A.A; de GALVÃO, F.A. BRITTO, R. B. Fisiologia e biotecnologia da reprodução de asininos. *Ciência Animal*, v.22, n.1, p.207-218, 2012.

PIAO, S.; WANG, Y.; CHENG, Y. A study of the technique of freezing concentrated semen of horses (donkeys) and the aspect of insemination. In: XI ICAR Meeting. Dublin: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1988.

POLGE, C.; MINOTAKIS, C. Deep freezing of jackass and stallion semen. In: V ICAR Meeting. Trento: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. p.545-552, 1964.

POLIDORI, P.; BEGHELLI, D.; MARIANI, P.; VINCENZETTI, S. Donkey milk production: State of the art. *Italian Journal of Animal Science*, v.8: supl.2, p.677-683, 2009.

ROTA, A.; PANZANI, D.; SABATINI, C.; CAMILLO, F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*, v.78, n.8, p.1846–1854, 2012.

ROTA, A.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiata donkey spermatozoa. *Theriogenology*, v.69, n.2, p.176–185, 2008.

ROTA, A.; SABATINI, C.; PRZYBYŁ, A.; CIARAMELLI, A.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Post-thaw Addition of Caffeine and/or Pentoxifylline Affect Differently Motility of Horse and Donkey-Cryopreserved Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.75, n.6 p.41–47, 2019.

SALES, A.L.R. Criopreservação do sêmen asinino coletado de forma fracionada e envasado em “FlatPacks” ou palhetas de 0,55mL: características espermáticas e taxa de gestação de éguas com ovulação. 2011. 216p. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Programa de Pós graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2011.

SAMPER, J. Artificial Insemination with Fresh and Cooled Semen. In: *EQUINE Semen Preservation*. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.65, n.1, p.19–24, 2009.

SANTOS G.F. Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre características físicas e morfológicas dos espermatozoides de jumentos (*Equus asinus*) preservados a 5 °C. 1994. 82p. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Programa de Pós graduação em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.

SEVERO, N.C. História da inseminação artificial no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte, v.39, n.1, p.17-21, 2015.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology*, v.50, n.5, p.793–806, 1998.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22 °C instead of 4 °C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, n.6, p.907–919, 2000.

VIEIRA, R.C.; ARRUDA, R.P.; MANZANO, A. Inseminação intercornual de equídeos com sêmen congelado em palhetas de 0,5 mL. *Anais XXII Reunião da SBZ*. Balneário Camboriu, SC: SBZ. Anais...1985.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60/61, p.481–492, 2000.

ZHANG, H.; YE, H.; SHAO, Y.; WU, S.; YU, J.; JI, C.; ZENG, S. The Effects of Egg Yolk Concentration and Particle Size on Donkey. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.65, n.6, p.19-24, 2018.