

BIOLOGIA REPRODUTIVA DE JUMENTOS. III. pH, OSMOLALIDADE E NÍVEIS DE ELETRÓLITOS NO SÊMEN*

REPRODUCTIVE BIOLOGY OF DONKEY. III. pH, OSMOLALITY AND ELETROLYTES CONCENTRATION OF THE SEMEN

Rosana Nogueira de MORAIS¹; Raul Gastão MUCCILO²; Wilson Gonçalves VIANA³

RESUMO

Amostras de sêmen e plasma seminal de seis jumentos da raça Pêga foram analisadas para determinação do pH (n=70), osmolalidade (n=69) e níveis de Na (n=49), K (n=51), Ca (n=51) e Mg (n=51). Os valores de pH variaram de 7,0 a 7,8 com uma média de $7,29 \pm 0,18$ para o total de ejaculados. A osmolalidade do plasma seminal oscilou entre 273 e 373 mOsm tendo como média global o valor de $302,89 \pm 15,03$ mOsm, o que corresponde a um ponto crioscópico de $-0,56^\circ\text{C}$. As concentrações média de Na, K, Ca e Mg foram, respectivamente, $238,26 \pm 67,92$, $105,20 \pm 32,14$, $13,24 \pm 1,62$ e $1,54 \pm 0,10$ mg para cada 100 ml de plasma seminal. Os resultados obtidos no presente estudo foram confrontados com dados publicados relativos a jumentos e garanhões, sendo em geral muito próximos. A exceção foram os níveis de Mg que se mostraram relativamente baixos nos animais por nós encaminhados. Pela semelhança existente entre as características seminais de asininos e eqüinos, acredita-se que os métodos utilizados para a congelação de sêmen eqüino possam, em princípio, ser utilizados para o sêmen de jumentos. A confirmação desta hipótese fica na dependência de estudos complementares.

UNITERMOS: Jumentos; Reprodução; Sêmen; pH; Pressão osmótica; Eletrólitos

INTRODUÇÃO E LITERATURA

O efeito deletério do plasma seminal na conservação do sêmen eqüino "in vitro" é reconhecido e descrito por vários autores^{2, 5, 15, 20, 27, 32}. Deste modo, para a congelação de sêmen usa-se separar o plasma seminal e substituí-lo por um diluente que seja compatível com as células espermáticas e, ao mesmo tempo, livre de efeitos tóxicos. No entanto, para a definição de um diluidor ideal torna-se necessário o conhecimento das características fisiológicas do plasma seminal a fim de conservar seus fatores benéficos. Nestes aspectos incluem-se muitas variáveis, dentre as quais algumas determinantes como o pH, osmolalidade e níveis de eletrólitos.

A concentração de íons hidrogênio (pH) no sêmen é, indubitavelmente, um dos fatores que mais afetam a motilidade, viabilidade e metabolismo dos espermatozoides nas várias espécies^{6, 14, 28}. O pH ácido inibe o metabolismo, enquanto o alcalino, ao contrário, o estimula. De modo geral, as amostras de sêmen tendem a neutralidade, apesar dos espermatozoides de mamíferos apresentarem grande resistência às variações hidrogeniônicas¹⁴. A excessiva alcalinidade inicial do sêmen pode estar associada à baixa fertilidade do reprodutor, indicando, muitas vezes, baixa concentração

espermática ou um quadro de contaminação bacteriana do ejaculado^{5, 28}.

A faixa de variação de pH mais comumente encontrada para o sêmen de garanhões está entre 6,2 e 7,8, com prevalência de $\text{pH} = 7,5$ ^{18, 23, 24, 27, 31}, sendo um parâmetro relativamente constante. Com base nesse conhecimento, o pH dos diluidores utilizados na conservação de sêmen eqüino deveria ser ajustado, através de diferentes substâncias tampão, para a faixa de 6,9 a 7,2⁵. Para jumentos prevalecem basicamente os mesmos valores encontrados para garanhões, sendo também uma característica seminal bastante constante. As médias obtidas por diversos autores oscilam entre $\text{pH} 7,0$ a $\text{pH} 7,7$ ^{4, 7, 8, 9, 11, 19}.

Outro fator de suma importância para obtenção de bons resultados a partir das técnicas de preservação de sêmen é o conhecimento da osmolalidade do plasma seminal, uma vez que os espermatozoides sobrevivem melhor quando diluídos em soluções fisiológicas com osmolalidade próxima à do sêmen²⁸.

1 - Professor Assistente - Universidade Federal do Paraná

2 - Professor Associado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

3 - Professor Doutor - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

* Projeto financiado pela FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

A determinação da osmolalidade de um fluido biológico pode ser realizada através de várias técnicas, porém, a medida do ponto de congelamento (crioscopia) é a técnica de eleição para a maioria dos autores devido à sua simplicidade de execução e repetibilidade e precisão de resultados^{14, 28, 33}.

Em garanhões, os resultados obtidos são bastante semelhantes entre si, variando desde 290 mOsm até 333 mOsm, o que corresponde a pontos crioscópicos entre -0,50°C e -0,62°C^{18, 24, 26, 27, 30, 34}, enquanto que em jumentos variam de 301 a 333 mOsm, correspondendo a pontos crioscópicos de -0,56°C e -0,62°C, respectivamente¹⁹. Com base nestes dados, acredita-se que a pressão osmótica de um diluidor para a congelação do sêmen de jumento deve ser próxima ou ligeiramente superior à do plasma seminal, ou seja, entre 300 e 330 mOsm^{20, 27}.

Um terceiro aspecto importante a ser avaliado são os níveis de eletrólitos presentes no plasma seminal. De modo geral, cátions mais abundantes no sêmen das espécies domésticas são o sódio (Na) e o potássio (K), com menores concentrações de cálcio (Ca) e magnésio (Mg). A função desses íons está relacionada basicamente com a manutenção do equilíbrio osmótico e motilidade espermática^{14, 28}. O Na e o K são os mais importantes na manutenção da pressão osmótica e, normalmente, apresentam correlação negativa entre si, sendo difícil estabelecer-se a função de um, independente do outro.

Ao se avaliarem os efeitos, em conjunto, do pH, da pressão osmótica e dos níveis de Ca e K sobre o metabolismo aeróbico de espermatozoides bovinos, as menores taxas de atividade, dadas pelo índice frutolítico e produção de ácidos lácticos, coincidiram com os valores mais baixos de pH e de pressão osmótica e altos níveis de K. O Ca não apresentou nenhum efeito marcante sobre o metabolismo espermático, mas eliminou virtualmente todos os efeitos inibitórios dos elevados níveis de K⁶. O fluido epididimário, comparativamente ao plasma seminal, apresenta proporção Na/K bastante baixa, em decorrência de altas concentrações de K. Tal fato atua como inibidor natural da atividade metabólica excessiva dos espermatozoides, determinando um estado de quiescência celular, que, permite maior tempo de sobrevivência para as células espermáticas durante sua passagem pelo epidídimo. O aumento da proporção Na/K, juntamente com a inibição do K pelo Ca, à nível de ejaculado estão implicados com aquisição de motilidade pelos espermatozoides¹⁴.

Em eqüinos, os níveis de Na, K, Ca e Cl contribuem em 92% para a pressão osmótica do sêmen e níveis elevados de Na são prejudiciais à conservação do ejaculado¹². Com base nestes dados avaliou-se o efeito da variação da taxa Na/K no diluidor HS20¹⁷ sobre a conservação de espermatozoides eqüinos

resfriados ou congelados, obtendo-se melhora de 4 a 7% na motilidade quando a proporção Na/K foi reduzida de 10,32 para 3,5. Concluiu-se que os diluentes muito ricos em Na poderiam levar a um esgotamento das reservas enzimáticas ou energéticas, ou ainda, a uma entrada massiva de íons Na na célula, destruindo seu equilíbrio iônico⁷.

A concentração dos principais íons presentes no plasma seminal de garanhões foi determinada por diversos autores. Os níveis de Na variam de 220 a 285 mg%^{1, 12, 13, 21, 29, 34}, sendo relativamente constantes. Com relação aos demais eletrólitos, existe maior variabilidade entre os resultados.

A concentração de K varia desde 55mg % até 103 mg% , e a de Ca de 9,74 até 29,3 mg%^{1, 13, 21, 29, 34}. O íon de menor concentração entre aqueles estudados é o Mg, que está presente na quantidade de 4,2 até 9 mg em cada 100 ml de plasma seminal^{16, 21, 29, 34}.

Em jumentos, o único dado concernente ao nível de eletrólitos no plasma seminal foi apresentado por MANN et al.¹³ (1963), com uma média de 743,5 mg % para a concentração de NaCl, o que equivale, aproximadamente, a níveis de 292 mg % de Na, no mesmo material.

MATERIAL E MÉTODO

ANIMAIS

Foram utilizados seis (6) jumentos da raça Pêga, pertencentes a três propriedades rurais do Município de São Carlos - SP, os quais foram designados por letras de A a F. A altura e peso médios foram de 1,30m e 400 kg, respectivamente, e a idade de cada um no início do experimento era de 4 (A), 6 (B), 6 (C), 8 (D), 9 (E) e 3 (F) anos. Todos foram submetidos previamente a exame clínico e andrológico, tendo sido considerados aptos para o experimento. Durante todo o período experimental, de outubro de 1988 a abril de 1989, os animais foram mantidos em piquetes individuais, com livre acesso a baias, recebendo ração e suplementação mineral balanceadas, com água à vontade.

COLHEITA DE SÊMEN

A técnica de colheita foi realizada de acordo com PICKETT et al.²⁵ (1987), sendo utilizada vagina artificial modelo tipo Colorado. Como manequim foram utilizadas éguas em cio natural e, apenas para o jumento C, foram utilizadas jumentas em cio por se tratar de um reprodutor não habituado a realizar coberturas em éguas.

Após a colheita, o sêmen foi levado imediatamente ao laboratório para ser analisado.

pH DO SÊMEN

O pH de cada ejaculado foi determinado através do pHmetro** com eletrodo de vidro combinado***, devidamente calibrado com as soluções tampão para pH=4,0 e pH=7,0. Foram feitas duas leituras de cada amostra e registrada a média das mesmas.

OSMOLALIDADE DO PLASMA SEMINAL

Uma alíquota de sêmen foi centrifugada a 1800 x g durante 15 minutos para a obtenção do plasma seminal a ser utilizado na determinação da osmolalidade (5 a 6 ml). As amostras, obtidas em duplicata, foram devidamente identificadas e mantidas a -20°C até serem analisadas.

A osmolalidade foi determinada através da medida do ponto de congelamento de cada amostra em crioscópio eletrônico digital****. Para se chegar ao valor da osmolalidade (O) expressa em mOsm, partiu-se do princípio que 1 mol de uma substância não eletrolítica, adicionada a 1kg de água (solução molar) abaixa o ponto de congelamento em 1,86°C (constante de depressão do ponto de congelamento molar)³³. Deste modo utilizou-se a seguinte equação :

$O = \Delta / 1,86 \times 10^3$ mOsm, onde Δ = ponto crioscópico da amostra em °C

NÍVEIS DE ELETRÓLITOS NO PLASMA SEMINAL

As concentrações de sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram determinadas nas duplicatas disponíveis da amostra de plasma seminal obtidas para avaliação da osmolalidade (OSMOLALIDADE DO PLASMA SEMINAL) para o Ca, K e Mg, foram analisadas 51 amostras, enquanto que para o Na, apenas 49 amostras.

As dosagens de Na, Ca e K foram realizadas através de espectrofotometria de emissão atômica*****, sendo que para o Na foi utilizado o método de adição de padrão, enquanto que para o K e Ca seguiram-se os princípios básicos da técnica³ com uso de soluções padronizadas. Já para o Mg as dosagens foram feitas em espectrofotômetro de absorção atômica*****, seguindo as normas de uso do aparelho.

ANÁLISE ESTATÍSTICA - Foram efetuados os cálculos da média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação dos resultados obtidos para cada variável estudada, por reprodutor e para o total de amostras.

Para o estudo da correlação entre as variáveis foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson e os níveis de significância dos mesmos, utilizando-se o pacote estatístico SPSS-PC+*****.

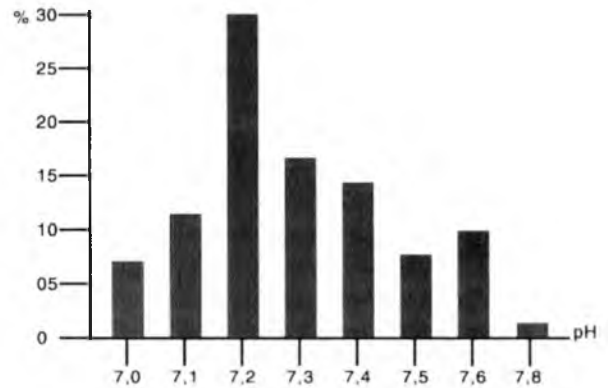


FIGURA 1

Porcentagem de ocorrência dos valores de pH no ejaculado de jumentos (n=70). São Carlos - SP, 1988/89.

RESULTADOS

pH

As médias obtidas para o pH dos ejaculados, tanto global como para cada reprodutor, estão demonstradas na Tab.1, incluindo os valores máximos e mínimos. A diferença entre as amostras foi muito pequena, com um coeficiente de variação de apenas 2%. O valor 7,2 foi o que ocorreu com maior frequência (30%) como se pode observar na Fig.1.

OSMOLALIDADE

A média obtida para o ponto crioscópico das 69 amostras analisadas foi $-0,562 \pm 0,028$ °C, variando de $-0,507$ a $-0,694$ °C. O coeficiente de variação entre as amostras foi bastante baixo (4%).

Na Tab.2 encontram-se os valores médios da osmolalidade do plasma seminal para cada reprodutor e para o total de amostras analisadas.

NÍVEIS DE ELETRÓLITOS NO PLASMA SEMINAL

As concentrações médias de Na, K, Ca e Mg, expressas em mg/100 ml, estão contidas na Tab.3. Os coeficientes de variação entre as amostras foram baixos, oscilando entre 6%, para o Mg e 30%, para o K.

** pH-meter E-520 - METROHM

*** MICRONAL

**** Crioscópio 312 L-LAKTRON - Londrina - PR

***** Fotômetro de chama EEL - modelo 100 - Corning Brasil Ltda.

***** Modelo 403 - PERKIN - ELMER

***** Statistical Package for Social Science (SPSS - PC +). Chicago, SPSS Inc., 1988

TABELA 1

Média (\bar{x}) e desvio padrão (DP) do pH do ejaculado de jumentos, incluindo os valores máximos e mínimos. São Carlos - SP, 1988/89.

Jumentos	n	\bar{x}	DP	Máximo	Mínimo
A	14	7,26 ^a	0,17	7,6	7,0
B	14	7,21 ^a	0,17	7,6	7,0
C	15	7,39 ^a	0,22	7,8	7,0
D	06	7,36 ^a	0,19	7,6	7,1
E	11	7,32 ^a	0,11	7,6	7,2
F	10	7,23 ^a	0,13	7,4	7,0
Total	70	7,29	0,18	7,8	7,0

n = número de ejaculados

a = médias com diferentes letras diferem significativamente ($\alpha = 0,05$)

TABELA 2

Média (\bar{x}) e desvio padrão (DP) da osmolalidade (mOsm) do ejaculado de jumentos, incluindo os valores máximos e mínimos. São Carlos - SP, 1988/89.

Jumentos	n	\bar{x}	DP	Máximo	Mínimo
A	14	299,21 ^a	22,81	373	273
B	14	300,93 ^a	17,57	357	277
C	15	300,07 ^a	8,16	315	287
D	06	310,00 ^a	9,75	313	286
E	11	310,00 ^a	8,88	334	301
F	09	305,67 ^a	13,09	335	292
Total	69	302,39	15,03	373	273

n = número de ejaculados

a = médias com diferentes letras diferem significativamente ($\alpha = 0,05$)

TABELA 3

Média (\bar{x}) e desvio padrão (DP) dos níveis de Na, K, Ca e Mg, em mg%, no plasma seminal de jumentos. São Carlos - SP, 1988/89.

Jumentos	n	Na			K			Ca			Mg		
		\bar{x}	\pm	DP	\bar{x}	\pm	DP	\bar{x}	\pm	DP	\bar{x}	\pm	DP
A	09	181,67	\pm	91,24 ^b	79,67	\pm	12,80 ^c	12,80	\pm	0,46 ^{b, c}	1,46	\pm	0,11 ^b
B	12 (10)*	248,00	\pm	47,80 ^{a, b}	115,02	\pm	20,28 ^b	13,51	\pm	1,89 ^b	1,59	\pm	0,08 ^a
C	07	251,43	\pm	64,92 ^{a, b}	73,86	\pm	19,22 ^c	13,48	\pm	0,94 ^b	1,51	\pm	0,14 ^a
D	03	213,33	\pm	25,66 ^{a, b}	101,03	\pm	24,09 ^b	12,93	\pm	0,68 ^{b, c}	1,53	\pm	0,00 ^a
E	11	263,00	\pm	69,69 ^a	101,03	\pm	28,30 ^b	11,83	\pm	0,93 ^c	1,52	\pm	0,08 ^a
F	09	253,00	\pm	50,34 ^{a, b}	148,52	\pm	20,61 ^a	14,93	\pm	1,76 ^a	1,58	\pm	0,07 ^a
Total	51 (49)*	238,26	\pm	67,92	105,20	\pm	32,14	13,24	\pm	1,62	1,54	\pm	0,10

n = número de ejaculados

* = número de ejaculados para as determinações de Na

a, b, c = médias com diferentes letras diferem significativamente ($\alpha = 0,05$)

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Pela análise dos resultados obtidos para o pH seminal, observa-se que existe grande semelhança tanto entre reprodutores como entre amostras de um mesmo animal, com coeficiente de variação de apenas 2%. As amostras por nós analisadas tenderam à neutralidade, corroborando observações prévias¹⁴, sendo que nenhum dos ejaculados apresentou pH excessivamente alcalino, descartando-se assim a possibilidade de contaminações bacterianas^{5,28}. A faixa de variação do pH ficou entre 7,0 e 7,8 valores estes, próximos aos apresentados para garanhões^{18, 23, 24, 26, 27,31}. Comparativamente aos estudos realizados em jumentos, também existe bastante semelhança entre os resultados^{6,8,9,10,11,19}, porém o menor valor registrado em nosso estudo foi 7,0, ficando acima dos limites inferiores anotados por outros pesquisadores^{4, 9, 11}. No entanto, a média total obtida para os ejaculados analisados no presente estudo está incluída na faixa de variação proposta por CHEVALIER³(1979) como sendo a ideal para o pH dos diluidores utilizados na conservação "in vitro" de sêmen equino. Isto sugere que ambas as espécies possam ser tratadas da mesma maneira ao se considerar o pH dos diluidores para conservação dos espermatozoides.

Com relação à determinação da osmolalidade, a leitura do ponto crioscópico provou ser uma técnica bastante simples e prática. Os resultados por nós obtidos foram relativamente constantes, com um coeficiente de variação da ordem de 5%. Quando comparados com os valores reportados para garanhões^{18,24,26,27,30,34} observou-se grande semelhança entre as duas espécies. Do mesmo modo, a média por nós registrada

foi praticamente a mesma conseguida por NISHIKAWA; WAIDE¹⁹ (1951) em jumentos. As pequenas variações detectadas entre os nossos resultados e os de vários autores citados podem ser devidas, além das características individuais dos reprodutores estudados, às diferenças na metodologia utilizada, incluindo força e tempo de centrifugação das amostras de sêmen. Contudo, em função da grande semelhança entre os resultados obtidos para jumentos e garanhões, acreditamos que as considerações feitas anteriormente^{20, 27, 28} para eqüinos, possam ser úteis na definição da osmolalidade ideal de diluidores a serem utilizados na conservação "in vitro" de sêmen asinino.

Analisando-se os níveis de eletrólitos detectados no plasma seminal, apresentados na Tab.3, verifica-se certa homogeneidade entre amostras com exceção apenas para as determinações de Na do jumento A, que mostrou maior variabilidade. A presença de Na foi detectada nas amostras por nós analisadas numa concentração média de 238,26 mg%, situando-se abaixo das médias reportadas para garanhões^{1, 12, 13, 21, 34} e também para jumentos¹³. Provavelmente, esta diminuição na média global ocorreu em função das baixas concentrações observadas em três amostras do jumento A. Coincidentemente ou não, corresponderam a três ejaculados que apresentaram gel. No entanto, não encontramos nenhuma referência a este fato na literatura consultada. Mesmo assim, numericamente não se pode definir uma diferença significativa entre asininos e eqüinos no que tange ao nível de Na do plasma seminal.

Ao contrário do Na, a concentração média de K por nós encontrada foi superior a praticamente todos os resultados conseguidos para garanhões^{1, 12, 21, 29}, principalmente em relação aos dados de O'REILLY et al.²¹ (1979), cujos valores foram excessivamente baixos.

Para os níveis de Ca, as amostras foram bastante homogêneas e os resultados se encontram numa faixa intermediária entre

as médias obtidas para eqüinos^{21, 29, 34}, coincidindo com os valores de LANGOIS¹² (1978) e AMANN et al.¹ (1987). Já os valores de Mg registrados em nossas amostras estão bem abaixo das médias publicadas para garanhões^{16, 21, 29, 34}. Infelizmente, não temos outros dados relativos a jumentos para confrontarmos com os nossos, portanto, não se pode concluir que aqueles valores reflitam o normal para a raça ou espécie até que novas pesquisas o comprovem.

Do mesmo modo que a osmolalidade, as diferenças registradas entre os vários resultados analisados podem ser devidas a características espécie-específicas e a variações nos métodos utilizados nas análises. Não existe por exemplo, um método único de obtenção e armazenamento das amostras de plasma seminal, comum a todos os autores. No presente estudo adotamos uma força de centrifugação baixa, dentro os limites utilizados para a centrifugação do sêmen eqüino antes da congelação²².

A proporção média de Na/K para as amostras por nós analisadas foi de 2,26, ficando abaixo das proporções calculadas para os demais autores, as quais varia de 2,66 até 4,93^{1, 12, 21, 34}. Isto nos leva a crer que, assim como para garanhões^{12, 15}, os diluentes ricos em Na sejam prejudiciais aos espermatozoides de jumentos e que melhores resultados na congelação de sêmen "in vitro" possam ser obtidos quando mantidas proporções baixas de Na/K. Isto poderia simular, em escala muito menor, o que sucede a nível epididimário¹⁴. Obviamente, estas suposições só poderão ser confirmadas em estudos posteriores, onde seja considerado também o comportamento metabólico dos espermatozoides de jumentos.

De modo geral, pela semelhança existente entre as características seminais de asininos e eqüinos, acredita-se que os métodos utilizados para congelação de sêmen de garanhões possam, em princípio, ser utilizados ou não para o sêmen de jumentos. Estudos complementares poderão confirmar a viabilidade deste procedimento.

SUMMARY

Seminal samples of six jackass of Pêga breed were analysed for pH (n=70), osmolality (n=69) and Na (n=49), K (n=51), Ca (n=51) and Mg (n=51) levels determinations. The pH values ranged from 7.0 to 7.8 with the average of 7.29±1.18 for the total ejaculate number. Seminal plasma osmolality stayed between 273 and 373 mOsm, with the total average of 302.89±15.03 mOsm, which represents a freezing point depression of 0.56°C. The mean concentrations of Na, K, Ca and Mg in the seminal plasma were, respectively, 238.26±67.92, 105.20±32.14, 13.24±1.62 and 1.54±0.10 mg%. All the result obtained at the present study were compared to scientific information about donkeys and horses. Both species are quite similar apart from Mg levels that was lower for the donkeys. Due to the similarities between jackass and stallion seminal characteristics we believe that procedures for equine semen "in vitro" conservation might also be used for jackass semen. Complementary research is need to confirm the procedures viability.

UNITERMS: Donkeys; Reproduction; Semen; pH; Osmotic pressure; Electrolytes

REFERENCIA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-AMANN, R.P.; CRISTANELLI, M.J.; SQUIRES, E.L. Proteins in stallion seminal plasma. **J. Reprod. Fertil.**, p.113-20, 1987. Supplement 35.
- 02-AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Sci.**, v.7, n.3., p.145-73, 1987.
- 03-BASSET, J.; DENNEY, R.C.; JEFFERY, G.H.; MENDHAM, J. **Vogel - Análise inorgânica quantitativa**. 4.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1981.
- 04-BIELANSKI, W.; WIERZBOWSKI, S. Some properties of output of semen of jackass. **Acta Biol. Cracov. S. Zool.**, v.5, p.117-24, 1962.
- 05-CHEVALIER, F.C. **Contribution a l'étude de l'insemination artificielle chez le cheval**. Alfort, 1979. (Thèse pour le doctorat Vétérinaire) - École Nationale Vétérinaire D'Alfort.
- 06-CRAGLE, R.G.; SALISBURY, G.W. Factores influencing metabolic activity of bull spermatozoa. IV. pH, osmotic pressure, and the cations, sodium, potassium and calcium. **J. Dairy Sci.**, v.42, p.1304-13, 1959.
- 07-GLATZEL, P.; EL HOUSSAIN, K.; TIBARY, A. Pferde- und Eselhengste der marokkanischen Landespferd- und amultierzucht. Erste Ergebnisse aus dem Einsatz von Flüssig- und Gefriersamen für die Maultierproduktion. **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.**, v.94., p.445-9, 1981.
- 08-HENRY, M.; GASTAL, E.L.; MEIRA, C.; DIAZ, A.P. Características do sêmen de jumentos da raça nordestina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., Belo Horizonte, 1987. **Programa**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p.72.
- 09-KREUCHAUF, A. **Zum Fortpflanzungs-geschahem heim Esel (equus asinus)**. Munchen, 1983. (Inaugural Dissertation zur Erlangung der Tiermedizinischen Doktorwürde) - Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians, Universität München.
- 10-KREUCHAUF, A. Reproductive physiology in jackass. **Anim. Res. Develop.**, v.20, p.51-78, 1984.
- 11-KUHLMANN, J. **Samenbiologische, biochemische und cryotechnische Untersuchungen and Eselsperma**. Hannover, 1984. (Inaugural Dissertation Zur Erlangung der Tiermedizinischen Doktorwürde) - Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- 12-LANGOIS, P. **Resumé de deux années d'étude sur le sperme d'étalon**. Stocholm, 1978 apud CHEVALIER⁵, 1979. p9.
- 13-MANN, T.; MINOTAKIS, C.S.; POLGE, C. Semen composition and metabolism in the stallion and jackass. **J. Reprod. Fertil.**, v.5, p.109-22, 1963.
- 14-MANN, T. **The biochemistry of semen and of the male reproductive tract**. London, Butler & Tamner, 1964.
- 15-MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **J. Reprod. Fertil.**, p.47-51, 1979. Supplement 27.
- 16-MATOS, M.S.; VALE, W.G.; MEGALE, F. Alguns constituintes bioquímicos do sêmen de eqüinos. **Arq. Esc. Med. Vet. Univ. Fed. Bahia**, v.2, p.29-36, 1977.
- 17-NISHIKAWA, Y. Studies on the preservation of raw and frozen horse semen. **J. Reprod. Fertil.**, p.99-104, 1975. Supplement 23.
- 18-NISHIKAWA, Y.; WAIDE, Y. On artificial insemination in the horse. V. On properties of semen and the factors affecting them. **Bull. Nat. Inst. Agric. Sci. Ser. G.**, v.1, p.13-28, 1951 apud **Anim. Breed. Abst.**, v.20, p.14, 1952. (Resumo)
- 19-NISHIKAWA, Y.; WAIDE, Y. Studies on reproduction in asses. VI. On the method of collection and properties of semen. **Bull. Nat. Inst. Agric. Sci. Ser. G.**, v.1, p.37-45, 1951 apud **Anim. Breed. Abst.**, v.20, p.14, 1952. (Resumo)
- 20-NISHIKAWA, Y.; WAIDE, Y.; SHINOMIYA, S. Studies on deep freezing of horse spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 6., Paris, 1968. **Proceedings**, v.2, p.1589-91.
- 21-O'REILLY, P.J.; McCORMACK, R.; O'MAHONY, K. The effects of collection procedures and freezing on concentration of some electrolytes and glutamic oxaloacetic transaminase on stallion seminal plasma. **Irish Vet. J.**, v.33, n.4, p.55-9, 1979.
- 22-PAPA, F.O. **Contribuição ao estudo de sêmen congelado de eqüinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial**. Botucatu, 1987. Tese (Livro Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- 23-PATTIE, W.A.; DOWSETT, K.F. The repeatability of seminal characteristics of stallions. **J. Reprod. Fertil.**, p.9-13, 1982. Supplement 32.
- 24-PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; SHUTERLAND, T.M. Effect of month and stallion on seminal

- characteristics and sexual behavior. **J. Anim. Sci.**, v.31, p.713-28, 1970.
- 5-PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O. **Procedures for collection and utilization of stallion semen for artificial insemination.** Fort Collins, Anim. Reprod. Lab., Colorado State University, 1987.
- 6-PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; SEIDEL JUNIOR, G.E. Reproductive physiology of the stallion. V. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output. **J. Anim. Sci.**, v.40, p.917-23, 1975.
- 7-RAJAMANNAN, A.H.J.; ZEMJANIS, R.; ELLERY, J. Freezing and fertility studies with stallion semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION. Paris, 1968. **Proceedings.** v.2, p.1601-4.
- 8-SALISBURY, G.W.; VANDEMARK, N.L. **Fisiología de la reproducción e Inseminación Artificial de los bóvidos.** Zaragoza, Acríbia, 1964.
- 9-SATO, K.; MIYAKE, M.; SUGAWARA, M.; TAKEYAMA, T.; COHASHI, S.; IRUAMA, N.; SUGYRAMA, K.; IOVE, H.; YASHIKAWA, T. Multivariate analysis of semen characters in 3-year-old colts and stallions in the breeding and non breeding seasons. **Jap. J. Zootech. Sci.**, v.44, p.476-82, 1973.
- 30-SLOVTZOV, B. 1916 apud MANN¹⁴, 1964. p.108.
- 31-SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W.; BERNDTSON, W.E.; SHIDELER, R.K.; VOSS, J.L. Effect of fenbendazole on reproductive function in stallions. **Theriogenology**, v.9, p.447-55, 1978.
- 32-VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.28, p.709-23, 1987.
- 33-WEISMAN, N.; LEGGI, V.J.P. Inorganic ions. Osmolality. In: HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. eds. **Clinical chemistry, principles and technics.** 2.ed. New York, Harper & Row, 1974. p.736-9.
- 34-YAMANE, J., 1920 apud MANN¹⁴, 1964. p.108.

Recebido para publicação em 12/03/93
Aprovado para publicação em 19/10/93