

---

# INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado

*Artificial insemination in equines: diluted, cooled and transported race semen*

Igor Frederico Canisso<sup>a</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>b</sup>, Erotides Capistrano da Silva<sup>c</sup>, Giovanni Ribeiro Carvalho<sup>d</sup>, José Domingos Guimarães<sup>e</sup>, Anali Linhares Lima<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Médico Veterinário Autônomo, Mestre em Zootecnia, Aberystwyth, Grã-Bretanha. e-mail: canissoif@yahoo.com.br

<sup>b</sup> Médico Veterinário, Doutorando em Ciência Animal (UFMG), Belo Horizonte, MG - Brasil, e-mail: canissoif@yahoo.com.br

<sup>c</sup> Médica Veterinária, Mestranda em Medicina Veterinária (UFV), Viçosa, MG - Brasil, e-mail: jdguima@ufv.br

<sup>d</sup> Médico Veterinário, Doutorando em Zootecnia (UFV), Professor adjunto DZO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG - Brasil e-mail: jdguima@ufv.br

<sup>e</sup> Médico Veterinário, Doutorando em Medicina Veterinária (UFV), Professor adjunto DVT, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG - Brasil, e-mail: jdguima@ufv.br

<sup>f</sup> Médica Veterinária, Doutoranda em Ciência Animal e Pastagens ESALQ (USP), Piracicaba, SP - Brasil e-mail: canissoif@yahoo.com.br

---

## Resumo

A indústria equina mundial exerce importante papel como fonte geradora de renda. A inseminação artificial (IA) talvez seja a biotecnologia com maior impacto na produção equina, pois, se utilizada eficientemente, pode ser uma importante ferramenta para o melhoramento genético no plantel. A IA, supostamente, começou com o transporte de sêmen, sendo esta a modalidade mais praticada no mundo, onde o Brasil destaca-se como o segundo país que mais a utiliza. Muitas das tecnologias geradas têm sido obtidas por instituições de ensino e pesquisa nacionais. Por esse motivo, neste artigo discute-se sobre as principais tecnologias aplicáveis às condições brasileiras.

**Palavras-chave:** Sêmen; Equino; Manejo reprodutivo; Biotecnologia.

## Abstract

*The equine world industry exercises an important paper as source of generating income. The artificial insemination (AI) maybe is the biotechnology with the largest impact in the equine breeding, and if it is used efficiently can be a very important tool for the genetic improvement in the horse breeding. The AI supposedly began with semen transport and this is the modality more practiced in the world, where Brazil stands out like the second country that more uses that modality. A lot of technology has been generated by teaching and national research institutions. For this reason, this article discusses about the main applicable technologies for the Brazilians conditions.*

**Keywords:** Semen; Equine; Reproductive management; Biotechnology.

## INTRODUÇÃO

A indústria equina mundial exerce importante papel como fonte geradora de renda e empregos. Em um recente estudo estimativo sobre a indústria do cavalo no Brasil, demonstrou-se que o rebanho efetivo é de cerca de 8,5 milhões de equinos e 1,2 milhões de muares e jumentos. Esse segmento agropecuário é responsável pela geração de 600 mil empregos diretos e 3,2 milhões de empregos indiretos (CNA, 2006).

A biotecnologia da reprodução se coloca como uma importante ferramenta a serviço da equideocultura mundial, como instrumento direto do melhoramento genético. Dadas as vantagens proporcionadas pela inseminação artificial, esta talvez seja a biotecnologia com maior impacto na produção equina, pois um reprodutor pode deixar centenas de descendentes ao longo de sua vida reprodutiva quando a IA é usada eficientemente.

A inseminação artificial em equinos é largamente praticada em todo o mundo, e a maneira mais comumente usada nessa espécie é mediante o resfriamento e transporte de sêmen (LOOMIS, 2006). Aparentemente, no mundo, os países que mais realizam IA com sêmen resfriado transportado são Estados Unidos, seguido pelo Brasil (PAPA et al., 2005).

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

Por muitas décadas, o desenvolvimento e a utilização da IA na espécie equina estiveram restritos, devido a imposições por muitas associações de criadores que não permitiam a utilização da técnica (SAMPER; ESTRADA; MCKINNON, 2007). Recentemente, as legislações em diversos países do mundo se tornaram mais flexíveis, permitindo o registro de potros oriundos dessa biotecnologia, fazendo com que houvesse um grande impacto na indústria do cavalo em todo o mundo, principalmente a dos USA (LOOMIS, 2006), da Europa (AURICH; AURICH, 2006) e do Brasil (PAPA et al., 2005).

Na Alemanha, dados da Central de Reprodução Equina de Celle, que é a responsável por 60% de todas as coberturas de éguas da principal raça alemã (Hanoveriana), têm demonstrado crescimento exponencial nos últimos anos, onde cerca de 90% das éguas são cobertas por IA com sêmen resfriado (AURICH; AURICH, 2006).

No Brasil não existem estatísticas oficiais sobre inseminação artificial em equinos, contudo boa parte de nosso plantel tem sido inseminado anualmente. Métodos biotecnológicos têm sido desenvolvidos para as raças e realidade brasileiras. Dessa forma, pretende-se com este artigo revisar os procedimentos de inseminação artificial e técnicas correlatas na espécie equina para as condições brasileiras.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Procedimentos da inseminação artificial

A IA pode ser realizada de diferentes formas de processamento do sêmen: in natura; diluído, diluído transportado; diluído resfriado transportado e congelado. Cada um dos tipos de tecnologia de processamento tem suas vantagens, limitações e indicações (CARVALHO, 1992).

Independente da técnica utilizada, o sêmen deve ser colhido, avaliado e processado. Quanto às técnicas de colheita de sêmen, a mais largamente utilizada é a da vagina artificial (VA) fechada, podendo ser modificada, utilizando-se a técnica de VA aberta, cuja principal finalidade é a colheita de sêmen fracionada, sendo apenas indicada em situações especiais (TRISCHNER, 1979). Há vários tipos de VA fechada como: Hanover, Colorado, Botucatu, Nishikawa ou Japonesa, Missouri, entre outros, sendo que as mais utilizadas em todo território nacional são o modelo alemão (Hanover), seguido pelo modelo brasileiro Botucatu. Outra modalidade de colheita, utilizada em casos em que o garanhão apresenta incapacidade de monta ou disfunção comportamental, utiliza a combinação de dois fármacos, iminaprina e xilazina para a obtenção do ejaculado, obtendo-se sucesso razoável de 30 a 50% (SAMPER, 2007).

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

Após a separação das frações, o sêmen deve ser mensurado quanto ao volume da fração rica em espermatozoides e avaliado quanto à coloração seminal. Para o garanhão, o normal é a coloração branca acinzentada e qualquer alteração nesta pode indicar processo patológico ou simplesmente contaminação com urina, e/ou sujidades (LOVE, 2007). O volume do ejaculado é muito variável com a idade, época do ano, raça, regime de coleta de sêmen, estimulação sexual prévia, entre outros fatores (LOVE, 2007). A maioria dos garanhões ejacula entre 25 e 80 ml de fração rica em espermatozoides (SILVA FILHO, 1994; SAMPER; ESTRADA; MCKINNON, 2007).

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

Quanto à metodologia de IA a ser empregada, diversos fatores devem ser considerados, uma vez que podem ser muitas as variáveis envolvidas no processo como: localização da(s) propriedade(s); momento inseminante (pré e/ou pós-ovulação); número total de espermatozoides; volume; diluidor; temperatura do armazenamento; características individuais de qualidade do sêmen do garanhão; valor do sêmen; reposta inflamatória uterina da égua a ser inseminada; tipo de cio; momento da estação; raça, entre outros fatores (SILVA FILHO, 1994; VALLE et al., 1999; BRINSKO; CROCKETT; SQUIRES, 2000).

A utilização de sêmen, fresco, diluído e resfriado, implica em maior flexibilidade de manejos de controle folicular, momento e local de deposição do sêmen. Pelo contrário, sêmen congelado exige um manejo mais rígido, palpções retais mais frequentes e, quanto ao local de deposição, preferencialmente, o mais profundo no corno uterino ipsilateral à ovulação (SAMPER; ESTRADA; MCKINNON, 2007).

### **Sêmen *in natura***

O sêmen *in natura* deve ser colhido e utilizado, imediatamente, no próprio local. Tem como vantagens a economia do uso de diluidor, contudo, como desvantagem, a qualidade espermática não sendo preservada (KENNEY et al., 1975). Rapidamente se perdem os parâmetros de motilidade e vigor, além do metabolismo espermático manter-se elevado. O local de deposição pode ser o corpo (SILVA FILHO, 1994), ou o corno uterino, e o volume espermático deve ser de até 3 ml (XAVIER, 2006). O regime de inseminação utilizado mais recomendado é de inseminação a cada 48 horas, a partir da detecção de um folículo ovariano de 3 a 3,5 cm ou a partir do segundo dia da detecção da égua em cio (CARVALHO, 1992).

Alguns trabalhos comparando a inseminação artificial com sêmen *in natura* e sêmen diluído, utilizando éguas e garanhões de fertilidade normal, não encontraram diferenças entre diluição e não diluição. Silva Filho (1994) comparou o efeito da inseminação com dose inseminante de 400 milhões de espermatozoides com movimento progressivo, em éguas da raça Mangalarga Marchador, com sêmen *in natura* (I), e sêmen diluído em leite desnatado glicose (II), lactose gema (III) e um diluidor à base de glicina (IV). A taxa de concepção ao primeiro ciclo foi de I – 71,43%; II – 61,54%; III – 78,57% e IV – 78,57%, não sendo observada diferença estatística entre os diluidores e sêmen *in natura*. Vianna (2000), utilizando a mesma dose Silva Filho (1994), comparou à inseminação de apenas um ciclo em

éguas da raça Crioulo, com sêmen *in natura* (n = 160 éguas) e sêmen diluído (n = 142 éguas) em diluidor à base de lactose-gema de ovo, utilizou esquema de inseminações a cada 36 horas a partir da detecção de um folículo com 3 e 3,5 cm com égua em estro, obtendo taxa de gestação aos 15 dias de 80% e 78,9%, sem diferenças estatísticas entre as técnicas.

### **Sêmen diluído**

O sêmen diluído tem como vantagens o tratamento antibiótico, diminuindo a contaminação bacteriana deste; diluição de fatores tóxicos presentes no plasma seminal; melhora da fertilidade do sêmen devido ao aporte de nutrientes contidos no diluidor; maior flexibilidade de inseminação, onde o sêmen depois de diluído, dependendo da situação, pode ser transportado em curtas distâncias sem necessidade de resfriamento, entre haras próximos e, se devidamente protegido dos raios solares até uma hora, sem prejuízo da fertilidade; e a possibilidade do fracionamento para maior número de éguas pela expansão do volume diluidor mais o sêmen (SQUIRES et al., 1999).

#### **a) Diluidores**

Os diluidores utilizados para sêmen equino são constituídos por água, tampões e substâncias não iônicas, açúcares e diferentes tipos de macromoléculas e antibióticos. De maneira geral os diluidores podem ser divididos em quatro grupos: os salinos, os com gema de ovo, os com leite e derivados e os que apresentam albumina sérica bovina (AMANN; PICKETT, 1987; SILVA FILHO, 1994).

Um bom extensor, segundo (AMANN; PICKETT, 1987) e Silva Filho (1994) idealmente deve proporcionar: pressão osmótica compatível com o espermatozoide; apropriado equilíbrio mineral e adequada combinação de nutrientes; sistema com capacidade de neutralizar catabólitos espermáticos; substâncias com capacidade protetora para as variações de temperatura, principalmente para o frio; capacidade de estabilização de membranas e sistemas enzimáticos; livre de microrganismos patogênicos; baixo custo; não oferecer toxicidade ao espermatozoide; baixa irritabilidade ao aparelho genital e fácil aquisição.

Embora o diluidor ideal, capaz de oferecer alta longevidade espermática para as células com a máxima fertilidade, ainda esteja por ser formulado (SILVA FILHO, 1994), um grande número de diluidores tem sido formulado ao longo de décadas com esse propósito (KENNEY et al., 1975; SILVA FILHO et al., 1997; BATELLIER et al., 1997; PAPA et al., 2005). A maioria dos extensores usados para sêmen de equino é à base de gema de ovo, leite ou seus produtos derivados (SQUIRES et al., 1999).

Os diluidores mais utilizados para sêmen equino em todo o mundo, assim como no Brasil, são derivados do diluente de Kenney et al. (1975), que é à base de leite em pó desnatado, glicose, penicilina e estreptomicina. Pode haver diluidores derivados deste meio, com adição de diferentes tipos de constituintes como: antibióticos, açúcares, gema de ovo, aminoácidos, e outras substâncias com propriedades favoráveis ao sêmen, sendo que os tipos de diluidores variam de acordo com o país do mundo (SAMPER, 2007). Na França, um dos países que se destaca pela utilização da IA em equinos, o principal diluidor utilizado é à base de uma mistura de solução poli-iônica enriquecido com fosfoparacaseinato, fração derivada da caseína do leite, responsável por maior proteção do sêmen equino, sendo esse diluente denominado de INRA96 (BATELLIER et al., 1997). Na Alemanha, os diluidores mais comumente utilizados para sêmen equino são constituídos à base de gema de ovo (SAMPER, 2007).

Os diluidores para sêmen equino comercializados no Brasil são EZ – Mixin® (CST), Max Sêmen® (Agrofarma); Botu-Sêmen® e Botu-Turbo® (Biotech Botucatu) Equimix® (Nutricell), sendo que todos utilizam leite e ou derivados em sua composição (RAPHAEL, 2007).

Silva Filho, Palhares e Bergmann (1987) adaptaram um diluidor à base de lactose e gema de ovo, tradicionalmente utilizado para sêmen de bovinos (NAGASE; NIWA, 1964). Após a retirada do glicerol, foi utilizado como diluidor de sêmen equino, para inseminação com sêmen a fresco diluído e diluído transportado. O referido extensor (lactose-gema) vem sendo utilizado no Brasil, desde então com bons resultados de fertilidade, equiparáveis ou superiores ao extensor de Kenney et al., (1975)

(leite-desnatado-glicose) e ao extensor glicina-gema, (CARVALHO, 1992; CARVALHO et al., 1998; SILVA FILHO et al., 1997, 1998; LIMA et al., 2000). Após os bons resultados obtidos com sêmen de garanhão, esse diluente teve seu uso encorajado em jumentos, apresentando também bons resultados.

Experimentos conduzidos por Silva Filho et al. (1997), comparando o efeito do diluidor lactose-gema no transporte e na inseminação com sêmen diluído no próprio local, contra sêmen *in natura* nas mesmas condições transportado e utilizado no próprio local de colheita, utilizaram teste de fertilidade em 100 ciclos de 64 éguas da raça Mangalarga Marchador, e obtiveram melhores resultados com o sêmen diluído nas duas situações, transportado e não transportado. O transporte foi feito em um *container* desenvolvido por eles denominado MSP-1.

Em um amplo relato em condições reais de rotina de campo conduzidos por Weiss, Vianna e Muradas (2003) com éguas da raça Crioula, foi comparado o efeito de inseminações com sêmen fresco diluído no extensor lactose-gema, contra o sêmen fresco *in natura*. Para isso realizaram a inseminação de apenas um ciclo de 160 e 142 éguas, para os dois grupos respectivamente, e encontram taxas de fertilidade semelhantes.

Silva Filho (1994) realizou a comparação entre sêmen fresco *in natura* e sêmen fresco diluído, nos seguintes diluidores: 1) leite em pó-desnatado-glicose, 2) lactose-gema e 3) glicina-gema. Para isso utilizou a IA de 42 éguas mestiças da raça Bretã e da raça Campolina, por 64 ciclos, não obtendo diferenças entre os diluidores e com sêmen *in natura*, porém, com tendência numérica de melhores resultados para o extensor lactose-gema.

Em outro experimento conduzido em condições reais de campo, Carvalho (1992) comparou o efeito da inseminação artificial com sêmen a fresco diluído em leite desnatado-glicose, e sêmen diluído em lactose gema transportado a 15-20°C. Para isso, realizou-se a inseminação de 79 éguas e potras da raça Mangalarga Marchador, sendo utilizada divisão igualitária entre os tratamentos, obtendo-se ao final, taxas de concepção semelhantes entre os diluidores.

### **b) Sêmen diluído resfriado-refrigerado e resfriado**

A refrigeração do sêmen pode ser feita em sistemas de resfriamento ativo ou passivo. Quanto ao primeiro, apresenta curva de decréscimo da temperatura padronizada, não sofre influência da temperatura ambiente, mas não possui aplicabilidade econômica e prática para utilização rotineira na indústria do cavalo (VALLE et al., 1999; RAPHAEL, 2007).

O Brasil é o segundo país no mundo que mais utiliza transporte de sêmen equino, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (PAPA et al., 2005). Os sistemas mais utilizados em nosso país e no mundo são sistemas de refrigeração e resfriamento passivos, que são feitos em caixas (*containers*) (SILVA FILHO, 1994). No Brasil, provavelmente, os primeiros experimentos sobre transporte e refrigeração de sêmen equino foram conduzidos por Silva Filho, Palhares e Bergmann (1987), que desenvolveram um *container* denominado por eles de MSP -1, e realizaram a comparação com sêmen diluído a fresco e sêmen diluído transportado, obtendo, ao final, taxas de prenhez semelhantes.

As características de um bom *container* de transporte de sêmen equino devem seguir algumas condições como: completo isolamento ambiente; baixo custo; ser inócuo para os espermatozoides; manutenção da temperatura para o período proposto; ser possível realização de curva de resfriamento lento; características para ser aceito pelos sistemas de transporte aéreo e terrestre; seguro contra violações; entre outras situações adversas (SILVA FILHO, 1994; PALHARES, 1997; BRINSKO; CROCKETT; SQUIRES, 2000).

O abaixamento da temperatura do sêmen diluído é feito em sistemas de resfriamento passivo, onde é mantido em caixas isotérmicas, próximo a uma fonte de frio (gelo biológico reciclável), que de acordo com o sistema deixará o sêmen resfriado a 15 – 20°C, ou refrigerado a 4 – 6°C. A redução da temperatura do sêmen auxilia na sua conservação por diminuição do crescimento bacteriano, redução do metabolismo espermático e consequente controle da acidificação do meio diluidor, além da diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio, principalmente quando associados a baixas temperaturas com redução de oxigênio, favorecendo o metabolismo espermático anaeróbico e não aeróbico (KATILA, 1997; SQUIRES et al., 1999).

Após a diluição, o sêmen pode ser transportado, resfriado ou refrigerado e utilizado em períodos que variam de 1 a 48 horas, de acordo com a temperatura de armazenamento, se próxima a 5°C ou 15 - 20°C (SQUIRES et al., 1999; CARVALHO, 1992). A utilização da temperatura como conservante do sêmen tem sido rotineiramente aplicada na indústria equestre, sendo que o abaixamento de 10°C da temperatura do sêmen provoca redução de 50% do metabolismo, sendo que a 5°C, apenas 10% do metabolismo espermático, é necessário para que as células se mantenham viáveis (SQUIRES et al., 1999).

As taxas ideais de resfriamento do sêmen equino foram demonstradas por Varner et al. (1988), onde os autores observaram que as taxas de resfriamento podem afetar a capacidade de retenção da motilidade. A faixa de temperatura na qual o espermatozoide equino é mais sensível foi demonstrada por Kayser et al. (1992), estabelecendo que nos níveis de resfriamento de 37°C a 20°C, o sêmen pode ser resfriado a altas taxas sem efeitos adversos para a motilidade, contudo, a faixa de 20° a 5°C demonstrou-se como faixa de maior sensibilidade da célula espermática equina aos danos induzidos pelo resfriamento, e uma taxa de resfriamento de - 0,05 a - 0,1°C pode maximizar a motilidade. Em adição ao experimento anterior, Moran et al. (1992) acrescentam que a partir de 19°C a 8°C, como sendo realmente a faixa de maior sensibilidade da célula espermática equina, e que a partir de 8°C até 5°C o resfriamento pode ser feito rapidamente.

Na faixa de maior sensibilidade o sêmen deve ser resfriado a um abaixamento de -0,05°C, para que haja menores danos induzidos pelo frio. Existem diversas caixas comercializadas no Brasil, nacionais e importadas, que mantêm a temperatura a 5°C ou a 15 - 20°C. De modo geral, o sêmen mantido a 5°C, pode ser utilizado por até 48 horas. Contudo, o pico de fertilidade está entre 24°C e 36°C após a colheita. O sêmen mantido a 15 - 20°C deve ser utilizado de preferência entre as 12 horas de sua colheita, e caso se queira utilizar por 24 horas recomenda-se trocar a fonte de gelo reciclável 12 horas após.

O transporte do sêmen deve ser feito nas mesmas caixas utilizadas para o resfriamento ou refrigeração, com um cuidado adicional de mantê-las em locais em que as variações de temperatura ambiente não possam intervir na curva de resfriamento, e na conservação do sêmen. De acordo com o tipo de material com que a caixa é feita, a temperatura ambiente causará maior ou menor variação, e esses cuidados devem ser considerados na escolha da caixa de transporte, além do custo do equipamento.

Os modelos nacionais de caixas de transporte de sêmen encontrados no Brasil são: Botu-Box®; Botutainer®; Max Sêmen Express®; MSP-1 (UFV); MSP-2 (UFMG); e os modelos internacionais de *containers* de transporte de sêmen equino: Equitainer I® e II®; Expecta Foal®; Bio Flite®; Lane STS®; Equine Express®; Foal Flight®; Celle®; Sarstedt®; Salsbro Box® (SILVA FILHO, 1994; RAPHAEL, 2007; PALHARES, 1997).

Carvalho (1992), em trabalho realizado em dois haras (distantes 15 km um do outro) com animais da raça Mangalarga Marchador, no Estado de Minas Gerais, comparou a inseminação artificial no haras I com sêmen diluído no diluente de mínima contaminação (KENNEY et al., 1975), contra a inseminação no haras II, com sêmen diluído em meio à base de lactose e gema de ovo, em seguida transportado resfriado a 20°C do haras I para o haras II. As taxas de prenhez foram 71,05% (27/38) e 68,29% (28/41) no primeiro ciclo, não sendo observadas diferenças quanto às taxas de prenhez entre os dois sistemas.

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

Nem todos os ganhões se prestam ao resfriamento de sêmen, pois apresentam baixa motilidade espermática progressiva após o resfriamento. Nesse sentido uma alternativa foi proposta por Brinsko, Crockett e Squires (2000) que, prévio ao resfriamento e à estocagem, submeteram o sêmen diluído no diluente E-ZMix® (Universidade do Colorado), a taxas leves de centrifugação, com a finalidade de remoção de 90% do plasma seminal, tendo observado melhorias nas características de

motilidade espermática, especialmente para garanhões previamente classificados como sêmen de garanhões de “pobre capacidade de resfriamento”, principalmente a partir de 24 horas de estocagem no Equitainer®, com motilidade progressiva inferior a 30%.

Raphael (2007) realizou a centrifugação leve do sêmen diluído em extensor à base de leite desnatado, refrigerou-o a 5°C, por 72 horas e realizou diversas avaliações entre os períodos, para características de motilidade, integridade de membrana e funcionalidade mitocondrial, sendo observada superioridade do último item para sêmen centrifugado, sendo que nas demais características não foram observadas diferenças estatísticas entre o processo, mas sim diferenças entre garanhões. As diferenças entre este e a pesquisa de Brinsko, Crockett e Squires (2000) é que os garanhões haviam sido selecionados e divididos quanto à qualidade de resfriamento do sêmen.

### **c) Dose inseminante**

O número de espermatozoides contidos por dose inseminante varia na maioria dos trabalhos de 250 a 500 milhões (BRINSKO, 2006), sendo que o valor do limite superior mais comumente utilizado em todo o mundo é baseado em trabalhos de pesquisadores do Colorado.

No Brasil, experimentos conduzidos por Brandão et al. (2003), compararam duas diferentes doses inseminantes (200 e 400 milhões de espermatozoides com movimento progressivo/dose) de sêmen fresco diluído em meio de leite desnatado (KENNEY et al., 1975) e, para isso, utilizaram um ciclo de 31 éguas mestiças em cada grupo, realizando inseminações a partir da detecção de um folículo de 3 a 3,5 cm de diâmetro com égua em estro; as inseminações foram realizadas apenas às segundas, quartas e sextas-feiras de acordo com metodologia proposta por Saturnino et al. (2002), apenas com um sêmen de um garanhão da raça Brasileiro de Hipismo de fertilidade normal, o volume inseminante tendo sido ajustado para 10 ml com diluente. As taxas de prenhez ao primeiro ciclo foram de 66,7% e 65,5%, para as dose de 200 e 400 milhões, com inseminações realizadas com esta metodologia, sem apresentar diferenças estatísticas entre elas.

Xavier (2006) realizou a comparação de dois volumes e doses inseminantes de cerca de 500 e 100 milhões de espermatozoides com movimentos progressivos/dose, com volume de 15 e 3 ml, de sêmen diluído no meio de mínima contaminação (KENNEY et al., 1975), e com local de deposição intracorpual uterino e intracornual profundo, ipsilateral à ovulação, para a dose superior e inferior respectivamente, sendo que para isso utilizou o mesmo esquema de coberturas de Saturnino et al., (2002) de apenas às segundas, quartas e sextas-feiras. Para o experimento, utilizou 37 éguas mestiças (com idade de 4 a 20 anos), por 72 ciclos. As inseminações foram realizadas pré e pós-ovulação de acordo com o modelo proposto. Concluiu-se que as inseminações pré e pós-ovulação, independente do intervalo de 48 ou 72 horas, apresentam melhor eficiência de prenhez, independente da dose, volume inseminante e local de deposição.

Utilizando o diluidor lactose-gema, Carvalho et al. (1998) realizaram a comparação de diferentes doses inseminantes, para sêmen transportado por um curto período de tempo de 2 horas a 20°C, em um container denominado MSP-2. Para isso realizaram a inseminação de 92 éguas e potras da raça Mangalarga Marchador, utilizando as doses inseminantes de: <250 milhões espermatozoides (250 milhões espermatozoides com motilidade progressiva); 250 a 350 milhões espermatozoides e >350 milhões espermatozoides, onde não observaram diferenças estatísticas entre as diferentes concentrações, com tendência numérica inferior para dose mais alta.

Silva Filho et al. (1998) compararam a inseminação artificial em 105 ciclos de 62 éguas da raça Mangalarga Marchador, com sêmen diluído transportado a 20°C no container MSP-2, e para isso utilizaram dois diluidores, glicina-gema e lactose-gema. Após feitas as análises de eficiência por prenhez e taxas de gestação, os diluidores se mostraram muito semelhantes.

Lima et al. (2000) analisaram dados de eficiência reprodutiva em dois haras da raça Mangalarga Marchador no Estado de Minas Gerais, Brasil, com 125 fêmeas equinas de diferentes categorias reprodutivas e idades. As inseminações foram realizadas com o mesmo protocolo, com sêmen diluído em lactose-gema de ovo transportado no container MSP-2 a 20°C, com a mesma dose

inseminante. De acordo com o comprimento do ciclo, as éguas foram inseminadas: T1 – uma AI/ciclos; T2 - duas AI/ciclos; T3 – três ou mais AI/ciclos, não tendo sido observado efeito do número de inseminações por ciclo nas taxas finais de gestação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inseminação artificial em equinos é um procedimento viável que pode contribuir para a melhoria genética de uma raça. Se bem conduzido, pode ser uma ferramenta geradora de lucros pela comercialização de sêmen em diferentes formas. Porém, existem muitos pontos críticos que devem ser respeitados, o que torna a presença do hipiatra, especialista em reprodução, indispensável para o sucesso.

## REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- AURICH J., AURICH C. Developments in european horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. **Reproduction Domestic Animals**, v. 41, n. 4, p. 275-279, 2006.
- BATELLIER, F. et al. Effect of milk fractions survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, n. 3, p. 391-410, 1997.
- BRANDÃO, F. Z. et al. Efeito da concentração espermática e do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 55, n. 1, p. 61-67, 2003.
- BRINSKO, S. P. Insemination doses: how low can we go? **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 543-550, 2006.
- BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 129-136, 2000.
- CARVALHO, G. R. **Fertility of the diluted equine semen**, Cold to 20°C and transported. 1992. 87 f. Thesis (Magister Scientiae) – Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1992.
- CARVALHO, G. R. et al. Efeito de diferentes concentrações espermáticas sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen equino diluído, resfriado a 20°C e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v. 27, n. 3, p. 695-699, 1998.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA. **Estudo do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil**. Brasília: CNA, 2006.
- DAVIES-MOREL, M. C. G. **Equine artificial insemination**. Wallingford, Oxon: CAB International, 1999.
- JASKO, D. J. et al. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, p. 1241-1252, 1992.
- KAYSER, J. P. et al. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, n. 4, p. 601-614, 1992.



- KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1217-1227, 1997.
- KENNEY, R. M. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION, AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 1975. **Proceedings...** Boston: AAEP, 1975. v. 21, p. 327-335.
- LIMA, M. C. C. et al. Efeito do número de inseminações artificiais por ciclo sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen equino diluído, resfriado a 20°C e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v. 29, n. 6, p. 1649-1653, 2000.
- LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. **Veterinary Clinics North American Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 663-676, 2006.
- LOVE, C. C. Reproductive examination of the stallion: evaluation of potential breeding soundness. In: YOUNGQUIST, R. S.; THARELFALL, W. R. Current therapy in large animal. **Theriogenology**. 2nd. ed. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2007. p. 10-14.
- MORAN, D. M. et al. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, n. 6, p. 999-1012, 1992.
- NAGASE, H.; NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. I Factors affecting survival of spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5., 1964. **Proceedings...** Trento, Italy, 1964. v. 4, p. 410-415.
- PALHARES, M. S. **Adequação de um novo container para o transporte do sêmen equino diluído e resfriado: I - características Termodinâmicas e funcionais, II - desempenho reprodutivo das éguas inseminadas.** 1997. 246 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 1997.
- PAPA, F. O. et al. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 19-27, 2005. Suppl. 1.
- RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide equino refrigerado.** 2007. 111 f. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- SAMPER, J. C. Techniques for artificial insemination. In: YOUNGQUIST, R. S.; THREFALL, W. R. **Current therapy in large animal theriogenology**. 2nd ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 37-42.
- SAMPER, J. C.; ESTRADA, A. J.; MCKINNON, A. O. Insemination with frozen semen. In: \_\_\_\_\_. **Current therapy in equine reproduction**. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2007. p. 285-288.
- SATURNINO, H. M. et al. Efeito do intervalo das duas ultimas inseminações sobre a fertilidade de égua inseminadas com sêmen fresco diluído. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v. 31, n. 3, p. 1143-1149, 2002.
- SILVA FILHO, J. M. **Aspects of the reproductive handling and of the semen in the artificial insemination in mares.** 1994. 402 f. Thesis (Doctor Scientiae) – Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1994.
- SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; BERGMANN, J. A. G. Inseminação artificial e transporte de sêmen equino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1987. 7., CBRA, Belo Horizonte. **Anais...** São Paulo: Foundation Cargil, 1987. p. 78.

SILVA FILHO, J. M. et al. Fertilidade do sêmen eqüino diluído, resfriado e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v. 26, n. 6, p. 1134-1141, 1997.

\_\_\_\_\_. Avaliação de uma técnica de diluição e de transporte de sêmen eqüino, para as condições brasileiras. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v. 27, n. 1, p. 66-74, 1998.

SQUIRES, E. L. et al. Cooled and frozen stallion semen, fort collins: animal reproduction biotechnology laboratory. Colorado State University, **Bulletin** n. 9, 1999.

TRISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl**, v. 27, p. 53-59, 1979.

VALLE, G. R. et al. Utilização de um contêiner modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 51, n. 5, p. 505-514, 1999.

VARNER, D. D. et al. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 28, n. 5, p. 709-723, 1987.

\_\_\_\_\_. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1043-1054, 1988.

VIANNA, B. C. **Artificial insemination in mares with: freeze semen, in natura and diluted.** 2000. 64 f. Thesis (Master of Science) – College Veterinary, Federal University of Parana, Curitiba, 2000.

XAVIER, I. L. G. S. **Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen a fresco diluído, no corpo ou ápice do corno uterino, utilizando diferentes números de espermatozóides por dose inseminante.** 158 f. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

WEISS, R. R.; VIANNA, B. C.; MURADAS, P. R. Artificial insemination in mares with “in natura” and diluted semen. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 19-22, 2003.

Recebido: 26/05/2008

*Received:* 05/26/2008

Aprovado: 14/06/2008

*Approved:* 06/14/2008