

## Efeito de Diferentes Diluidores na Fertilidade de Éguas de Diferentes Haras Inseminadas com Sêmen Diluído, Resfriado e Transportado em Container Especial<sup>1</sup>

José Monteiro da Silva Filho<sup>2</sup>, Francisco Aloizio Fonseca<sup>3</sup>, Maristela Silveira Palhares<sup>2</sup>, Vicente Ribeiro do Valle Filho<sup>2</sup>, Henrique Nunes de Oliveira<sup>4</sup>, Heloisa Helena Capuano Resende<sup>5</sup>

**RESUMO** - Os efeitos de diluidor e haras sobre a fertilidade de 64 fêmeas eqüinas, da raça Mangalarga Marchador, inseminadas em dias alternados, com sêmen diluído, resfriado e transportado em um contêiner especial (MSP-2) de um garanhão, foram estudados. As éguas foram distribuídas ao acaso, em um esquema fatorial 2x2, com dois Haras (H1 e H2) e dois diluidores (Glicina-gema de ovo - T1 e lactose-gema de ovo modificado - T2), com número desigual de repetições por tratamento. A taxa de concepção ao primeiro ciclo não foi influenciada pelos efeitos de haras ou diluidor. Não se observou efeito de haras ou diluidor sobre a taxa de prenhez/ciclo e sobre as seguintes características reprodutivas: ciclos/prenhez, número de IA/égua, IA/égua gestante, IA/égua vazia, temperatura da água no contêiner, temperatura do sêmen no contêiner, tempo médio da colheita à inseminação e eficiência de prenhez. Recomenda-se a utilização do diluidor lactose gema de ovo modificado, para o transporte de sêmen resfriado entre haras. O novo container demonstrou ser mais uma opção para o transporte de sêmen resfriado de garanhões entre haras.

Palavras-chave: contêiner, diluidor, égua, Mangalarga Marchador, sêmen

## Effect of Extender on the Fertility of Mares from Different Farms Inseminated with Diluted, Cooled Semen Transported in a Newly Designed Container

**ABSTRACT** - The effects of extender and farms on the fertility of sixty-five Mangalarga Marchador breed mares were studied. The mares were randomly assigned to a 2 x 2 factorial experiment, with two breeding farms (H1 and H2) and two extenders (glycine-egg yolk - T1 and lactose-egg yolk modified - T2), from only one stallion, with different number of replicates. The mares were inseminated, on alternated days, with diluted, cooled, transported semen, in a special container (MSP-2). There were no differences in the conception rate at first cycle, regardless of the breeding farm or extender used. Also, there was no difference among breeding farm or extender concerning the conception rate/cycle and the following reproductive characteristics: number of cycles/pregnancy, number of inseminations/mare, inseminations/pregnant mare, inseminations/open mare, water temperature in the container, temperature of semen in the container, time between collection and insemination and efficiency of pregnancy. The use of lactose-egg yolk modified extender for the dilution, cooling and transport of stallion semen between farms is recommended. The new container MSP-2 showed to be a option for the transportation between farms, for the same purpose.

Key Words: container, extender, Mangalarga Marchador, mare, semen

### Introdução

Diferentes metodologias foram desenvolvidas e utilizadas por vários pesquisadores para transporte de sêmen eqüino diluído e resfriado, merecendo ênfase a japonesa (NISHIKAWA, 1959), a holandesa (BERGHUIS, 1987; De VRIES, 1987), a americana (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984; 1987), a francesa (PALMER, 1984, 1989) e a alemã (TEKIN et al., 1989; WITTE, 1989; HUECK, 1990). Independentemente da metodologia utilizada, tem-se

procurado realizar uma seleção prévia de doadores, para manter as características de motilidade e fertilidade das células espermáticas, por um período prolongado (De VRIES, 1987; PALMER, 1989).

A centrifugação do sêmen, após prévia diluição, não tem sido um procedimento imprescindível à conservação do sêmen. Alguns autores enfatizam a necessidade de se eliminar o plasma seminal antes do resfriamento e da estocagem (NISHIKAWA, 1959, BERGHUIS, 1987; De VRIES, 1987), enquanto outros têm obtido taxas de concepção satisfatórias, sem a

<sup>1</sup>Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada ao DZO/UFV.

<sup>2</sup>Professor da Escola de Veterinária da UFMG - Belo Horizonte, MG.

<sup>3</sup>Professor do Departamento de Zootecnia - UFV - Viçosa, MG.

<sup>4</sup>Professor do Departamento de Zootecnia - FMVZ - UNESP - Botucatu, SP.

<sup>5</sup>Médica Veterinária Autônoma.

utilização deste procedimento (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984, 1987; PALMER, 1984, 1989; HUECK, 1990). Quando possível, alguns pesquisadores têm recomendado a utilização de uma atmosfera, contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante a estocagem (HEISKANEN et al., 1987).

Vários diluidores foram utilizados para diluir o sêmen a ser resfriado e transportado. Alguns pesquisadores têm preferido os diluidores com gema de ovo em uma das seguintes constituições: Baken I (NISHIKAWA, 1959), glicose + gema de ovo (WIERZBOWSKI et al. 1967) ou glicina-gema de ovo (BERGHUIS, 1987; De VRIES, 1987). Outros optaram por diluidores à base de leite, como leite desnatado (VLACHOS e PASCHALERI, 1965), mínima contaminação (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984, 1987) ou leite esterilizado à ultra-alta temperatura com 1,5% de gordura (PALMER, 1984, 1989). Os diluidores com gema de ovo foram superiores àqueles à base de leite quanto à manutenção das características de motilidade em diferentes períodos de estocagem (TEKIN et al., 1989; WITTE, 1989; HUECK, 1990). A concentração ideal por dose inseminante não tem sido avaliada, criticamente, no que se refere ao sêmen diluído, resfriado e transportado. PALMER (1989) obteve taxas de concepção satisfatórias com concentrações de apenas 200x10<sup>6</sup> espermatozóides móveis/dose inseminante, enquanto DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984, 1987) utilizaram concentrações de 1,0 a 1,5x10<sup>9</sup> e 2,4 x10<sup>9</sup> espermatozóides móveis/dose inseminante, respectivamente.

Diferentes contêineres têm sido propostos para estocar o sêmen diluído durante o resfriamento e o transporte; no presente, os três modelos mais utilizados são: modelo Equitainer (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984, 1987; HUECK, 1990) modelo Sarstedt (BERGHUIS, 1987; De VRIES, 1987; HUECK, 1990) modelo Celle (HUECK, 1990). O Equitainer apresentou melhor capacidade de isolamento do meio exterior com manutenção da temperatura de 5°C, durante 48 horas; já o contêiner modelo Sarstedt foi inferior aos outros dois, quanto à manutenção das características de motilidade e isolamento do meio exterior, notadamente quando se utilizou um diluidor à base de leite desnatado-glicose (HUECK, 1990). Independentemente do contêiner utilizado, tem-se optado por um sistema capaz de oferecer resfriamento vagaroso do sêmen (-0,3°C/minuto), até a temperatura de estabilização de 4 a 8°C (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984, 1987; HEISKANEN et al., 1987; HUECK, 1990).

A importância prática do transporte do sêmen diluído e resfriado consiste em não incorrer no deslocamento das éguas e garanhões entre os haras, principalmente, quando ocorre o estabelecimento de condomínios de garanhões. Os principais objetivos deste trabalho foram comparar o efeito do sêmen diluído, em dois diluidores (glicina-gema de ovo e lactose-gema de ovo), resfriado e transportado sobre a fertilidade de éguas inseminadas, e verificar a eficiência de um novo contêiner (MSP-2) para transporte do sêmen diluído e resfriado.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido nos Haras Sedução (1), Monte Carlo (2) e Arco Íris (3), localizados, respectivamente, nos Municípios de Guarapari, Cariacica e Vila Velha, Estado do Espírito Santo, no período de setembro de 1987 a maio de 1988. Foram utilizadas 65 éguas e potras da raça Mangalarga Marchador, pertencentes a diferentes ordens de parto e categorias reprodutivas (potras, éguas solteiras e com “potro ao pé”), distribuídas ao acaso, em um fatorial 2 x 2, envolvendo dois diluidores (glicina-gema de ovo e Nagase modificado) e transporte do sêmen para dois Haras (1 e 2). Durante o experimento as éguas foram mantidas nos Haras 1 (27 éguas) e 2 (38 éguas), submetidas ao mesmo manejo reprodutivo.

Antes do início do experimento, as éguas foram submetidas a exame ginecológico, inclusive com tratamentos uterinos adequados, quando necessários. As éguas foram rufiadas individualmente com auxílio de um rufião e palpadas, por via retal, de três em três dias até início do cio e, ou, presença em um dos ovários, de um folículo com 25 a 30 mm de diâmetro, quando rufiação e palpação tornaram-se diárias, até detecção da ovulação. As éguas paridas foram rufiadas e palpadas a partir do quarto dia do pós-parto, diariamente, ou a cada três dias, dependendo do crescimento folicular apresentado no primeiro exame, até o início do cio ou presença, em um dos ovários, de um folículo com 25 a 30 mm de diâmetro, a partir do qual os procedimentos tornaram-se diários até a ovulação. As potras foram controladas por pelo menos um ciclo regular e ovulatório antes de serem inseminadas. As éguas foram inseminadas no corpo do útero em dias alternados, a partir de um folículo com 30 a 35 mm de diâmetro até a ovulação. No retorno ao cio, foram reinseminadas utilizando-se o outro diluidor proposto e, assim, sucessivamente, até confirmação da prenhez ou do término do experimento.

O diagnóstico de gestação foi realizado por palpação retal aos 17, 25, 30, 40 e 60 dias após ovulação, com o objetivo detectar reabsorções embrionárias ou abortos.

Utilizou-se sêmen de apenas um garanhão da raça Mangalarga Machador, de seis a sete anos de idade, alojado no Haras 3, para inseminar todas as éguas envolvidas no experimento.

Para o transporte do sêmen diluído e resfriado foi idealizado um contêiner (MSP-2) que permitisse resfriamento lento do sêmen, com estabilização e manutenção da temperatura dentro de limites adequados. O contêiner, esquematizado na Figura 1, consistia essencialmente das seguintes partes: a) caixa isotérmica com tampa, modelo "INVICTA", com 47,0 x 27,5 x 31,4 cm, b) plataforma inferior, constituída por uma lâmina de zinco com 39,3 x 19,8 x 4,2 cm, apresentando seis orifícios de 7,7cm de diâmetro,

distribuídos uniformemente, c) plataforma superior, constituída por uma lâmina de zinco com 42,5cm de comprimento por 23,0 cm de largura, com seis perfurações com 7,7 cm de diâmetro, distribuídos uniformemente, d) seis tubos de PVC com 23 cm de comprimento por 7,5 cm de diâmetro, apresentando orifícios de 1,2 cm de diâmetro, distribuídos, eqüidistantemente, nos 8cm inferiores da sua parede lateral, e) travas no fundo dos tubos de PVC, com a finalidade de servir de apoio para as mamadeiras com sêmen e f) mamadeiras plásticas para o acondicionamento do sêmen.

Para atingir as características ideais de resfriamento e estabilização da temperatura do sêmen, utilizou-se adequada relação água/gelo, em condições de laboratório. Concluiu-se que estas condições eram fornecidas acrescentando-se em quatro litros e meio de água, à temperatura ambiente ( $26,97 \pm 1,28^{\circ}\text{C}$ ),

Tabela 1- Avaliação física do sêmen e do desempenho reprodutivo do garanhão na estação de monta (1987/1988)  
Table 1 - Physical evaluation of the semen and reproductive performance of the stallion in the breeding season (1987/1988)

Variável <i>Variable</i>	n	$\bar{x} \pm s$
Tempo de reação 1 (seg) <i>Reaction time 1 (sec)</i>	103	22,64 $\pm$ 23,04
Tempo de reação 2 (seg) <i>Reaction time 2 (sec)</i>	14	16,36 $\pm$ 11,86
Intervalo da ereção à monta 1 (seg) <i>Interval between erection and mounting 1 (sec)</i>	100	5,11 $\pm$ 8,59
Intervalo da ereção à monta 2 (seg) <i>Interval between erection and mounting 2 (sec)</i>	12	7,50 $\pm$ 9,90
Duração da ejaculação 1 (seg) <i>Duration of ejaculation 1 (sec)</i>	87	30,16 $\pm$ 3,75
Duração da ejaculação 2 (seg) <i>Duration of ejaculation 2 (sec)</i>	17	29,35 $\pm$ 3,25
Número de montas/ejaculado <i>Number of mounts/ejaculate</i>	108	1,18 $\pm$ 0,40
Intervalo entre ejaculações (dias) <i>Interval between ejaculations (days)</i>	107	2,02
Número de éguas inseminadas/ejaculado <i>Number of inseminated mares/ejaculate</i>	108	4,63 $\pm$ 2,14
Volume (mL)	108	95,55 $\pm$ 28,82
Motilidade (%) <i>Motility</i>	108	75,19 $\pm$ 3,80
Vigor (0-5)	108	4,04 $\pm$ 0,15
pH	87	7,41 $\pm$ 0,32
Concentração ( $\times 10^6$ sptz/mL) <i>Concentration (<math>\times 10^6</math> sperm/mL)</i>	106	73,35 $\pm$ 27,97
( $\times 10^6$ sptz móveis/mL) <i>(<math>\times 10^6</math> motile sperm/mL)</i>	106	55,28 $\pm$ 21,50
( $\times 10^6$ sptz/ejaculado) <i>(<math>\times 10^6</math> sperm/ejaculate)</i>	106	6877,41 $\pm$ 3074,97
( $\times 10^6$ sptz móveis/ejaculado) <i>(<math>\times 10^6</math> motile sperm/ejaculate)</i>	106	5185,53 $\pm$ 2347,52
Concentração utilizada/dose Inseminante( $\times 10^6$ sptz móveis) <i>Concentration used/inseminate dose (<math>\times 10^6</math> motile sperm)</i>	106	552,83 $\pm$ 214,95

cubos de gelo de três a três e meia fôrmas (27,5 cm de comprimento x 10,7 cm de largura x 4,0 cm de altura - com doze pedras de gelo/fôrma), dependendo da temperatura da água, avaliada diariamente antes da colheita.

Após colheita e avaliação física do sêmen, foram retiradas amostras para avaliações da concentração e da morfologia espermática. A seguir, procedeu-se à diluição do sêmen (10 mL de sêmen mais 10 mL do diluidor) para ambos os diluidores, produzindo doses inseminantes de 20 mL.

Chegando aos Haras 1 e 2, mediu-se a temperatura da água do contêiner e do sêmen resfriado a ser utilizado naquele Haras, anotando-se os dados em ficha própria. Em seguida, as mamadeiras com o sêmen foram transferidas para recipientes com água a 37°C, visando seu reaquecimento. Após o reaquecimento, todas as amostras foram homogeneizadas e conferidas para motilidade e vigor, em microscópio óptico, a 100X e 400X. As inseminações foram realizadas por via intravaginal profunda, utilizando-se pipetas de plástico, descartáveis, com deposição do sêmen no corpo do útero.

Para as análises estatísticas, utilizou-se o sistema "Statistical Analysis System" - Versão 5. Os dados proporcionais (taxa de concepção, ciclos/prenhez e prenhez/ciclo) foram analisados por meio da tabela de contingência (Qui-Quadrado). A análise de variância foi aplicada às taxas de concepção, no sentido de detectar diferenças entre tratamentos, utilizando-se o sistema de pontos adotado anteriormente por VOSS et al. (1975). Após atribuição dos pontos, determinaram-se as médias por tratamento com a denominação de eficiência de prenhez. Para as variáveis quantitativas (concentração/dose

inseminante, eficiência de prenhez, efeito do diluidor, efeito do haras, número de inseminações/égua, número de inseminações/égua gestante, número de inseminações/égua vazia, tempo médio da colheita à IA, temperatura da água no Haras 3, temperatura da água nos Haras 1 e 2 e temperatura do sêmen nos Haras 1 e 2), aplicou-se a análise de variância, comparando-se o contraste entre médias e interações pelo teste de Tukey.

## Resultados e Discussão

Os dados relacionados ao comportamento sexual, às características físicas do sêmen e ao desempenho reprodutivo do garanhão são apresentados na Tabela 1.

Os efeitos haras e diluidor sobre as taxas de concepção e as várias características reprodutivas são apresentados nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

As taxas de concepção ao primeiro ciclo e concepção/ciclo (Tabelas 2 e 3) não foram influenciadas pelos efeitos de haras e de diluidor, mesmo após quatro ciclos. Após utilização do sistema de pontos, proposto por VOSS et al. (1975), também não foram detectadas diferenças entre tratamentos. As características reprodutivas ciclos/prenhez, prenhez/ciclo, número de IA/égua, número de IA/égua gestante, número de IA/égua vazia, taxa de concepção/ciclo e eficiência de prenhez (Tabela 3) não foram influenciados pelos tratamentos utilizados. Também não foram verificadas diferenças entre tratamentos, em relação a concentrações utilizadas/dose inseminante, temperatura da água no Haras 3, temperatura da água e do sêmen no contêiner e tempo médio da colheita à inseminação (Tabela 3).

Como não se observou interação entre haras e diluidores, os resultados foram agrupados para se

Tabela 2 - Taxa de concepção/ciclo de éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado, de acordo com o diluidor e o haras

Table 2 - Conception rate/cycle of inseminated mares with diluted, cooled and transported semen according to extender and farm

Ciclo Cycle	Glicina-gema de ovo Glycine-egg yolk				Nagase modificado Modified Nagase			
	Haras 1 Farm		Haras 2* Farm		Haras 1 Farm		Haras 2 Farm	
	Nº ciclos N. of cycles	Tx. prenhez (%) Pregnancy rate	Nº ciclos N. of cycles	Tx. prenhez (%) Pregnancy rate	Nº ciclos N. of cycles	Tx. prenhez (%) Pregnancy rate	Nº ciclos N. of cycles	Tx. prenhez (%) Pregnancy rate
1	13(7) <sup>1</sup>	53,85	17(11)	64,71	14(9)	64,29	19(10)	52,63
2	5(1)	20,00	10 (6)	60,00	6(0)	0,00	7 (4)	57,14
3	6(3)	50,00	2 (1)	50,00	2(0)	0,00	3 (1)	33,33
4	1(1)	100,00	1 (1)	100,00	2(1)	50,00	-	-
Total	25(12)	48,00	30 (19)	63,33	24(10)	41,67	29(15)	51,72

\* Duas éguas não ciclaram durante a estação de monta (Two mares did not cycle during the breeding season).

<sup>1</sup> Número entre parênteses referem-se às éguas que ficaram gestantes (Numbers in parenthesis refer to pregnant mares).

Tabela 3 - Efeito do diluidor e do haras sobre algumas características da eficiência reprodutiva de éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado

Table 3 - Effect of extender and farm on some reproductive characteristics of inseminated mares with diluted, cooled and transported semen

Característica Characteristic	Glicina-gema de ovo <i>Glycine-egg yolk</i>		Nagase modificado <i>Modified Nagase</i>	
	Haras 1 <i>Farm</i>	Haras 2* <i>Farm</i>	Haras 1 <i>Farm</i>	Haras 2 <i>Farm</i>
Número de éguas <i>Number of mares</i>	13	17	14	19
Número de ciclos <i>Number of cycles</i>	25	30	24	29
Ciclos/prenhez <i>Cycles/pregnancy</i>	2,08	1,58	2,40	1,93
Prenhez/ciclo <i>Pregnancy/cycle</i>	0,48	0,63	0,42	0,52
Número de IA/égua <i>Number of AI/mare</i>	2,00 ± 0,87	2,40 ± 0,97	2,25 ± 0,90	2,41 ± 0,87
Número de IA/égua gestante <i>Number of AI/pregnant mare</i>	1,82 ± 0,72	2,47 ± 0,77	2,30 ± 1,06	2,20 ± 0,94
Número de IA/égua vazia <i>Number of AI/non pregnant mare</i>	2,15 ± 0,99	2,27 ± 1,27	2,21 ± 0,80	2,64 ± 0,74
Volume utilizado na IA (mL) <i>Volume used in AI</i>	20	20	20	20
Concentração (x10 <sup>6</sup> sptz)/dose inseminante <i>Concentration (x10<sup>6</sup>sperm)/inseminate dose</i>	601,39 ± 236,45	530,66 ± 213,49	595,55 ± 291,22	535,24 ± 173,66
Temperatura da água Haras 3 (°C) <i>Water temperature Farm 3</i>	27,34 ± 1,28	26,64 ± 1,08	26,98 ± 1,57	26,99 ± 1,20
Temp. da água no contêiner (°C) <i>Water temperature in the container</i>	9,17 ± 2,38	7,74 ± 2,47	8,95 ± 1,87	7,39 ± 2,45
Temperatura sêmen no contêiner (°C) <i>Semen temperature in the container</i>	10,34 ± 2,25	8,56 ± 2,31	9,93 ± 1,85	8,37 ± 2,14
Tempo médio da colheita à IA (min) <i>Mean time between collection and AI</i>	160,92 ± 44,61	113,07 ± 21,53	166,46 ± 43,76	107,63 ± 13,58
Taxa de concepção/ciclo (%) <i>Conception rate/cycle</i>	48(12/25)	63,33 (19/30)	41,67(10/24)	51,72(15/29)
Eficiência de prenhez <i>Pregnancy efficiency</i>	4,00	5,60	3,92	4,76

\*Duas éguas não ciclaram durante a estação de monta.

\*Two mares did not cycle during the breeding season.

estudar somente os efeitos diluidor (Tabelas 4 e 5) e haras (Tabelas 6 e 7) sobre as várias características reprodutivas.

Os diluídores não influenciaram as taxas de concepção, obtidas no primeiro ciclo (Tabela 4). Ao final de quatro ciclos, também não se observou qualquer diferença na taxa de concepção/ciclo (Tabelas 4 e 5). Mesmo com a adoção do sistema de pontos preconizado por VOSS et al. (1975), não se detectaram diferenças entre diluídores.

A eficiência de prenhez, de 4,87 e 4,38, foi obtida, respectivamente, com os diluídores de glicina e lactose-gema de ovo. Além disso, não foram observadas diferenças entre diluídores, em relação ao número de ciclos/prenhez, prenhez/ciclo, número de IA/égua, número de IA/égua gestante, número de IA/égua vazia, concentração espermática/dose inseminante, temperatura da água no Haras 3,

temperatura da água e do sêmen no contêiner nos Haras 1 e 2 e tempo médio da colheita do sêmen à inseminação artificial.

Possivelmente, este venha a ser o segundo relato, na literatura, envolvendo a utilização do diluidor de NAGASE e NIWA (1964), modificado pela retirada do glicerol, de sua formulação original para transporte do sêmen resfriado de equinos.

As taxas de concepção de aproximadamente 60% para o primeiro ciclo (Tabela 2 e 4) são similares às citadas na literatura como característica de haras bem manejados. Além disso, aproximam-se da obtida por SILVA FILHO et al. (1991b), para o mesmo período (60% - 18/30), envolvendo o sêmen diluído em idêntico diluidor (não-centrifugado), resfriado e transportado. A escassez de literatura, envolvendo a utilização desse diluidor com este propósito, limita em muito comparações mais profundas. Entretanto, deve-

se salientar a taxa de concepção satisfatória de 71,43% (10/14), obtida com sêmen a fresco, diluído neste diluidor, no mesmo período, em outro experimento (SILVA FILHO et al. 1991a). Além disso, ROMBE (1966) obteve taxa de concepção de 40% para as 15 primeiras inseminações com o sêmen diluído em um diluidor de lactose-gema. Quando se adicionou o glicerol ao diluidor, a taxa de concepção caiu para 29% (4/14) e, após duas inseminações, obteve-se taxa de parição de 70%.

Após quatro ciclos, as taxas de concepção/ciclo foram numericamente inferiores à de 62,50% (25/40), obtida em três ciclos, utilizando-se sêmen diluído no mesmo diluidor (não-centrifugado), resfriado e transportado em menor tempo - 86 minutos (SILVA FILHO et al. 1991b). Devem ser enfatizados os bons resultados obtidos por SILVA FILHO et al. (1991a), de 70,59% (12/17), para sêmen a fresco, diluído, considerando-se a mesma variável.

As taxas de concepção, obtidas ao primeiro ciclo com o diluidor de glicina, aproximam-se das conseguidas por SILVA FILHO et al. (1991a), de 61,54% - 8/13, para o sêmen a fresco, diluído no mesmo diluidor, no mesmo período, contudo, são superiores às obtidas por BERGUIS (1987), para o sêmen diluído, resfriado e transportado (36,4% - 16/44), no primeiro ciclo.

Após quatro ciclos, as taxas de concepção/ciclo aproximam-se das obtidas por SILVA FILHO et al. (1991a) para o sêmen a fresco, diluído no mesmo diluidor (56,25% - 9/16), para a mesma variável. Entretanto, são numericamente superiores aos resultados apresentados por WITTE (1988), de 41,48%, para o sêmen diluído no mesmo diluidor e período avaliado, embora se utilize grande número de ciclos (56/135) e inseminações dentro de no máximo 4 a 6 horas após a colheita.

Apesar do razoável número de trabalhos envolvendo o resfriamento do sêmen, não tem sido

apresentado, até o momento, o diluidor capaz de oferecer as melhores condições para o resfriamento dos espermatozóides do equino, visando à manutenção da motilidade e da fertilidade, durante prolongado período. Basicamente, os diluidores têm apresentado macromoléculas da gema de ovo ou do leite em sua constituição, associadas a açúcares (glicose, lactose, frutose e sacarose) e antibióticos. Dentre os trabalhos que utilizaram diluidores com macromoléculas da gema de ovo para transporte do sêmen resfriado citam-se os de NISHIKAWA (1959), WIERZBOWSKI et al. (1967), BERGHUIS (1987), De VRIES (1987).

De maneira geral, os diluidores mais utilizados para transporte do sêmen equino resfriado têm sido o de leite desnatado-glicose e o de glicina. As taxas de concepção obtidas neste experimento reforçam os resultados obtidos na Holanda, com o diluidor de glicina, por vários pesquisadores. Comparando-se os resultados apresentados pelos autores citados com os do presente experimento, pode-se recomendar também o diluidor de lactose-gema de ovo (NAGASE e NIWA, 1964) modificado, pela retirada do glicerol de sua formulação, como mais uma opção para diluir o sêmen a ser resfriado, estocado e, ou, transportado. Esta recomendação ocorre, principalmente, em virtude da similaridade dos resultados encontrados neste experimento com os dois diluidores. Além disso, há de se mencionar os experimentos realizados *in vitro* por TEKIN et al. (1989), WITTE (1989), HUECK (1990), apresentando superioridade do diluidor de glicina, quando comparado ao de leite desnatado-glicose, no que diz respeito à manutenção das características de motilidade após diferentes períodos de estocagem.

A partir de 1970, tem sido demonstrado por inúmeros pesquisadores que as taxas de concepção estão mais ligadas à concentração espermática ideal por dose inseminante do que ao volume de sêmen utilizado. Assim, PICKETT et al. (1974) demonstraram que volumes tão pequenos quanto 0,6 mL de sêmen podem

Tabela 4 - Efeito do diluidor sobre a taxa de concepção/ciclo de éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado

Table 4 - Effect of extender on the conception rate of mares inseminated with diluted, cooled and transported semen

Ciclo <i>Cycle</i>	Glicina-gema de ovo <i>Glycine-egg yolk</i>		Nagase modificado <i>Modified Nagase</i>	
	Número de ciclos <i>Number of cycles</i>	Taxa de concepção (%) <i>Conception rate</i>	Número de ciclos <i>Number of cycles</i>	Taxa de concepção (%) <i>Conception rate</i>
1	30(18) <sup>1</sup>	60,00	33(19)	57,58
2	15(7)	46,67	13(4)	30,77
3	8(4)	50,00	5(1)	20,00
4	2(2)	100,00	2(1)	50,00
Total	55(31)	56,36	53(25)	47,17

<sup>1</sup> Números entre parênteses referem-se às éguas que ficaram gestantes (*Numbers in parenthesis refer to pregnant mares*).

Tabela 5 - Efeito do diluidor sobre algumas características da eficiência reprodutiva de éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado

Table 5 - Effect of extender on some reproductive efficiency characteristics of mares inseminated with diluted, cooled and transported semen

Característica <i>Characteristic</i>	Glicina-gema de ovo <i>Glycine-egg yolk</i>	Nagase modificado <i>Modified Nagase</i>
Número de ciclos <i>Number of cycles</i>	55	53
Ciclos/prenhez <i>Cycles/pregnancy</i>	1,77	2,12
Prenhez/ciclo <i>Pregnancy/cycle</i>	0,56	0,47
Número de IA/égua <i>Number of AI/mare</i>	2,22 ± 0,94	2,34 ± 0,88
Número de IA/égua gestante <i>Number of AI/pregnant mare</i>	2,23 ± 0,80	2,24 ± 0,97
Número de IA/égua vazia <i>Number of AI/ non pregnant mare</i>	2,21 ± 1,10	2,43 ± 0,79
Volume utilizado na IA(ml) <i>Volume utilized in AI</i>	20	20
Concentração (x10 <sup>6</sup> sptz)/dose inseminante <i>Concentration (x10<sup>6</sup>sperm)/inseminate dose</i>	559,64 ± 224,96	561,50 ± 233,16
Temperatura da água - Haras 3 (°C) <i>Water temperature Farm 3</i>	26,96 ± 1,22	26,98 ± 1,37
Temperatura da água no contêiner (°C) <i>Water temperature in the container</i>	8,40 ± 2,51	8,11 ± 2,32
Temperatura do sêmen no contêiner (°C) <i>Semen temperature in the container</i>	9,35 ± 2,43	9,08 ± 2,15
Tempo médio da colheita à IA (min) <i>Mean time between collection and AI</i>	134,82 ± 41,37	134,27 ± 42,67
Taxa de concepção/ciclo (%) <i>Conception rate/cycle</i>	56,36(31/55)	47,17(25/53)
Eficiência de prenhez <i>Pregnancy efficiency</i>	4,87	4,38

resultar ótimas taxas de concepção, desde que contenham número mínimo de 100 x 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis/dose inseminante. A concentração ideal para obtenção da máxima eficiência reprodutiva, em equinos, não tem recebido unanimidade entre os diferentes pesquisadores. A literatura, além de escassa, é conflitante. Concentrações de 50 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/dose inseminante foram associadas a taxas de concepção inferiores (P<0,05) às obtidas com concentrações de 500 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/dose inseminante, em dois experimentos (HOUSEHOLDER et al. 1981).

Para sêmen diluído, resfriado e transportado, as recomendações sobre a concentração ideal/dose inseminante são mais controvertidas e escassas do que as encontradas para o sêmen *in natura* ou diluído. Além disso, nenhum estudo foi realizado para comparar o efeito de diferentes concentrações espermáticas sobre a fertilidade das éguas inseminadas, com o sêmen transportado. Concentrações de 200, 400, 450 e 500 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/dose inseminante foram utilizadas por PALMER (1984, 1989),

BERGHUIS (1987) e De VRIES (1987). BERGHUIS (1987) salienta que, como a motilidade do sêmen transportado variou de 60 a 75%, o número mínimo de espermatozoides utilizados/dose inseminante foi de 270 x 10<sup>6</sup>. Entretanto, De VRIES (1987) recomenda concentração mínima de 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis/dose inseminante, para o sêmen transportado na Holanda.

Concentrações muito acima das citadas anteriormente foram utilizadas em dois outros trabalhos, envolvendo a denominada “metodologia americana de transporte de sêmen”. No primeiro caso, DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984) utilizaram concentrações de 1 a 1,5 x 10<sup>9</sup> espermatozoides/dose inseminante, na expectativa de que 50% dos espermatozoides morressem durante o transporte. Assim, apenas de 500 a 750 x 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis seriam verdadeiramente utilizados por dose inseminante. Em outro experimento, DOUGLAS-HAMILTON et al. (1987) recomendaram concentrações ainda maiores, de 2,4 x 10<sup>9</sup> espermatozoides móveis/dose inseminante, para o

Tabela 6 - Influência do haras na taxa de concepção/ciclo de éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado

Table 6 - Effect of farm on the conception rate/cycle of mares inseminated with diluted, cooled and transported semen

Ciclo <i>Cycle</i>	Haras 1 <i>Farm</i>		Haras 2 <i>Farm</i>	
	Número de ciclos <i>Number of cycles</i>	Taxa de concepção (%) <i>Conception rate</i>	Número de ciclos <i>Number of cycles</i>	Taxa de concepção (%) <i>Conception rate</i>
1	27(16) <sup>1</sup>	59,26	36(21) <sup>2</sup>	58,33
2	11(1)	9,09	17(10)	58,82
3	8(3)	37,50	5(2)	40,00
4	3(2)	66,67	1(1)	100,00
Total	49(22)	44,90	59(34)	57,63

<sup>1</sup> Número entre parênteses referem-se às éguas que se tornaram gestantes (*Numbers in parenthesis refer to pregnant mares*).

<sup>2</sup> Duas das 21 éguas apresentaram reabsorção embrionária e foram reinseminadas (*Two of the 21 mares had embryonic reabsorption and were reinseminated*).

sêmen transportado, utilizando a mesma metodologia.

A concentração média total utilizada no presente experimento aproxima-se das citadas por PALMER (1984), BERGHUIS (1987), De VRIES (1987) e PICKETT et al. (1974) para se obter a máxima eficiência reprodutiva, quando se utiliza o sêmen *in natura*, ou a fresco, diluído, mas está aquém das mencionadas por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984, 1987). A utilização de concentrações tão altas como as citadas por estes últimos autores reduz, em muito, o número de éguas inseminadas por ejaculado e, conseqüentemente, o rendimento de um ganhão em determinada estação de monta. No presente experimento, pode-se observar que cada ejaculado daria para inseminar de duas a três éguas, se concentrações de 2,4 a 1,5 x 10<sup>9</sup> espermatozoides móveis/dose inseminante fossem utilizadas, respectivamente. Entretanto, seguindo as recomendações de PICKETT et al. (1974), PALMER (1984), BERGHUIS (1987), De VRIES (1987) seriam inseminadas, em média, 10 éguas/ejaculado, com sêmen transportado.

A taxa de diluição do sêmen é uma variável associada à concentração espermática/dose inseminante, devendo sempre ser considerada, quando se pretende estocar o sêmen, durante um prolongado período de tempo, na tentativa de manter características de motilidade e fertilidade dos espermatozoides. Este procedimento tem sido utilizado pela maioria dos pesquisadores para reduzir os efeitos nocivos do plasma sobre os espermatozoides, principalmente quando se pretende resfriar, armazenar ou transportar o sêmen a longas distâncias. Além disso, tem sido um método alternativo à colheita fracionada ou à centrifugação do sêmen. A taxa de diluição ideal para sêmen do ganhão exige ainda maior número de estudos. Embora preocupação com

o tema não seja um fato novo, apenas recentemente um experimento foi realizado (VARNER et al., 1987). Se, por um lado, existe a necessidade de se diluir o sêmen visando reduzir o efeito nocivo do plasma seminal sobre os espermatozoides, por outro, sabe-se que o excesso de diluição provoca impedimento da viabilidade espermática, principalmente quando a concentração situa-se abaixo de 20 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. No presente experimento, utilizou-se a taxa de diluição de 1:1. Esta taxa é bem inferior às recomendadas por PALMER (1984) para a máxima sobrevivência espermática (de 1:3 a 1:25). Entretanto, SQUIRES et al. (1989) estabeleceram que excessiva diluição do sêmen leva à redução da viabilidade espermática. Além disso, tem sido demonstrado que adição de compostos como macromoléculas do leite, da gema de ovo, séricas e álcool polivinílico aumentam, notavelmente, a resistência espermática aos efeitos deletérios de uma alta taxa de diluição.

A concentração espermática por mL do sêmen diluído variou em função da concentração espermática do ejaculado, em virtude de se manter fixo o volume de sêmen *in natura*, utilizado por dose inseminante. Considerando-se a concentração média total utilizada no presente experimento, pode-se observar que a média satisfaz, grosseiramente, os 25 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL recomendados por VARNER et al. (1987) como ideais para manutenção da motilidade máxima, durante prolongado período de tempo. Entretanto, o desvio-padrão observado indica que, na maioria das vezes, a taxa de diluição e, conseqüentemente, a concentração espermática/mL do sêmen diluído foram subótimas, principalmente se forem consideradas as recomendações preconizadas por PALMER (1984) e VARNER et al. (1987). Em nenhum dos estudos envolvendo o transporte do

sêmen resfriado foi observada qualquer preocupação dos autores.

Foram avaliadas as temperaturas finais alcançadas pela água e pelo sêmen diluído nos dois diluidores (glicina e lactose-gema) e nos dois diferentes Haras (1 e 2). Pode-se observar que a temperatura do sêmen foi de, aproximadamente, 1°C a mais em relação à temperatura da água no contêiner, independentemente do haras e do diluidor (Tabelas 3, 5 e 7). A redução da temperatura tem sido o meio prático e econômico para diminuir as reações químicas e a motilidade, com conseqüente prolongamento da viabilidade espermática. Além disso, temperaturas de 0 a 10°C têm sido utilizadas na maioria dos trabalhos como preferenciais para estocagem do sêmen, em virtude de serem mais baratas e fáceis de serem atingidas. Parece existir, ainda, grande relação entre taxa de resfriamento, temperatura final de armazenamento e duração da estocagem, no que diz respeito à manutenção da motilidade e fertilidade do sêmen equino diluído e resfriado, transportado ou

não. De maneira geral, tem-se observado que, quanto maior a duração da estocagem pretendida, mais vagarosa deveria ser a taxa de resfriamento e menor a temperatura final de armazenamento. Desse modo, procurou-se, em primeiro lugar, idealizar um contêiner que permitisse resfriamento lento do sêmen, para evitar “o choque pelo frio”, além de manter a temperatura após estabilização, por um longo período.

Como pode ser observado na Tabela 7, o contêiner utilizado (MSP-2) não forneceu o isolamento necessário para a manutenção de uma temperatura uniforme, após a estabilização. Assim, houve elevação das temperaturas da água e do sêmen no contêiner com aumento do tempo de estocagem, traduzindo um isolamento inadequado do contêiner do meio exterior. Diferentes contêineres, com variados graus de refinamento e complexidade, têm sido propostos pelos diferentes autores, utilizando sêmen de equino diluído, resfriado e transportado (MILOVANOV et al., 1939; NISHIKAWA, 1959; DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984).

Apesar das limitações mencionadas,

Tabela 7 - Influência do haras sobre várias características da eficiência reprodutiva de éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado

Table 7 - Effect of farm on some reproductive characteristics of inseminated mares with diluted, cooled and transported semen

Característica <i>Characteristic</i>	Haras 1 <i>Farm</i>	Haras 2 <i>Farm</i>
Número de ciclos <i>Number of cycles</i>	49	59
Ciclos/prenhez <i>Cycles/pregnancy</i>	2,23	1,74
Prenhez/ciclo <i>Pregnancy/cycle</i>	0,45	0,58
Numero de IA/égua <i>Number of AI/mare</i>	2,12 ± 0,88	2,41 ± 0,91
Número de IA/égua gestante <i>Number of AI/pregnant mare</i>	2,05 ± 0,90	2,35 ± 0,85
Número de IA/égua vazia <i>Number of AI/non pregnant mare</i>	2,19 ± 0,88	2,48 ± 1,00
Volume utilizado na IA (mL) <i>Volume used in the AI</i>	20	20
Concentração (x10 <sup>6</sup> sptz)/dose inseminante <i>Concentration(x10<sup>6</sup>sperm)/inseminate dose</i>	598,36 ± 265,04 <sup>a</sup>	532,91 ± 194,20 <sup>b</sup>
Temperatura da água - Haras 3 (°C) <i>Water temperature - Farm 3</i>	27,16 ± 1,43	26,81 ± 1,14
Temperatura da água no contêiner (°C) <i>Water temperature in the container</i>	9,06 ± 2,12 <sup>a</sup>	7,56 ± 2,44 <sup>b</sup>
Temperatura do sêmen no contêiner (°C) <i>Semen temperature in container</i>	10,14 ± 2,05 <sup>a</sup>	8,46 ± 2,21 <sup>b</sup>
Tempo médio da colheita à IA (min) <i>Mean time between collection and AI</i>	163,63 ± 43,82 <sup>a</sup>	110,39 ± 18,12 <sup>b</sup>
Taxa de concepção total (%) <i>Total conception rate</i>	81,48(22/27)	94,44(34/36)
Eficiência de prenhez <i>Pregnancy efficiency</i>	3,96	5,19

<sup>a,b</sup> Números na linha seguidos por letras diferentes são diferentes pelo teste Tukey (P<0,05).

<sup>a,b</sup> Numbers in a row followed by different letters are different by Tukey test (P<.05).

principalmente quanto ao isolamento inadequado e à falta de controle sobre a taxa de resfriamento, o contêiner MSP-2 foi eficaz para manutenção da capacidade fecundante dos espermatozóides. Os resultados obtidos neste experimento com o uso do sêmen diluído, resfriado e transportado no contêiner MSP-2, dentro de no máximo 6 horas da colheita, são compatíveis com os resultados apresentados por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984, 1987), BERGHUIS (1987) e De VRIES (1987), que utilizaram contêineres mais sofisticados e duração mais longa de estocagem do sêmen. Entretanto, superam numericamente os resultados, apresentados por MILOVANOV et al. (1939) e NISHIKAWA (1959).

A capacidade de isolamento do contêiner MSP-2 utilizado neste experimento foi inferior à dos três contêineres utilizados por HUECK (1990). As temperaturas da água e do sêmen no interior do contêiner (Tabela 7) foram alteradas ( $P < 0,05$ ) em função do tempo de estocagem. No contêiner Sarstedt, considerado o de pior isolamento, temperatura similar à do Haras 1 para o sêmen foi alcançada somente entre 12 e 14 horas de estocagem. Entretanto, no modelo Celle, entre 22 e 24 horas, e no modelo Equitainer esta não foi alcançada sequer ao término do experimento. No contêiner Sarstedt, temperatura similar à do Haras I para o sêmen só foi alcançada entre 12 e 14 horas (de  $7^{\circ}\text{C}$  a  $13,2^{\circ}\text{C}$ ), no modelo Celle, entre 28 e 30 horas de estocagem, e no modelo Equitainer não foi atingida nem ao final do experimento (48 horas).

O experimento realizado por HUECK (1990) não envolveu inseminação de éguas, o que de certa forma limita comparações mais abrangentes. Há que se observar, entretanto, que os contêineres Sarstedt e Equitainer foram associados à taxas de concepção satisfatórias, quando utilizados de forma isolada, por outros pesquisadores. É interessante salientar que o Equitainer sempre esteve associado a um diluidor de leite desnatado-glicose quando de sua utilização (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984, 1987) enquanto o contêiner Sarstedt esteve sempre associado ao diluidor de Dimitropoulos, D-11, ou Glicina-gema de ovo, com gema de ovo em sua formulação (BERGHUIS, 1987; De VRIES, 1987). De certa forma, as macromoléculas da gema de ovo podem ter sido responsáveis pela proteção dos espermatozóides nas condições subótimas de estocagem, fornecidas pelo contêiner Sarstedt. Tal afirmativa pode ser razoavelmente comprovada no estudo de HUECK (1990), em que o diluidor de glicina foi superior ao de

leite desnatado no contêiner Sarstedt, para a manutenção da motilidade progressiva, mas não nos outros dois contêineres (Equitainer e Celle). Além disso, BOGART e MAYER (1950) demonstraram que um fator ou fatores da gema de ovo, possivelmente a fração lipoprotéica de baixa densidade (CRISTANELLI et al., 1985), podem proteger os espermatozóides de mudanças bruscas de temperatura e condições ambientais adversas, tais como alterações de pH, pressão osmótica e presença ou acúmulo de substâncias tóxicas do metabolismo espermático.

Mais recentemente, TEKIN et al. (1989) e WITTE (1989) verificaram que os valores de motilidade foram superiores nos espermatozóides mantidos no diluidor de glicina, quando comparados aos das amostras conservadas no diluidor de leite desnatado-glicose, independentemente da temperatura de conservação (ambiente  $-20$ - $22^{\circ}\text{C}$  ou  $5^{\circ}\text{C}$ ). Além disso, TEKIN et al. (1989) verificaram que todos os ejaculados, mantidos a  $5^{\circ}\text{C}$  (geladeira), apresentaram motilidade progressiva superior à dos conservados à temperatura ambiente, de 20 a  $22^{\circ}\text{C}$ .

As condições desconhecidas de resfriamento e inadequadas de estocagem no contêiner MSP-2 podem ter sido, pelo menos parcialmente, contrabalanceadas pelos diluidores utilizados com 20% de gema de ovo em sua formulação. Tal afirmativa encontra respaldo nos trabalhos mencionados anteriormente. Assim, não causa surpresa as boas taxas de concepção, obtidas com o diluidor de glicina e de lactose gema de ovo, e a não diferença entre eles (Tabelas 4 e 5). Possivelmente, os resultados de concepção obtidos com o sêmen transportado durante curto período de tempo, neste experimento inferior a 6 horas, estejam mais associados à qualidade dos diluidores utilizados do que ao refinamento e à complexidade dos contêineres.

Outro fator importante foi o tipo de envasamento de sêmen em mamadeiras plásticas. Esta forma de envasamento foi considerada inadequada em virtude de permitir grande acúmulo de ar no espaço sobre o líquido, gerando inadequada relação  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ , além de proporcionar agitação desnecessária do sêmen. A preocupação com a forma de envasamento do sêmen a ser transportado não é um fato novo. MILOVANOV et al. (1939) demonstraram que a sobrevivência espermática do sêmen diluído é inversamente proporcional ao grau de aeração. Recomendaram, ainda, envasamento do sêmen em tubos-testes, em contêineres estreitos, para evitar sua agitação. HEISKANEN et al. (1987) realizaram vários experimentos no sentido de identificar as condições

ideais para estocagem do sêmen eqüino durante 24 horas. Quanto ao envasamento, verificaram que a utilização de bolsas plásticas com eliminação total do ar foi superior a um atmosfera com 95% de O<sub>2</sub> + 5% de CO<sub>2</sub> e muito superior à presença de ar dentro das bolsas.

As temperaturas finais de armazenamento do sêmen foram de 8,46 ± 2,21°C e 10,14 ± 2,05°C para os Haras 2 e 1 (P<0,05), respectivamente. Temperaturas finais de 2 a 5°C, 4°C, 5°C, 4 a 6°C, 4 a 8°C e 4°C foram utilizadas, respectivamente, por VLACHOS e PASCHALERI (1965), NISHIKAWA (1959), DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984, 1987), PALMER (1989) para sêmen diluído, resfriado e transportado, utilizando-se diferentes metodologias.

Nos experimentos *in vivo*, não houve diferenças entre temperaturas de estocagem de 4 a 5°C e 20°C, notadamente quando as éguas foram inseminadas dentro de 24 horas de estocagem. Neste grupo, encontra-se o trabalho de PALMER (1984), que obteve taxas de concepção de 21 e 38% para o sêmen mantido por 1 hora a 20 ou 4°C, respectivamente. Temperaturas de 20 ou 5°C foram utilizadas para armazenar o sêmen diluído durante 24 horas (SQUIRES et al., 1988; VARNER et al., 1989) sem que se observasse qualquer influência da temperatura de estocagem sobre as taxas de concepção. Entretanto, quando o sêmen foi armazenado por um período de 48 horas, as taxas de concepção obtidas com sêmen conservado a 5°C foram superiores às obtidas com o sêmen mantido a 20°C (SQUIRES et al., 1988).

Finalmente, devem-se salientar as recomendações de SQUIRES et al. (1988), em que o sêmen diluído em um diluidor de leite desnatado-glicose pode ser mantido às temperaturas de 5 ou 20°C, durante 12 horas, sem se observar qualquer efeito adverso na fertilidade. Entretanto, para estocagens acima de 12 horas, o sêmen da maioria dos garanhões poderia reter as características de motilidade e apresentar melhor fertilidade, quando resfriado lentamente para 5°C e, assim, conservado até o momento da inseminação.

### Conclusões

O não efeito de diluidor em todos os aspectos avaliados permite indicar o diluidor lactose-gema de ovo modificado, para o transporte do sêmen resfriado entre haras, em função de sua simplicidade e facilidade de preparação.

O novo contêiner demonstrou, de maneira

satisfatória, ser mais uma opção integralmente nacional, para o transporte entre haras de sêmen resfriado de garanhões.

### Referências Bibliográficas

- BERGHUIS, G.A. Verzende sperma versus vers sperma in relatie tot bevruchtingsresultaten. *Tijdschr. Diergeneesk.*, v.112, n.24, p.1410-1412, 1987.
- BOGART, R., MAYER, D.T. The effect of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. *J. Anim. Sci.*, v.9, n.3 p. 143-152, 1950.
- CRISTANELLI, M.J., AMANN, R.P., SQUIRES, E.L. et al. Effects of egg yolk and glicerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the on the motility of frozen - thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology, Staneham*. v.24, n.6, p. 681-686, 1985.
- De VRIES, J.P. Evaluation of the use fresh, extended, transported stallion semen in the Netherlands. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 4, Calgary, 1986. *Proceedings...* Calgary, 1987. p. 641.
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H., OSOL, R., OSOL, G. et al. A field study of the fertility of transported equine semen. *J. Theriogenology*, v.22, n.3, p 291-304, 1984.
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H., BURNS, P.J., DRISCOLL, D.D. et al. Fertility and characteristics of slow-cooled stallion semen. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 4, Calgary, 1986. *Preceedings..* Calgary, 1987. p. 649-650.
- HEISKANEN, M.L., PIRHONEN, A. KOSKINEN. E. et al. Motility and ATP content of extended equine spermatozoa in different storage conditions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 4, Calgary, 1996. *Proceeding...* Calgary. 1987, p. 103-107.
- HOUSEHOLDER, D.D., PICKETT, B.W., VOSS, J.L. et al. Effect of extender, number of spermatozoa and HCG on equine fertility. *J. Equine Vet. Sci.* v.1, n.1, p. 9-13, 1981.
- .HUECK, C. *Untersuchungen zur Flüssigkonservierung von Pfedesperma unter Verwendung verschiedener Kühl-und Transportsysteme - Laborstudie*. Hannover, Tierärztlichen Hochschule Hannover, 1990. 89p. Thesis ( DMV).
- MILOVANOV, V.K., LIHACEV, A.N., ZEVANOVA, T.A. Preservation of the fertilising ability of stallion semen by artificial anabiosis. *Sovetsk. Zooteh*, v.4, p. 31-43, 1939. *Anim Breed Abstr*, v.8, n.2, p. 110, 1940.
- NAGASE, H., NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5, 1964, Trento. *Proceedings...*Trento: 1964. v.4, p.410-415.
- NISHIKAWA, Y. *Studies on reproduction in horses*, Tokyo, Japan Racing Association, 1959. 340p.
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10, 1984, Urbana. *Proceedings...* Urbana: University of Illinois, 1984. v.3, p.377-379.
- PALMER, E. Equine artificial insemination in France. In: ENCONTRO NACIONAL DE EQUIDEOCULTURA, 5, 1989, Maringá. *Anais...* Maringá: Fundação Universidade Estadual de Maringá, 1989. p.63-75.

- PICKETT, B.W., BACK, D.G., BURWAH, L.D. et al. The effect of extenders, spermatozoal numbers and rectal palpation on equine fertility. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 5, 1974, Columbia. *Proceedings...* Columbia: N.A.A.B., 1974. p. 47-58.
- ROMBE, S.M. The fertilising ability of stallion semen with regard to changes in absolute index of sperm survival with glycerolisation. *Mater. 4 vses koj. fiziol. biokhim. Osnov. Povysh. Prod. sel'. -khoz. Zhivot.*, Borovsk: 269-271, 1996. *Anim. Breed. Abstr.* v.35, n.4, p. 329, 1967.
- SILVA FILHO, J.M., FONSECA, F.A., PALHARES, M.S. et al. Efeito de diferentes diluidores no índice de concepção de éguas inseminadas com sêmen a fresco diluído. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991 Belo Horizonte, *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro Reprodução Animal, 1991. p. 365.
- SILVA FILHO, J.M., PALHARES, M.S., FONSECA, F.A et al. Fertilidade do sêmen equino transportado. I- Avaliação da exequibilidade do método. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1991, p.368.
- SQUIRES, E.L., AMANN, R.P., MCKINNON., A.O. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5°C or 20°C. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11, Dublin, 1988. *Proceedings...* Dublin: University College Dublin, 1988. p.297-299, 1988.
- SQUIRES, E.L., BARNES, C.K., ROWLEY, H.S. et al. Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 35, 1989 Boston. *Proceedings...* Boston: American Association of Equine Practitioners, 1989, p.25-30.
- TEKIN, N., WÖCKENER, A., KLUG, E. Konservierungsfähigkeit von pferdesamen bei einatz zweier verdünner und Konservierungstemperaturen. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* v.96, n.5, p. 258-265, 1989.
- VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.L. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v.28, n.5, p.709-723, 1987.
- VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L., MEYERS, S.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5°C or 20°C. *Theriogenology*, v.32, n.4, p.515-525, 1989.
- VLACHOS, K., PASCHALERI, E. Research on some factors influencing fertility in solipeds. *Bull. physiol. Path. Artif. Insem.*, v.1, p. 18-32, 1965. *Anim. Breeding. Abstr.*, v.37, n.2, p.1227, 1969.
- VOSS, J.L., PICKETT, B.W., BACK, D.G. et al. Effect of rectal palpation on pregnancy rate of nonlactating, normally cycling mares. *J. Anim. Sci.*, v. 41, n.3, p. 829-834, 1975.
- WIERZBOWSKI, S., KUPFERSCHIMIED, H., LEVENBERGER, H. Artificial insemination experiments on the horse. *Schweizer Arch. Tierheilk.* v.109, p.517-524, 1967. *Anim. Breed. Abstr.*, v.36, n.2, p.1111, 1968.
- WITTE, A. *Untersuchungen zur Flüssigkonservierung von Pferdesperma unter Verwendung verschiedener Verdünnungsmethoden - Labor - und Felduntersuchungen.* Hannover, Tierärztlichen Hochschule Hannover, 1989. 69p. Thesis (DMV).

**Recebido em** 06/12/96

**Aceito em** 04/07/97