

Fertilidade do Sêmen Equino Diluído, Resfriado e Transportado¹

José Monteiro da Silva Filho², Francisco Aloízio Fonseca³, Maristela Silveira Palhares², Henrique Nunes Oliveira⁴

RESUMO - Objetivou-se neste experimento estudar o efeito do transporte de sêmen equino, entre haras, sobre a fertilidade de éguas inseminadas. Setenta e seis fêmeas da raça Mangalarga Marchador foram distribuídas, ao acaso, com número desigual de repetições, para se estudarem os efeitos do sêmen *in natura*, transportado ou não, e do sêmen diluído, resfriado e transportado, sobre a fertilidade de éguas e diferentes características reprodutivas. O sêmen foi diluído no diluidor lactose-gema de ovo sem glicerina. As fêmeas foram inseminadas, em dias alternados, com sêmen de apenas um garanhão, com volumes/dose inseminante variáveis dependendo do número de fêmeas a serem inseminadas por dia com determinado ejaculado. Utilizou-se para o transporte do sêmen um contêiner especialmente projetado para este fim (MSP-1). As taxas de concepção ao primeiro ciclo e totais, a eficiência de prenhez, o número de ciclos/égua, ciclos/égua gestante, ciclo/prenhez e prenhez/ciclo, o número de IA/égua, o número de IA/égua gestante e o número de IA/égua vazia não foram influenciados pelos tratamentos. O diluidor de lactose gema, modificado pela retirada do glicerol de sua formulação, constitui uma opção para a diluição do sêmen a ser resfriado e transportado. O sucesso do transporte do sêmen, diluído e resfriado, a pequenas distâncias, por período de tempo curto, depende mais de um bom diluidor que de um sofisticado contêiner de transporte.

Palavras-chave: equino, inseminação artificial, sêmen resfriado, transporte de sêmen

Fertility of Diluted, Cooled and Transported Equine Semen

ABSTRACT - The objective of this experiment was to study the effect of semen transportation conditions on the fertility of inseminated mares. Seventy-six Mangalarga Marchador mares were allocated in a completely randomized design experiment with different number of replications to compare the following conditions: raw semen, transported or not and transported cooled diluted semen. The semen was diluted in a lactose-egg yolk extender without glycerine. The mares were inseminated, every other day, using semen of only one stallion. The inseminating volumes varied according to the number of mares to be inseminated on the same day, using only one ejaculate. Semen transportation was provided by a special container (MSP-1), projected for this objective. There were no differences among treatments for the following variables analyzed: conception rate/first cycle, total conception rate, efficiency of pregnancy, number of cycles/mare, cycles/pregnant mare, cycles/pregnancy, pregnancy/cycle, number of inseminations/mare, inseminations/pregnant mare and number of inseminations/open mare. The modified lactose-egg yolk extender without glycerine, can be recommended for dilution of cooled semen to be transported. In this case and covering a short distance and a short period of time a good extender is more important than a sophisticated transport container.

Key Words: artificial insemination, cooled semen, equine, transported semen

Introdução

A utilização do sêmen equino transportado não é em si um fato novo, podendo até mesmo ter sido responsável pela primeira citação na literatura, envolvendo a inseminação artificial nas espécies domésticas. Possivelmente, a inseminação de uma égua com o sêmen transportado de um garanhão, pertencente a uma tribo rival, em 1322, por um chefe árabe, tenha sido a citação mais antiga sobre o tema em questão

(WITTE, 1989). Os pesquisadores russos foram os primeiros a desenvolverem uma metodologia específica e a utilizá-la para inseminar um razoável número de éguas. Vários experimentos foram conduzidos por MILOVANOV et al. (1939) para investigar a sobrevivência espermática de garanhões sob diferentes condições de temperatura, aeração e diluição. O sêmen estocado durante 6 a 8 horas com esta metodologia foi utilizado para inseminar 30 éguas, com taxa de concepção de 66,7%. Uma taxa de concepção de 70%

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

²Professor da Escola de Veterinária da UFMG - Belo Horizonte, MG.

³Professor do Departamento de Zootecnia - UFV - Viçosa, MG.

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

foi obtida, em um grupo-controle, com éguas inseminadas, utilizando sêmen a fresco. Relatos posteriores mostraram fertilidade de 73% com o sêmen transportado (PARYSEV e PARSUTIN, 1940; ZARUEV et al., 1943). Entretanto, quando as éguas foram inseminadas durante três ciclos consecutivos, a fertilidade aumentou para 90% (ZARUEV et al., 1943). No Japão, NISHIKAWA (1959), utilizando o método de preservação do sêmen denominado BAKEN I, obteve taxa de concepção de 44,12% (45/102 éguas), após um tempo da colheita à inseminação de 4 a 10 horas. Diferentes metodologias de transporte de sêmen foram posteriormente desenvolvidas na Holanda, EUA, França e Alemanha com taxas de concepção variando de 73,67 a 84,57% (VAN DER HOLST, 1984a, b; DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984; PALMER, 1989; HUECK, 1990). O objetivo deste experimento foi desenvolver uma metodologia de transporte do sêmen de garanhões para o país e avaliar um novo diluidor (lactose-gema de ovo sem glicerina) e um novo contêiner (MSP-1) para o transporte do sêmen de eqüinos.

Material e Métodos

Este experimento foi conduzido nos Haras Sedução (I), Monte Carlo (II) e Arco Íris (III), localizados, respectivamente, nos Municípios de Guarapari, Cariacica e Vila Velha, Estado do Espírito Santo, no período de outubro de 1986 a abril de 1987 (Estação de Monta 1986/1987). Foram utilizadas 76 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 três tratamentos, a saber: TI - Fêmeas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado (DT) para os Haras I e II (n = 30); TII - Fêmeas inseminadas com sêmen a fresco, transportado (FT) para o Haras II (n = 8); e TIII - Fêmeas inseminadas com sêmen a fresco, sem transporte (ST) no Haras III (n = 38).

Antes do início do experimento, as fêmeas foram submetidas a um rigoroso exame ginecológico. Todas as mensurações durante a palpação retal, visando ao controle folicular das éguas, foram anotadas, bem como os dados referentes ao comportamento sexual.

Utilizou-se sêmen de apenas um garanhão da raça Mangalarga Marchador, com 5 e 6 anos de idade, alojado no Haras III, para inseminar todas as éguas, envolvidas no experimento. O sêmen foi diluído no diluidor lactose-gema, proposto por NAGASE e NIWA

(1964), modificado pela retirada da glicerina de sua fórmula original.

Para o transporte de sêmen diluído e resfriado, idealizou-se um contêiner (MSP-1) capaz de oferecer ao sêmen proteção, resfriamento lento e um ambiente isolado, termicamente, visando manter a temperatura, após a estabilização, dentro de limites adequados. O contêiner, esquematizado na Figura 1, constituiu-se das seguintes partes: a) caixa de madeira (30 x 22,5 x 20,5 cm) com tampa (30,5 x 23,5 x 8 cm), capaz de oferecer proteção à caixa de isopor alojada em seu interior, durante o transporte; b) caixa de isopor (28 x 20 x 22,5) com tampa necessária à manutenção do isolamento térmico do sêmen diluído resfriado; c) recipientes de plástico de 7 cm de diâmetro por 6 cm de altura, nos quais são colocadas as mamadeiras com sêmen; e d) mamadeiras plásticas para o acondicionamento do sêmen.

As colheitas de sêmen foram realizadas em dias alternados, durante a estação de monta, utilizando-se uma vagina artificial modelo Hannover e, como manequim, uma égua em cio, devidamente contida, por peias. O levantamento do número de éguas a serem

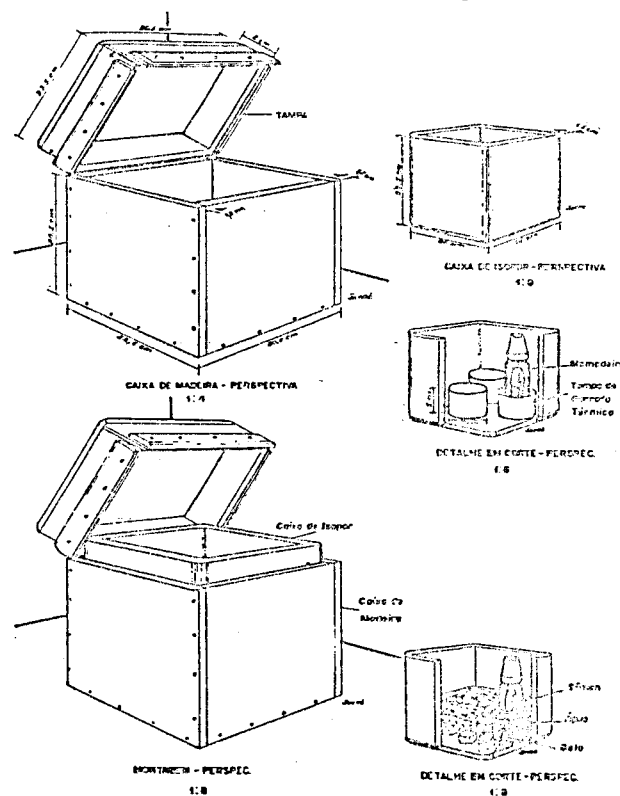


FIGURA 1 - Representação esquemática do "container" Modelo MSP-1, utilizado no transporte do sêmen diluído, resfriado.

FIGURE 1 - Schematic illustration of the MSP-1 model of container utilized in the transportation of cooled diluted semen.

inseminadas nos TI e TII foi realizado no dia anterior à colheita do sêmen e, das éguas do TIII, no próprio dia da colheita.

Após a colheita, o sêmen foi levado ao laboratório e colocado em banho-maria a 37°C, até as inseminações ou resfriamento. Após a estabilização da temperatura, procedeu-se à avaliação física do sêmen (volume, motilidade e vigor).

Após a avaliação física, o sêmen foi dividido de uma a quatro frações, com volumes diferentes, dependendo do número de éguas a serem inseminadas com cada fração e do tratamento a que pertenciam. A primeira fração foi mantida não-diluída e utilizada para inseminar as éguas do Haras III. A segunda fração foi acondicionada em mamadeira plástica, sem diluição, devidamente armazenada no contêiner, sem qualquer tipo de resfriamento, e transportada para inseminar as éguas do Haras II. As outras duas frações foram diluídas 1:1 com o diluidor de NAGASE e NIWA (1964), modificado, devidamente homogeneizadas, após a diluição e reconferidas para observação da motilidade e do vigor. Estas frações foram acondicionadas em duas mamadeiras, para serem utilizadas, posteriormente, em dois Haras (I e II).

Para o transporte, utilizou-se o sêmen, preparado de duas maneiras. O sêmen transportado a fresco, sem diluição, foi acondicionado em mamadeiras plásticas e armazenado no contêiner sem qualquer tipo de resfriamento. O sêmen diluído foi acondicionado em duas mamadeiras diferentes em recipientes de plástico (7 x 6 cm), dentro do contêiner. Em seguida, acrescentaram-se alguns cubos de gelo e água à temperatura ambiente, visando ao resfriamento do sêmen.

Após a preparação total dos contêineres para o transporte, procedeu-se à inseminação das éguas do TIII.

O sêmen diluído, ou não, e acondicionado em contêiner especial, foi então conduzido aos Haras I e II, por transporte rodoviário. Chegando aos Haras I e II, controlaram-se as éguas selecionadas no dia anterior, para determinar o estágio de desenvolvimento folicular ou a presença de ovulação. Em seguida, retirava-se a mamadeira com o sêmen a fresco (Haras II) que foi utilizado, imediatamente, após a avaliação da motilidade e do vigor. O sêmen diluído e resfriado a ser utilizado em cada Haras (I e II) e acondicionado na mamadeira era transferido para um frasco com água a 37°C, para o seu reaquecimento. Após o reaquecimento, o sêmen foi homogeneizado e reexaminado, em microscópio óptico a 200 e 400x, para motilidade e vigor. Após rigorosa higienização do

períneo, as éguas foram inseminadas, por via vaginal profunda, utilizando-se pipetas plásticas descartáveis, acopladas à seringa com o sêmen, por meio de manguito. As inseminações foram realizadas em dias alternados, a partir de um folículo com 30 a 35 mm de diâmetro em um dos ovários, até a ovulação, com deposição do sêmen no corpo do útero. Os diagnósticos de gestação foram realizados por palpação retal aos 17, 25, 30, 40 e 60 dias, após a ovulação, para se detectarem reabsorções embrionárias ou abortos.

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 se detectarem diferenças menores entre os tratamentos. Para isso, utilizou-se um sistema de pontos proposto por VOSS et al. (1975). Para os dados quantitativos (ciclo/égua, ciclo/égua gestante, tempo médio da colheita à IA, volume médio de sêmen utilizado na IA, número de IA/égua, número de IA/égua gestante e número de IA/égua vazia), aplicou-se a análise de variância, sendo o teste Tukey, utilizado para comparar o contraste entre as médias.

Resultados e Discussão

Os dados relacionados à avaliação física do sêmen e ao desempenho reprodutivo do garanhão, durante a estação de monta 1986/1987, estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados, obtidos no presente experimento, no que se refere às taxas de concepção e às diferentes características reprodutivas estudadas, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

As taxas de concepção ao primeiro ciclo não foram influenciadas ($P>0,05$) pelos tratamentos. Ao final de quatro ciclos, também não se observou qualquer diferença ($P>0,05$) no que se refere à taxa de concepção total (Tabela 2), que pudesse ser atribuída aos tratamentos. De igual forma, os seguintes parâmetros reprodutivos não foram influenciados ($P>0,05$) pelos tratamentos: ciclos/égua, ciclos/égua gestante, ciclos/prenhez, número de IA/égua, número de IA/égua gestante, número de IA/égua vazia e eficiência de prenhez (Tabela 3). Entretanto, observaram-se diferenças ($P<0,05$) entre os tratamentos quanto ao volume utilizado/dose inseminante e ao tempo médio da colheita à inseminação artificial (Tabela 3).

TABELA 1 - Avaliação física do sêmen e desempenho reprodutivo do garanhão utilizado na estação de monta 1986/1987

TABLE 1 - Physical evaluation of the semen and reproductive performance of the stallion utilized in the breeding season 1986/1987

Variável Variable	n	x ± s
Volume (mL)	69	110,62 ± 28,23
Motilidade (%) Motility	54	68,33 ± 9,46
Vigor	51	4,76 ± 0,36
Número de éguas inseminadas/ejaculado Number of inseminated mares/ejaculate	73	3,93 ± 1,44

Apesar da falta de controle sobre fatores extremamente importantes para a manutenção da longevidade das células espermáticas, como taxa de diluição, concentração espermática, tipo de envasamento, taxa de resfriamento e temperatura final de armazenamento, obteve-se taxa de concepção com o sêmen diluído, considerada pela maioria dos pesquisadores, representativa das obtidas em haras submetidos a um bom manejo reprodutivo. Para enfatizar a importância desta taxa de concepção obtida, deve-se salientar a precariedade do contêiner utilizado e a proposta inédita do emprego do diluidor de NAGASE e NIWA (1964), modificado pela retirada do glicerol de sua formulação original, para o transporte do sêmen resfriado entre haras. BERGHUIS (1987) utilizou a metodologia holandesa e obteve taxa de concepção de apenas 36,4% (16/44), numericamente inferior à obtida no presente experimento, que foi de 60% (18/30), no primeiro ciclo. Na metodologia proposta por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984; 1987), as taxas de concepção, ao primeiro ciclo, foram de 65% (30/46) e 59%, similares às apresentadas aqui. Além disso, foram relatadas por aqueles autores diferenças individuais entre os garanhões.

Em apenas dois dos trabalhos consultados, foi possível avaliar a taxa de concepção/ciclo: DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984), de 58,33% (42/72) e PALMER (1989), de 44% (n=2181). Os resultados, obtidos no presente experimento (62,5% - 25/40) aproximaram-se dos obtidos por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984) e foram numericamente superiores aos apresentados por PALMER (1989).

De certa forma, a taxa de concepção total obtida no presente experimento, de 83,33% (25/30), pode ser considerada satisfatória, principalmente, ao serem consideradas as descritas por VAN DER HOLST (1984a,b); BERGHUIS (1987); De VRIES (1987); DOUGLAS-HAMILTON et al. (1987); PALMER (1989), que variaram de 70 a 83%. Entretanto, foi numericamente inferior às taxas de concepção descritas por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984), de 91% (42/46), e por VAN DER HOLST (1984a), que, ao utilizar um pequeno número de fêmeas, obteve 100% (10/10). Comparações dos resultados, obtidos aqui, com os apresentados por vários pesquisadores, utilizando diferentes sistemas de transporte de sêmen são prejudicadas ao serem considerados três aspectos envolvidos: o pequeno número de animais utilizados, diluidores e contêineres diferentes e o tempo reduzido da colheita do sêmen à inseminação artificial.

Vários diluidores foram utilizados no sistema de transporte do sêmen de garanhões, sendo que as melhores taxas de concepção obtidas, pelos pesquisadores citados, foram utilizando os diluidores de glicina, de leite desnatado-glicose e o leite esterilizado à ultra-alta temperatura com 1,5% de gordura (VAN DER HOLST, 1984a, b; DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984, 1987; PALMER, 1984). Pelos resultados de fertilidade obtidos neste experimento, no que se refere ao diluidor de lactose-gema de ovo, modificado pela retirada do glicerol de sua formulação, pode-se

TABELA 2 - Efeitos de diferentes tratamentos sobre a fertilidade de éguas/ciclo

TABLE 2 - Effect of different treatments on the fertility of mares/cycle

Tratamento (Treatment)						
Ciclos	Sêmen diluído transportado (DT)		Sêmen fresco transportado (FT)		Sêmen fresco sem transporte (ST)	
Cycles	Diluted transported semen		Transported fresh semen(DT)		Fresh semen without transportation	
	Nº de ciclo	Taxa de concepção%	Nº de ciclo	Taxa de concepção%	Nº de ciclo%	Taxa de concepção%
	No. of cycle	Conception rate	No. of cycle	Conception rate	No. of cycle	Conception rate
1	30(18) ^a	60,00	8(7)	87,50	38(26)	68,42
2	8(5)	62,50	-	-	8(4)	50,00
3	2(2)	100,00	-	-	4(1)	25,00
4	-	-	-	-	3(3)	100,00
Total	40(25)	62,50	8(7)	87,50	53(34)	64,15 ^a

^aNúmeros entre parêntese referem-se às éguas que ficaram gestantes.

^a Numbers in parenthesis refer to the pregnant mares.

TABELA 3 - Efeito do sêmen diluído transportado, ou do sêmen fresco transportado, ou não, sobre algumas características da eficiência reprodutiva de éguas

TABLE 3 - Effect of diluted transported semen, or fresh transported semen or not, on some reproductive traits of mares

Característica reprodutiva <i>Reproductive trait</i>	Tratamento (<i>Treatment</i>)		
	Sêmen diluído transportado (DT) <i>Diluted transported semen</i>	Sêmen fresco transportado (FT) <i>Transported fresh semen</i>	Sêmen fresco sem transporte (ST) <i>Fresh semen without transportation</i>
Número de éguas <i>Number of mares</i>	30	8	38
Número de ciclos <i>Number of cycles</i>	40	8	53
Ciclos/égua <i>Cycles/mare</i>	1,33	1,00	1,39
Ciclos/égua gestante <i>Cycles/pregnant mare</i>	1,36	1,00	1,44
Ciclos/prenhez <i>Cycle/pregnancy</i>	1,60	1,14	1,56
Prenhez/ciclo <i>Pregnancy/cycle</i>	0,63	0,88	0,64
Nº de IA/égua <i>No. of AI/mare</i>	2,07 ± 1,16	1,50 ± 0,53	2,08 ± 0,98
Nº de IA/égua gestante <i>No. of AI/pregnant</i>	2,08 ± 0,95	1,57 ± 0,53	2,21 ± 1,04
Nº de IA/égua vazia <i>No. of AI/Non pregnant mare</i>	2,07 ± 1,49	1,0	1,84 ± 0,83
Volume utilizado na IA <i>Volume utilized in AI</i>	45,65 ± 19,08 ^a	32,25 ± 19,94 ^{ab}	32,75 ± 19,74 ^b
Tempo médio da colheita à IA (min) <i>Mean time from collection to AI</i>	86,24 ± 41,89 ^a	51,56 ± 33,96 ^b	-
Taxa de concepção (%) <i>Conception rate</i>	83,33 (25/30)	87,50 (7/8)	89,47(34/38)

^{a,b} Médias na linha seguidas de letras diferentes diferem (P<0,05).^{a,b} Means in a row followed by different letter differ (P<0.05).

recomendá-lo como mais uma alternativa, ao lado dos três mencionados anteriormente, para a diluição, estocagem e, transporte do sêmen equino.

O tempo decorrido, desde a colheita até a inseminação artificial para o sêmen diluído, resfriado e transportado, neste experimento, foi de 86,24 ± 41,89 minutos e pode ser considerado um intervalo muito curto, em relação ao que tem sido relatado na literatura consultada. Assim, alguns trabalhos utilizaram o sêmen transportado dentro de um período de 2 a 10 horas, após a colheita (NISHIKAWA, 1959; PALMER, 1984) e outros dentro de 24 horas (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984; BERGHUIS, 1987). VAN DER HOLST (1984b) tem relatado ótimas taxas de concepção para o sêmen transportado, utilizado dentro de um período de 24 a 72 horas, após a colheita (70 a 78%). Surpreendentemente, VAN DER HOLST (1984a), um pesquisador holandês, obteve taxa de concepção alta para o sêmen transportado por mais de 72 horas, após a colheita, de 83,82% (57/68).

Com o sistema de transporte testado neste experimento, apesar da simplicidade e do baixo custo, obtiveram-se taxas de concepção similares às de-

monstradas por outros pesquisadores, que utilizaram contêineres bem mais sofisticados.

Todos os trabalhos realizados, à procura do melhor contêiner, têm sido associados à obtenção da melhor forma de envasamento do sêmen. Assim, tem-se procurado o envasamento em frascos ou bolsas plásticas, capazes de permitir a eliminação de todo o ar presente, a fim de diminuir a aeração e a agitação do sêmen, durante o transporte. No que diz respeito ao contêiner, tem-se procurado atender às seguintes exigências: a) isolamento completo do meio exterior; b) obtenção de uma taxa resfriamento lenta; c) manutenção da temperatura após a estabilização (4 - 8°C) durante maior período de tempo possível; d) proteção do sêmen contra atrito; e) estrutura forte - para permitir o transporte por automóvel, ônibus, trem de ferro ou avião; e f) ser simples, de baixo custo, leve e de fácil manuseio. Em presença de um diluidor com gema de ovo (diluidor de Dimitropoulos), as diferenças entre três contêineres (Equitainer, Sarstedt e Celle), quanto à conservação das características de motilidade, desapareceram (HUECK, 1990). Possivelmente, em presença de condições estressantes, tais

como mudanças bruscas de temperaturas e taxas de resfriamento inadequadas, a gema de ovo exerça proteção mais eficiente para os espermatozóides do que as macromoléculas do leite.

Tal alternativa foi razoavelmente comprovada pelos resultados, apresentados por TEKIN et al. (1989), WITTE (1989), HUECK (1990) e pelos obtidos neste experimento, em que um diluidor com gema de ovo (lactose-gema de ovo modificado) esteve associado às taxas de concepção consideradas satisfatórias, na presença de várias condições de estocagem, desfavoráveis, dentre elas, merecendo ênfase a taxa de diluição, o tipo de envasamento, a taxa de resfriamento, a temperatura final de armazenamento, concentração espermática e o modelo do contêiner. Além disso, é razoável supor que, pelo menos no que diz respeito ao transporte e à utilização do sêmen, dentro de curto período de tempo da colheita à inseminação, como neste experimento, da ordem de $86,24 \pm 41,89$ minutos, as taxas de concepção obtidas podem ser mais consequência de um diluidor de sêmen ideal do que de um sofisticado contêiner de transporte. Entretanto, vale lembrar que, para o transporte a longas distâncias, todos os fatores capazes de interferir na manutenção da longevidade espermática deverão ser considerados.

Um dos aspectos mais surpreendentes deste experimento foi a taxa de concepção de 87,5% (7/8), obtida em apenas um ciclo, com o sêmen transportado, *in natura* dentro de um período de $51,56 \pm 33,96$ minutos. A inexistência de tentativas similares na literatura não permite fazer comparações com outros trabalhos. Entretanto, vários experimentos têm utilizado o sêmen *in natura* para inseminações no próprio local de colheita do sêmen e que servirão, de certa forma, na discussão de alguns aspectos relacionados à utilização do sêmen *in natura*, transportado ou não, para inseminação artificial. Acompanhando a taxa de concepção satisfatória, obtida com o sêmen *in natura* transportado, verificou-se que o sêmen *in natura*, utilizado no próprio local de colheita, foi responsável por uma taxa de concepção ao primeiro ciclo de 68,42% (26/38). Ao final de quatro ciclos consecutivos, a taxa de concepção por ciclo foi de 64,15% (34/53) e a fertilidade total de 89,47% (34/38) (Tabelas 2 e 3). Alguns pesquisadores citam a manutenção da motilidade e da habilidade fecundante dos espermatozóides no sêmen *in natura*. Segundo BOGART e MAYER (1950), os espermatozóides do garanhão no sêmen não-diluído têm pouca resistência inerente, quando medida pelo "choque ao frio" e, como indicada pela

ausência de motilidade, após um período de estocagem de 24 horas e pela falha de os espermatozóides do garanhão sobreviverem a um período de estocagem de 48 horas. Este fato foi comprovado por NISHIKAWA (1959), ao observar que a motilidade no sêmen não-diluído foi boa após a colheita (68%), mas decresceu acentuadamente dentro de 24 horas para 11,2% e, às 48 horas, atingiu 2,1%. Em relação à manutenção da habilidade fecundante, NISHIKAWA (1959) cita que esta é preservada no sêmen não-diluído durante somente 1 ou 2 horas, após a colheita. Somente a partir de 1970, o sêmen *in natura* foi utilizado novamente nos EUA. Segundo TISCHNER (1988), as inseminações de éguas com o sêmen *in natura* deveriam ser realizadas dentro de no máximo 30 a 60 minutos, após a colheita, com concentração espermática/dose inseminante de, aproximadamente, 500×10^6 espermatozóides móveis. A taxa de concepção, obtida com este método, é quase idêntica à obtida com monta natural. De certa forma, as taxas de concepção, obtidas para as inseminações com o sêmen *in natura* transportado (87,5% - 7/8) ou não (68,42% - 26/38), no primeiro ciclo, comprovam as afirmações anteriores de NISHIKAWA (1959) e TISCHNER (1988). Além disso, aproximam-se das apresentadas por PACE e SULLIVAN (1975), PICKETT et al. (1975) e BERGHUIS (1987), de 61,9 a 75% para o primeiro ciclo, com o mesmo tipo de sêmen. Da mesma forma, o índice de prenhez/ciclo, obtido no presente experimento (64,15% - 34/53), pode ser considerado satisfatório e similar aos obtidos por PICKETT et al. (1975), de 71% (22/31), e PALMER (1984), de 76% (n = 17) e 68% (n = 19) para o sêmen oriundo de garanhões submetidos a duas e a uma colheita de sêmen/dia, respectivamente. Além disso, supera numericamente a taxa de concepção/ciclo de 40% (n=25), apresentada por PALMER (1984) em outro experimento.

A taxa de concepção total de 89,47% (34/38), obtida no presente experimento, reforça os resultados apresentados para o sêmen *in natura* por KEDROV (1940), PICKETT et al. (1975) e BERGHUIS (1987), de 85,7 a 92,8%.

No que se refere ao volume utilizado/dose inseminante, verificou-se diferença entre os tratamentos (DT - 46,65 vs ST - 32,75 - $P < 0,05$). Entretanto, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre o volume utilizado no sêmen *in natura* transportado e os utilizados nos outros dois tratamentos, diluído e transportado, e no sêmen *in natura*, sem transporte. Apesar disso, os volumes inseminantes não influenciaram ($P > 0,05$) as taxas de concepção, obtidas pelos trata-

mentos. As discussões sobre o volume ideal/dose inseminante não têm sido uma constante na literatura consultada. Entretanto, PICKETT et al. (1975) demonstraram que o volume inseminante não influenciou as taxas de concepção obtidas. Mais recentemente, BERGHUIS (1987) e WITTE (1989) utilizaram volumes inseminantes variáveis, dependendo do número de éguas a serem inseminadas por um ejaculado em um determinado dia. Volumes inseminantes de 5 a 40 mL foram empregados por BERGHUIS (1987). Além disso, para o sêmen transportado, DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984) utilizaram volumes inseminantes de 10 a 20 mL, no início da estação de monta, e 30 a 50 mL, nos dias mais longos, para conseguir concentrações espermáticas de $1,0$ a $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/dose inseminante. Volumes inseminantes de 20 e 10 mL têm sido utilizados, respectivamente, por PALMER (1984, 1989). Apenas SQUIRES et al. (1989) demonstraram efeitos nocivos de grandes volumes inseminantes. Destes resultados, percebe-se que volumes de 100 mL ou mais, reduzem a fertilidade.

No presente experimento o maior volume inseminante utilizado (45,65 mL) é aproximadamente a metade do demonstrado por SQUIRES et al. (1989), como nocivo à fertilidade das éguas. Apesar de não terem sido feitas as concentrações espermáticas, durante o período experimental, pode-se supor, com base no menor volume de sêmen utilizado, que as concentrações tenham ultrapassado em muito as exigências apresentadas por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984); PALMER (1984); VAN DER HOLST (1984a); e WITTE (1989), para se obter eficiência reprodutiva máxima.

Conclusões

Apesar do pequeno número de éguas utilizadas no tratamento II, podem-se observar altas taxas de concepção para as éguas inseminadas com o sêmen transportado *in natura*, dentro de curto período de tempo, da colheita à inseminação.

O diluidor de lactose-gema de ovo, modificado pela retirada do glicerol de sua formulação, apresentou um resultado extraordinário no que se refere às taxas de concepção no primeiro ciclo, concepção total e eficiência de prenhez, associadas aos diferentes parâmetros reprodutivos, avaliados para o sêmen diluído, resfriado e transportado. Tais resultados tornam-se mais importantes, ainda, ao se avaliar a qualidade do contêiner utilizado, incapaz de possibilitar taxas de

resfriamento adequadas e isolamento completo do meio exterior.

O sucesso do transporte do sêmen, diluído e resfriado, a pequenas distâncias, por um período de tempo curto, depende mais de um bom diluidor do que de um sofisticado contêiner de transporte.

Para o transporte de sêmen a longas distâncias, por longos períodos de tempo, maior controle sobre os outros fatores, sabidamente importantes para longa preservação da capacidade fecundante dos espermatozoides, deverá ser praticado.

A utilização do sêmen *in natura* no próprio local da colheita continua sendo a forma mais simples, econômica, rápida e eficiente de utilização da inseminação artificial em eqüinos com o sêmen fresco, imediatamente após a colheita.

Referências Bibliográficas

- BERGHUIS, G.A. Verzend sperma versus vers sperma in relatie tot bevruchtigingsresultaten. *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.2, p. 143-152, 1950.
- 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., BURNS, P.J., DRISCOLL, D.D., IALE, K.M. Fertility and characteristics of slow-cooled stallion semen. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 4, Calgary, 1986. *Proceedings...* Calgary, 1987. p. 649-650.
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H., OSOL, R., OSOL, G., DRISCOLL, D., NOBLE, H. A field study of the fertility of transported equine semen. *J. Theriogenology*, v.22, n.3, p. 291-304, 1984.
- HUECK, C. Untersuchungen zur Flüssigkonservierung von Pferdesperma unter Verwendung verschiedener Kühl- und Transportsysteme - Laborstudie. Hannover, Tierärztlichen Hochschule Hannover, 1990. 89p. (Thesis - DMV).
- KEDROV, V. Artificial insemination of mares after observed ovulation and with varying numbers of spermatozoa. *Konevodstvo*, v.1, p.15-16, 1940. In: *Anim. Breeding Abstracts*, Wallingford, v.11, n.2, p. 85, 1943.
- MILOVANOV, V.K., LIHACEV, A.N., ZEVANOVA, T.A. Preservation of the fertilising ability of stallion semen by artificial anabiosis. *Sovetsk. Zootek*, v.4, p. 31-43, 1939. In: *Anim. Breeding Abstracts*, 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, Trento, 1964. *Proceedings...* Trento, 1964. v.4, p.410-415.
- NISHIKAWA, Y. *Studies on reproduction in horses*, Tokyo, Japan Racing Association, 1959. 340p.
- PACE, M.M., SULLIVAN, J.J. Effect of timing of frozen stallion semen insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate of mares. In:

- INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 1, Cambridge, 1974. *Proceedings...* Cambridge, 1975. p.115-121.
- PALMER, E. Equine artificial insemination in France. In: ENCONTRO NACIONAL DE EQUIDOCULTURA, 5, Maringá, PR, 1989. *Anais...* Maringá: Fundação Universidade Estadual de Maringá, 1989. p.63-75.
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10 Urbana-Champaign, 1984. *Proceedings...* Urbana-Champaign, University of Illinois, 1984. v.3, p.377-379.
- PARYSEV, P., PARSUTIN, G.T. To organize and to carry out in an exemplary way artificial insemination of horses during 1940. *Konevodstvo*, v.1, p. 10-15, 1940. In: *Anim. Breeding Abstracts*, v.11, n.2, p. 86, 1943.
- PICKETT, B.W.; BURWASH, L.D.; VOSS, J.L.; BACK, D.G. Effect of seminal extenders on equine fertility. *J. Anim. Sci.*, v.40, n.6, p. 1136-1143, 1975.
- SQUIRES, E.L., BARNES, C.K., ROWLEY, H.S., MCKINNON, A.O., PICKETT, B.W., SHIDELER, R.K. Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 35, Boston, 1989. *Proceedings...* American Association of Equine Practitioners, 1989. p.25-30.
- TEKIN, N., WÖCKENER, A., KLUG, E. Konservierungsfähigkeit von pferdesamen bei einsatz zweier verdünner und Konservierungstemperaturen. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, v.96, n.5, p. 258-265, 1989.
- TISCHINER, M. Problems of semen preservation and artificial insemination in horses. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11, Dublin, 1988. *Proceedings...* Dublin: University College Dublin, 1988. v.5, p. 354-362.
- VAN DER HOLST, W. De huidige en de toekomstige ontwikkeling van de K.I. bij paarden in Nederland. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, v.53, n.4, p. 302-307, 1984b.
- VAN DER HOLST, W. Stallion semen production in A.I. programs in the Netherlands. In: COUROT, M. (ed.) *The male in farm animal reproduction*. Boston, Martinus Nijhoff Publishers, 1984a. p.195-201.
- VOSS, J.L., PICKETT, B.W., BACK, D.G., BURWASH, L.D. Effect of rectal palpation on pregnancy rate of nonlactating, normally cycling mares. *J. Anim. Sci.*, v. 41, n.3, p. 829-834, 1975.
- WITTE, A. *Untersuchungen zur Flüssigkonservierung von Pferdesperma unter Verwendung verschiedener Verdünnungsmethoden - Labor - und Felduntersuchungen*. Hannover, Tierärztlichen Hochschule Hannover, 1989. 69p. (Thesis - DMV).
- ZARUEV, N., PARSUTIN, G., RUMJANCEVA, E. Insemination of mares with transported sperm. *Konevodstvo*, v.2, p. 12-16, 1943. *Anim. Breeding Abstracts*, v.11, n.2, p. 87, 1943.

Recebido em: 05/11/96

Aceito em: 04/07/97