

Avaliação de uma Técnica de Diluição e Transporte de Sêmen Equino, para as Condições Brasileiras¹

José Monteiro da Silva Filho², Francisco Aloízio Fonseca³, Maristela Silveira Palhares², Adriana Taveiros Wanderley⁴, Henrique Nunes Oliveira⁵

RESUMO - Noventa e sete fêmeas equínas da raça Mangalarga Marchador foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, com número desigual de repetições, em três tratamentos, para estudar o efeito do sêmen *in natura* (T3) ou diluído, resfriado e transportado para o Haras 1 (T1) e 3 (T2), sobre a fertilidade de éguas inseminadas e sobre várias características da eficiência reprodutiva. As éguas foram inseminadas em dias alternados, com sêmen de apenas um garanhão, alojado no Haras 2, com volumes/dose inseminante variáveis, dependendo do número de éguas a serem inseminadas por dia com determinado ejaculado. Utilizaram-se, para o transporte, o sêmen diluído apenas no diluidor lactose-gema de ovo modificado e o contêiner MSP-2. As condições estressantes de temperatura e transporte não influenciaram as taxas de concepção obtidas. A taxa de concepção, ao primeiro ciclo, para as éguas inseminadas com o sêmen *in natura* não diferiu das observadas para as éguas inseminadas com o sêmen diluído, resfriado e transportado nos Haras I e III. A fertilidade total, obtida com o sêmen diluído, resfriado e transportado, independentemente do haras, foi de 80% (52/65). As seguintes características não foram influenciadas pelos tratamentos: ciclos/égua, ciclos/égua gestante, ciclos/prenhez, prenhez/ciclo, número de IA/égua, número de IA/égua gestante, número de IA/égua vazia e eficiência de prenhez. Observou-se efeito do haras sobre a temperatura da água e do sêmen no contêiner e o tempo médio da colheita à inseminação, em função do tempo e da distância percorrida. Com base nos resultados, o resfriamento e transporte do sêmen equino, usando o diluidor lactose-gema de ovo modificado pela retirada do glicerol e o contêiner MSP-2, podem ser recomendados para curtas distâncias. O uso do sêmen *in natura*, imediatamente após sua colheita, também é recomendado.

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

Evaluation of an Equine Semen Dilution and Transport Technique to Brazilian Conditions

ABSTRACT - Ninety-seven Mangalarga Marchador mares were allocated in a randomized experimental design, with different number of replicates per treatments. The objective of this experiment was to study the effect of raw (T3) or diluted, cooled semen transported to the breeding farms 1 (T1) and 3 (T2), on mare fertility and different aspects of reproductive efficiency. The mares were inseminated, with semen of only one stallion (Farm 2), on alternate days using different inseminating volumes, according to number of inseminated mares per day using only one ejaculate. For transportation, semen diluted in a lactose-egg yolk modified extender and the MSP-2 container were used. There was no difference among treatments in relation to conception rates of mares inseminated with raw or diluted, cooled and transported semen. Regardless of the farm, the total fertility obtained with cooled semen was 80% (52/65). The following variables were not affected by the treatments: cycles/mare, cycles/pregnant mare, cycles/pregnancy, pregnancy/cycle, number of inseminations/mare, number of inseminations/pregnant mare, number of inseminations/open mare and efficiency of pregnancy. However, the breeding farm had an effect on water and semen temperature in the container, time between collection and insemination, according to time and distance covered. Based on the results, cooling and transporting equine semen, using an extender, lactose-egg yolk without glycerine and the MSP-2 container should be recommended for short distances. The use of raw semen immediately after collection is also recommended.

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

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

² Escola de Veterinária da UFMG, Caixa Postal, 567 - 30161-970 - Belo Horizonte, MG.

³ Departamento de Zootecnia - UFV - Viçosa, MG.

⁴ Médica Veterinária Autônoma.

⁵ Departamento de Zootecnia - FMVZ - UNESP - Botucatu, SP.

Introdução

O uso do sêmen transportado tem numerosas vantagens para os criadores de eqüinos: a) elimina os custos e os diversos estresses associados ao transporte de éguas, potros e garanhões, b) aumenta o “pool” gênico, c) reduz a utilização de garanhões geneticamente inferiores, d) elimina os custos envolvidos na manutenção e nos cuidados com a égua visitante, e) reduz a probabilidade de transmissão de doenças entre haras, f) permite a utilização de garanhões sem interrupção de sua participação em atividades esportivas e g) facilita o estabelecimento de condomínios de garanhões, sem incorrer em custos adicionais de transporte de éguas ou garanhões (SQUIRES et al., 1988). Entretanto, seu sucesso dependerá da preservação dos espermatozóides durante prolongado período de tempo, sem perda de sua capacidade fecundante. Utilizando-se esta tecnologia, DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984) obtiveram taxas de concepção satisfatórias, ao inseminarem éguas alojadas em 23 Estados dos Estados Unidos da América, com o sêmen diluído, resfriado e transportado empregando linhas aéreas estaduais. Em um outro estudo, DOUGLAS-HAMILTON et al. (1987) inseminaram éguas alojadas em diferentes Estados dos EUA e até mesmo no Canadá, com taxas de concepção de aproximadamente 83%. Também VAN DER HOLST (1984_a) obteve taxas de concepção de 81% (47/58), 100% (4/4) e 100% (6/6) para três garanhões, em um programa, utilizando sêmen transportado, na Holanda, com mais de três dias de conservação. Para que resultados como os apresentados anteriormente fossem possíveis, consideráveis recursos e esforços de pesquisa foram empregados, resultando no estabelecimento das condições ideais para o resfriamento, a estocagem e o transporte do sêmen de garanhões.

Um sistema de transporte de sêmen entre haras e entre Estados dentro do País poderia dar outra dimensão ao estabelecimento de condomínios de garanhões, ao acasalamento orientado para obtenção de futuros reprodutores, bem como nova amplitude na utilização da transferência de embriões, sem incorrer no transporte de garanhões ou éguas. Possivelmente, a tecnologia seria mais facilmente difundida, se não estivesse associada a qualquer tipo de importação (diluidor, contêiner, etc). Nestas condições, pretendeu-se realizar este experimento, cujos principais objetivos foram: desenvolver uma tecnologia integralmente nacional para o transporte do sêmen

eqüino diluído e resfriado; confirmar a adequação do contêiner MSP-2 para o transporte do sêmen eqüino; confirmar a eficiência do diluidor lactose-gema de ovo modificado, pela retirada do glicerol de sua fórmula, sem prévia centrifugação, para diluição do sêmen a ser resfriado e transportado; e verificar os possíveis efeitos de haras sobre a fertilidade do sêmen diluído, resfriado e transportado.

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 outubro de 1988 a abril de 1989 (estação de monta 1988/1989). Foram utilizadas 97 fêmeas eqüinas 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: T1 - éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado para o Haras 3 (n=53); T2 - éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado para o Haras I (n=12); T3 - éguas inseminadas com sêmen a fresco, não diluído, no próprio local da colheita no Haras 2 (grupo controle; n=32). As éguas dos tratamentos 1 e 2 foram inseminadas com sêmen diluído no diluidor de NAGASE e NIWA (1964), modificado pela retirada do glicerol de sua formulação.

Utilizou-se o sêmen de apenas um garanhão, da raça Mangalarga Marchador, com sete a oito anos de idade, pertencente a um condomínio (Haras 1, 2 e 3) para inseminar as éguas envolvidas no experimento.

Para o transporte do sêmen diluído, 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 foi esquematizado no trabalho de SILVA FILHO et al. (1998) e todas as características ideais de resfriamento foram descritas pelos autores.

No dia anterior às colheitas de sêmen, fez-se avaliação de todas as éguas a serem inseminadas. O volume de sêmen, que seria utilizado em cada égua, esteve sempre ligado ao volume do ejaculado e ao número de éguas a serem inseminadas com sêmen a fresco, não diluído (Haras 2) e com o diluído, resfriado e transportado (Haras 1 e 3). Entretanto, independentemente do volume a ser transportado, a taxa de diluição foi rigorosamente de 1:1, durante toda a estação de monta.

As colheitas foram realizadas de 48 em 48 horas, por meio de uma vagina artificial modelo Hannover, utilizando-se como manequim uma égua em cio, devidamente contida. Após a colheita, o sêmen foi levado ao laboratório, sendo mantido a 37°C em banho-maria, até as inseminações, ou resfriamento. Após a estabilização da temperatura do sêmen a 37°C, procedeu-se à sua avaliação física. Inicialmente, mediu-se o volume livre de gel, devidamente separado, durante a colheita, em proveta graduada, previamente aquecida a 37°C. Em seguida, avaliaram-se a motilidade e o vigor, em microscópio óptico a 100x e 400x, utilizando-se uma gota de sêmen a fresco, colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas, a 37°C.

Após a preparação do contêiner para o transporte, procedeu-se à inseminação das éguas do Haras 2 com o sêmen fresco, não-diluído. A seguir, o sêmen, devidamente diluído e em processo de resfriamento no contêiner, foi então conduzido a dois haras, por transporte rodoviário. As inseminações foram realizadas em primeiro lugar no Haras 3 e, em seguida, no Haras 1. Ao chegar nos Haras 1 e 3, mediu-se inicialmente a temperatura da água do contêiner e, posteriormente, a do sêmen. Foram controladas as éguas selecionadas no dia anterior, para determinar o estágio de desenvolvimento folicular ou presença de uma ovulação. Em seguida, a mamadeira com sêmen a ser utilizado naquele haras foi transferida para um frasco com água a 37°C, para reaquecimento do sêmen. Em todas as ocasiões, o sêmen foi homogeneizado e reexaminado após o reaquecimento, em microscópio óptico a 100x e 400x, para a motilidade e o vigor.

Após rigorosa higienização da genitália externa da égua, procedeu-se à inseminação, por via vaginal, por meio de pipetas rígidas, acopladas a seringas com o sêmen via manguito. As inseminações foram realizadas em dias alternados, a partir de um folículo com 3,0 a 3,5 cm de diâmetro, até a ovulação, com deposição do sêmen no corpo do útero. Após as inseminações, realizou-se avaliação do sêmen residual das pipetas de inseminação. Os dados referentes à operação (nome ou número da égua e do haras, horário da inseminação, volume de sêmen diluído utilizado e se pré ou pós ovulação) foram anotados.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o “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 menores entre os tratamentos, utilizando-se um sistema de pontos proposto por VOSS et al. (1975). Para os dados quantitativos (número de IA/égua, número de IA/égua gestante, número de IA/égua vazia, volume utilizado na IA, temperatura da água corrente no Haras 2, temperatura da água no contêiner nos Haras 3 e 1, temperatura do sêmen resfriado nos Haras 3 e 1, tempo médio da colheita à IA), aplicou-se análise de variância, sendo o teste Tukey utilizado para comparar o contraste entre as médias.

Resultados e Discussão

Dados relacionados ao comportamento sexual, à avaliação física do sêmen e ao desempenho reprodutivo do garanhão utilizado durante a estação de monta 1988/1989 estão apresentados na Tabela 1.

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os resultados relacionados aos efeitos dos tratamentos sobre várias características reprodutivas.

As taxas de concepção ao primeiro ciclo não sofreram influência dos tratamentos dados ao sêmen. Ao final de três ciclos, também não se observaram diferenças entre os tratamentos. A taxa de concepção total obtida com o sêmen *in natura* (Haras 2) foi similar à obtida com o sêmen diluído, resfriado e transportado no Haras 3, mas diferente da observada no Haras 1, com o sêmen transportado (Tabela 3). Além disso, as taxas de concepção obtidas com o sêmen transportado não foram influenciadas pelos haras (Tabela 3), sendo de 66,67% (8/12) e 83,02% (44/53) para os Haras 1 e 3, respectivamente.

Não se observaram diferenças entre os tratamentos no que se refere às seguintes características: ciclos/égua, ciclos/égua gestante, ciclos/prenhez, prenhez/ciclo, número de IA/égua, número de IA/égua gestante, número de IA/égua vazia, temperatura da água no Haras 2 e eficiência de prenhez (Tabela 3).

Verificaram-se diferenças ($P < 0,05$) entre os tratamentos quanto ao volume de sêmen utilizado na IA e à temperatura da água e do sêmen no interior do contêiner, nos Haras 1 e 3 e no tempo médio da colheita à IA (Tabela 3).

Neste experimento, utilizou-se a mesma metodologia descrita por SILVA FILHO et al. (1991b), incluindo colheita do sêmen, diluição 1:1 no diluidor lactose-gema de ovo modificado, envasamento em mamadeiras plásticas e acondicionamento no contêiner MSP-2 para o resfriamento e transporte.

Tabela 1 - Avaliação física do sêmen e desempenho reprodutivo do garanhão utilizado na estação de monta (1988/1989)

Table 1 - Physical evaluation of the semen and reproductive performance of the stallion used in the breeding season (1988-1989)

Variável <i>Variable</i>	n	x ± s
Tempo de reação 1 (s) <i>Reaction time 1</i>	79	20,65 ± 14,85
Tempo de reação 2 (s) <i>Reaction time 2</i>	6	29,83 ± 37,31
Tempo de reação 3 (s) <i>Reaction time 3</i>	2	14,50 ± 1,50
Intervalo da ereção à monta 1 (s) <i>Interval between erection and mounting 1</i>	78	14,01 ± 9,75
Intervalo da ereção à monta 2 (s) <i>Interval between erection and mounting 2</i>	7	12,14 ± 6,29
Intervalo da ereção à monta 3 (s) <i>Interval between erection and mounting 3</i>	2	4,00 ± 2,83
Duração da ejaculação 1 (s) <i>Duration of ejaculation 1</i>	76	24,29 ± 6,04
Duração da ejaculação 2 (s) <i>Duration of ejaculation 2</i>	4	33,00 ± 4,18
Intervalo entre ejaculações (dias) <i>Interval between ejaculation (days)</i>	82	2,23
Número de montas/ejaculado <i>Number of mounts/ejaculate</i>	80	1,14 ± 0,41
Volume (mL)	79	87,58 ± 20,22
Motilidade (%) <i>Motility</i>	83	68,04 ± 7,78
Vigor (0-5)	83	3,87 ± 0,39
Número de éguas inseminadas/ejaculado <i>N. of inseminated mares/ejaculate</i>	83	4,14 ± 1,86

Agrupando-se os dados referentes ao sêmen transportado nos Haras 1 e 3, observou-se uma taxa de concepção, ao primeiro ciclo, de 58,46% (38/65). Esta taxa de concepção aproxima-se das observadas com sêmen transportado, diluído no mesmo diluidor, no mesmo período, por SILVA FILHO et al. (1987), 60% (18/30), e SILVA FILHO et al. (1991b) no Haras 1, 64,29% (9/14), e Haras 2, 52,63% (10/19), embora utilizados volumes de sêmen e contêiner diferentes. Deve-se considerar a taxa de concepção satisfatória, 71,43% (10/14), obtida com o sêmen fresco, diluído no mesmo diluidor e utilizado dentro de $27,68 \pm 6,66$ minutos da colheita (SILVA FILHO et al., 1991a). Não foi possível encontrar na literatura trabalhos similares que permitissem comparações mais proveitosas, principalmente no que diz respeito à natureza do diluidor e ao tipo de contêiner.

BERGHUIS (1987) utilizou o sêmen segundo a “metodologia holandesa de transporte de sêmen” e obteve taxa de concepção ao primeiro ciclo de 36,4% (16/44), com concentração mínima de 450×10^6 espermatozoides/dose inseminante. Essa taxa de concepção foi numericamente inferior às obtidas nos Haras 1 e 3 (Tabela 2) e após o agrupamento dos dados. DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984) e

DOUGLAS-HAMILTON et al. (1987) utilizaram a “metodologia americana de transporte de sêmen” e obtiveram taxas de concepção, ao primeiro ciclo, de 65% (30/46) e 59%, respectivamente, similares às observadas no presente experimento, para o mesmo período (Tabela 2).

A taxa de concepção obtida com sêmen *in natura*, no primeiro ciclo, aproxima-se da observada anteriormente por SILVA FILHO et al. (1991a), 78,57% (11/14), e SILVA FILHO et al. (1987), 68,42% (26/38), sendo similar à observada por PICKETT e VOSS (1975), 75% (18/24), no mesmo período, com concentrações de 500×10^6 espermatozoides móveis/dose inseminante.

Ao final de três ciclos, as taxas de concepção/ciclo não diferiram entre os Haras 1, 2 e 3 (Tabela 2). Agrupados os dados dos Haras 1 e 3, obteve-se para o sêmen diluído, resfriado e transportado taxa de concepção/ciclo de 59,09% (52/88). As taxas de concepção/ciclo obtidas neste experimento aproximam-se das obtidas com o sêmen transportado, no mesmo diluidor, por SILVA FILHO et al. (1987) - 62,50% (25/40). Entretanto, foram superiores às observadas por SILVA FILHO et al. (1991b) nos Haras I, 41,67% (10/24) e 2, 51,72% (15/29), para o sêmen

Tabela 2 - Fertilidade do sêmen eqüino *in natura* ou diluído, resfriado e transportado
 Table 2 - Fertility of equine raw semen or diluted, cooled and transported semen

Ciclo <i>Cycle</i>	Sêmen diluído, resfriado e transportado <i>Diluted, cooled and transported semen</i>				Sêmen <i>in natura</i> <i>Raw semen</i>	
	Haras 1 <i>Farm</i>		Haras 3 <i>Farm</i>		Haras 2 <i>Farm</i>	
	Nº ciclos <i>N. cycles</i>	Taxa de concepção(%) <i>Conception rate</i>	Nº ciclos <i>N. cycles</i>	Taxa de concepção <i>Conception rate (%)</i>	Nº ciclos <i>N. cycles</i>	Taxa de concepção (%) <i>Conception rate</i>
1	12 (7) ^a	58,33	53 (31)	58,49	32 (23)	71,88
2	2 (1)	50,00	15 (7)	46,67	8 (6)	75,00
3	-	-	6 (6)	100,00	2 (2)	100,00
Total	14 (8)	57,14	74 (44)	59,46	42 (31)	73,81

^a Números em parênteses referem-se às éguas gestantes (*Numbers in parenthesis refer to pregnant mares*).

transportado no mesmo diluidor, porém centrifugado. Em apenas dois dos trabalhos consultados, utilizando-se o sêmen transportado, foi obtida taxa de concepção/ciclo de 58,33% (42/72), por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984), e 44% (n=2181), por PALMER (1984). Os resultados obtidos no presente experimento aproximam-se dos obtidos por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984), mas foram numericamente superiores aos apresentados por PALMER (1984).

A taxa de concepção/ciclo obtida com sêmen *in natura* aproximou-se das observadas por SILVA FILHO et al. (1991a), 83,33% (15/18), e SILVA FILHO et al. (1987), 64,15% (34/53), sendo similar às taxas de concepção/ciclo de 71% obtida por PICKETT e VOSS (1975) e às de 76% (n=17) e 68% (n=19), obtidas por PALMER (1984), com garanhões submetidos a dois ejaculados/dia ou a colheitas com intervalos de 48:48 h, respectivamente. Contudo, esta taxa apresentou-se numericamente superior à de 40% (n = 25), apresentada por PALMER (1984), em outro experimento.

De certa forma, as taxas de concepção total obtidas no Haras 3, 83,02% (44/53) (Tabela 3) e após o agrupamento dos dados dos Haras 1 e 3, 80% (52/65), podem ser consideradas satisfatórias, principalmente se forem consideradas as apresentadas por VAN DER HOLST (1984ab), BERGHUIS (1987), DE VRIES (1987), DOUGLAS-HAMILTON et al. (1987), BLANCHARD (1988) e PALMER (1989), de 70 a 84%. Entretanto, apresentaram-se numericamente inferiores às descritas por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984), de 91% (42/46), e por VAN DER HOLST (1984a), utilizando pequeno número de fêmeas, de 100% (10/10).

Por outro lado, a taxa de concepção total obtida com o sêmen diluído, resfriado e transportado no Haras I, 66,67% (8/12; Tabela 3), pode ser considerada subótima, estando bem aquém dos resultados obtidos em trabalhos anteriores (SILVA FILHO et

al., 1987; SILVA FILHO et al., 1991b) e por diferentes pesquisadores mencionados anteriormente.

De maneira geral, o diluidor de lactose-gema de ovo, modificado pela retirada do glicerol de sua formulação, mostrou-se eficiente para a diluição do sêmen a ser resfriado e transportado, equivalendo-se, de certa forma, aos diluidores indicados por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984), VAN DER HOLST (1984b) e PALMER (1989). Infelizmente, a utilização de garanhões, taxa de diluição, concentrações, tipo de envasamento, taxas de resfriamento, contêineres e duração de estocagem diferente impossibilitou comparações mais profundas entre eles. Entretanto, deve-se considerar que as condições inadequadas de resfriamento e isolamento do meio exterior, observadas para o contêiner MSP-2, possam ter sido compensadas pelo diluidor de lactose-gema de ovo, principalmente se os resultados aqui obtidos forem acrescentados aos obtidos por SILVA FILHO et al. (1987) e SILVA FILHO et al. (1991b), com o mesmo diluidor.

A taxa de concepção total, obtida com o sêmen *in natura* (Tabela 3), é semelhante à de 89,47% (34/38) encontrada por SILVA FILHO et al. (1987) e aos resultados apresentados por KEDROV (1940) e PICKETT e VOSS (1975), de 85,7% (84/98) e 91,7% (22/24), respectivamente.

Os volumes de sêmen (mL) utilizados neste experimento foram similares nos Haras 1 e 2 e nos Haras 2 e 3, entretanto, diferiram ($P < 0,05$) entre os Haras 1 e 3. Grandes volumes/dose inseminante foram recomendados por KEDROV (1940) e SKATKIN (1950), de 15 a 40 mL. Além disso, SKATKIN (1950) concluiu que o volume mínimo de sêmen diluído, a ser utilizado com sucesso na inseminação artificial de eqüinos, foi de 20 mL, mas um volume de 30 a 40 mL foi mais satisfatório. HUGHES e LOY (1970) recomendaram um volume de 50 mL de sêmen diluído para as inseminações.

Tabela 3 - Avaliação de algumas características reprodutivas de éguas inseminadas com sêmen *in natura* ou diluído, resfriado e transportado

Table 3 - Evaluation of some reproductive characteristics of mares inseminated with raw semen or diluted, cooled and transported semen

Característica Characteristic	Sêmen diluído, resfriado e transportado Diluted, cooled and transported semen		Sêmen <i>in natura</i> Raw semen
	Haras 1 Farm	Haras 3 Farm	Haras 2 Farm
	Número de éguas Number of mares	12	53
Número de ciclos Number of cycles	14	74	42
Ciclos/égua Cycles/mare	1,17	1,40	1,31
Ciclos/égua gestante Cycles/pregnant mare	1,13	1,43	1,32
Ciclos/prenhez Cycles/pregnancy	1,75	1,68	1,35
Prenhez/ciclo Pregnancy/cycle	0,57	0,59	0,74
Número de IA/égua Number of AI/mare	2,36 ± 0,93	2,43 ± 1,06	2,76 ± 1,05
N ^o IA/égua gestante Number of AI/pregnant mare	2,50 ± 0,76	2,43 ± 1,07	2,84 ± 1,04
N ^o IA/égua vazia Number IA/non pregnant mare	2,17 ± 1,17	2,43 ± 1,07	2,55 ± 1,13
Volume utilizado na IA (mL) Volume utilized in AI	29,00 ± 3,96 ^a	23,46 ± 4,38 ^b	25,11 ± 10,87 ^{ab}
Temp. água no Haras 2 (°C) Water temperature Farm 2	25,53 ± 2,74	25,89 ± 2,01	-
Temp. água no contêiner (°C) Water temperature in the container	7,83 ± 1,33 ^a	6,30 ± 0,95 ^b	-
Temp.do sêmen contêiner (°C) Semen temperature in the container	8,94 ± 1,31 ^a	7,20 ± 0,96 ^b	-
Tempo médio da colheita à IA (min) Mean time between collection and AI	157,52 ± 34,43 ^a	111,68 ± 19,67 ^b	23,00 ± 6,66 ^c
Taxa de concepção total (%) Total conception rate	66,87 (8/12) ^a	83,02 (44/53) ^{ab}	96,88 (31/32) ^b
Eficiência de prenhez Pregnancy efficiency	5,57	5,43	6,90

^{a,b,c} Valores na linha seguidos por letras diferentes são diferentes (P<0,05).

^{a,b,c} Values in row followed by different letters are different (P<.05).

PICKETT et al. (1987), compilando dados de vários experimentos, concluíram que o volume da dose inseminante, dentro de uma amplitude de 0,6 a 26,8 mL, não afetou a fertilidade. Entretanto, afirmaram que volumes acima de 30 mL/dose inseminante deveriam ser evitados. Mais recentemente, SQUIRES et al. (1989) demonstraram que volumes acima de 100 mL reduziram a fertilidade. BERGHUIS (1987) utilizou doses de 5 a 40 mL de sêmen *in natura*, desde que tivessem um mínimo de 300 x 10⁶ espermatozóides móveis/dose inseminante. Volumes de 10-20 mL foram utilizados no início da estação de monta e os de 30 - 50 mL, nos dias mais longos, em um sistema de transporte de sêmen diluído e resfriado (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984). Apenas SQUIRES et al. (1989) conduziram um trabalho utilizando um delineamento experimental adequado e concluíram que volumes de 10 mL

permitiram taxa de recuperação de embriões superior às obtidas com volumes de 100 ou 200 mL.

Os volumes de sêmen utilizados neste experimento são compatíveis com os citados anteriormente pelos diversos autores mencionados, representando 1/4 a 1/3 do volume mínimo citado por SQUIRES et al. (1989), como depressor da fertilidade. Como se pode observar na Tabela 3, procurou-se utilizar no sêmen diluído, resfriado e transportado um volume mínimo de sêmen *in natura* de 10 mL, diluído 1:1 no diluidor de lactose-gema de ovo modificado (Haras 1 e 3). Além disso, utilizou-se um volume de 25,11 ± 10,87 mL por dose inseminante, de sêmen *in natura*, para as inseminações no próprio haras.

O sistema de envasamento do sêmen, neste experimento, não foi adequado. A utilização de mamadeiras plásticas permitiu grande agitação durante o

transporte, grande espaço de ar acima do líquido e inadequada relação CO_2/O_2 . Tais aspectos distanciam, em muito, das condições ideais de estocagem, visando-se à manutenção da viabilidade espermática por um longo período de tempo, recomendadas por MILOVANOV et al. (1939), NISHIKAWA (1959), DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984), DE VRIES (1987), HEISKANEN et al. (1987) e HUECK (1990).

A taxa de resfriamento utilizada neste experimento não foi determinada. Entretanto, como se pode observar na Tabela 3, registraram-se as temperaturas da água e do sêmen no interior do contêiner, quando da chegada aos Haras 1 e 3. A temperatura da água e do sêmen observadas no Haras 1 foram superiores ($P < 0,01$) às observadas no Haras 3. Comparando-se os resultados deste experimento com os obtidos por SILVA FILHO et al. (1991b), observa-se, aqui, melhor controle das temperaturas da água e do sêmen no interior do contêiner, para durações similares de estocagem. Tais observações indicam a obtenção de melhor isolamento do contêiner do meio exterior e manutenção de uma temperatura mais uniforme, após a estabilização, por um período de tempo mais longo. Entretanto, faz-se necessário enfatizar, que mesmo com o aprimoramento das condições de resfriamento e transporte obtidas aqui, utilizando-se o mesmo contêiner (MSP-2) e um dos diluidores (lactose-gema de ovo) utilizados pelo mesmo autor, as condições de isolamento do contêiner ainda foram subótimas. Tal afirmativa pode ser comprovada na Tabela 3, em que, acompanhando um aumento do tempo de estocagem, observou-se aumento das temperaturas da água e do sêmen, no interior do contêiner, do Haras 3 para o Haras 1. Além disso, a temperatura média do sêmen foi de aproximadamente 1°C a mais em relação a temperatura da água no interior do contêiner, independentemente do haras (Tabela 3). O aumento da temperatura do sêmen no interior do contêiner associado ao tempo de estocagem foi também observado por HUECK (1990).

A capacidade de isolamento do contêiner MSP-2, utilizado neste experimento, foi inferior à dos três contêineres utilizados por HUECK (1990). Como já demonstrado anteriormente, a temperatura da água e do sêmen no interior do contêiner (Tabela 3) foram alteradas ($P < 0,05$) em decorrência do tempo de estocagem. No contêiner Sarstedt, considerado por HUECK (1990) como o de pior isolamento, uma temperatura similar para o sêmen no Haras 3 só foi alcançada entre 12 e 14 horas de estocagem (7 a

$13,2^\circ\text{C}$); no modelo Celle entre 8 e 10 horas ($7,2$ a $7,5^\circ\text{C}$) e no modelo Equitainer não foi alcançada sequer às 48 horas, quando do final do experimento. No contêiner modelo Sarstedt, uma temperatura idêntica para o sêmen no Haras 1 apenas foi alcançada entre 12 e 14 horas de estocagem (7 a $13,2^\circ\text{C}$); no modelo Celle, entre 24 e 26 horas ($8,5$ a 9°C); e no modelo Equitainer não foi atingida sequer ao final do experimento.

Um contêiner adequado (modelo Sarstedt) tem sido utilizado em diferentes trabalhos, na Holanda, envolvendo o sêmen transportado. Para períodos de estocagem de 24-72 horas, > 72 horas e 18-24 horas, foram citadas taxas de concepção de 70% (312/446) por VAN DER HOLST (1984b), de 83,82% (57/68) por VAN DER HOLST (1984a) e de 84% (34/44) por BERGHUIS (1987), utilizando o mesmo contêiner. Por outro lado, um contêiner bem mais sofisticado (modelo Equitainer) foi proposto por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984) e utilizado posteriormente por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1987) e BLANCHARD (1988), com taxas de concepção de 91% (42/46), 83% (87/105) e 80% (30/37), respectivamente, após um período de estocagem de no máximo 24 horas. As taxas de concepção obtidas aqui, utilizando-se o sêmen transportado no contêiner modelo MSP-2 para os Haras 1 (66,67%) e 3 (82,02%), e após o agrupamento dos dados dos Haras 1 e 3 - 80% (52/65), podem ser consideradas satisfatórias, apesar dos reduzidos tempos de estocagem utilizados (Tabela 3).

As temperaturas finais de estocagem do sêmen utilizadas neste experimento foram de $7,20 \pm 0,96^\circ\text{C}$ e $8,94 \pm 1,31^\circ\text{C}$ ($P < 0,05$), para os Haras 3 e 1 (Tabela 3), respectivamente. Temperaturas finais de 2 a 8°C têm sido recomendadas com sucesso para o sêmen diluído, resfriado e transportado por NISHIKAWA (1959), VLACHOS e PASCHALERI (1965), VAN DER HOLST (1984b), DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984), DOUGLAS-HAMILTON et al. (1987) e PALMER (1989).

Em experimentos *in vivo*, tendo como ponto final a obtenção de taxas de concepção ou de recuperação de embriões, não parece haver diferenças entre temperaturas de estocagem de $4-5^\circ\text{C}$ e 20°C , principalmente quando as éguas são inseminadas com o sêmen estocado, dentro de um período máximo de 24 horas (PALMER, 1984; SQUIRES et al., 1988; GUAY et al., 1989; VARNER et al., 1989). Entretanto, quando o sêmen foi conservado por um período de 48 horas, as taxas de concepção obtidas com o

sêmen estocado a 5°C foram superiores às obtidas com o sêmen mantido a 20°C (SQUIRES et al. , 1988; GUAY et al. , 1989). Além disso, deve-se levar em consideração as observações feitas por SQUIRES et al. (1988), segundo as quais o sêmen diluído pode ser resfriado a 5 ou 20°C por um período máximo de 12 horas, sem que se observe qualquer efeito adverso sobre a fertilidade. Entretanto, quando a estocagem é por um período superior a 12 horas, o sêmen da maioria dos garanhões poderia manter a viabilidade, por um período mais longo, quando resfriado lentamente para 5°C e assim conservado, até a sua utilização.

Conclusões

Nas condições de realização do experimento, pode-se concluir que a tecnologia inédita gerada, incluindo o diluidor usado, lactose-gema de ovo modificado pela retirada do glicerol e o contêiner MSP-2, pode ser recomendada para criadores e técnicos, envolvidos com a utilização do sêmen resfriado, estocado e, ou, transportado para curtas distâncias. Para inseminações no haras, recomenda-se a utilização do sêmen *in natura*, imediatamente após a sua colheita, em virtude das altas taxas de concepção obtidas.

Referências Bibliográficas

- BERGHUIS, G. A. Verzend sperma versus vers sperma in relatie tot bevruchtingsresultaten. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, v.112, n.24, p. 1410-1412, 1987.
- BLANCHARD, J. Ann. De L'étalon Sport France. 194-195. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11, 1988. Dublin. *Proceedings...* Dublin: University College Dublin, 1988. v.5, p. 354-362.
- De VRIES, J.P. Evaluation of the use fresh, extended, transported stallion semen in the Netherlands. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 4, 1986. Calgary. *Proceedings...* J. Reprod. Fertil., v.35, p.641, 1987.
- 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, 1986. Calgary. *Proceedings...* J. Reprod. Fertil., v.35, p.649-650, 1987.
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H., OSOL, R., OSOL, G. et al. A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, v.22, n.3, p. 291-304, 1984.
- GUAY, P., VAILLANCOURT, D., ZIDANE, N., et al. Preservation of stallion semen. *Pratique Vét, Équine*, v.21, n.2, p.12-14, 1989.
- 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, 1986. Calgary. *Proceedings...* J. Reprod. Fertil., v.35, p103-107.1987.
- HUECK, C. *Untersuchungen zur Flüssigkonservierung von Pfedesperma unter Verwendung verschiedener Kühl- und Transportsysteme - Laborstudie*. Hannover, Tierärztlichen Hochschule Hannover, 1990. 89p. (Thesis - DMV).
- HUGHES, J.P., LOY, R.G. Artificial insemination in the equine. A comparison of natural breeding and artificial insemination of mares using semen from six stallions. *Cornell Veterinary*, v.60, p463-475, 1970.
- KEDROV, V. Artificial insemination of mares after observed ovulation and with varying numbers of spermatozoa. *Konevodstvo*, v.1, p.15-16,1940; *Anim. Breed. Abstr.*, v.11 p.85, 1943.
- MILOVANOV, V.K., LIHACEV, A.N., ZEVANOVA, T.A. Preservation of the fertilising ability of stallion semen by artificial anabiosis. *Sovetsk. Zooteh.*, v.4, p31-43, 1939. In: *Anim. Breed. Abst.*, v.8, p110, 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. Equine artificial insemination in France. In: ENCONTRO NACIONAL DE EQUIDECULTURA, 5, 1989. Maringá, PR. *Anais...* Maringá: UEM, p.63-75,1989.
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10, 1984. Urbana - Champaign. *Proceedings...* Urbana-Champaign, University of Illinois., v3, p377-379. 1984.
- PICKETT, B.W., VOSS, J.L. The effect of semen extenders and sperm number on mare fertility. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 1, 1974. Cambridge. *Proceedings...* Cambridge, p.95-98. 1975.
- PICKETT, B.W., SQUIRES, E.L., MCKINNON, A.O. *Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination*. Fort Collins. Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory, 1987 (Bulletin, 3).
- 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. CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991. Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, p.365, 1991a.
- SILVA FILHO, J.M., PALHARES, M.S., FONSECA, F.A., et al. Fertilidade do sêmen equino transportado. II- Efeito de diluidores na fertilidade de éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado em transportado em contêiner especial. CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991. Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte, p.369, 1991b.
- SILVA FILHO, J.M., PALHARES, M.S., BERGMANN, J.A.G. Inseminação artificial em equinos incluindo transporte de sêmen. CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7, 1987. Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, p.78, 1987.
- SILVA FILHO, J.M., FONSECA, F.A., PALHARES, M.S. et al. Efeito de diferentes diluidores na fertilidade de éguas de diferentes haras, inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado em contêiner especial. *R. Soc. Bras. Zootec.*, v.27, n.1, p., 1998.
- SKATKIN, P.N. Some theoretical and technical problems relating to artificial insemination in the mare. *Konevodstvo*, v.4, p.9-23, 1950. In: *Anim. Breed. Abstr.*, v.18, p.852, 1950.

- SQUIRES, E.L., AMANN, R.P., MCKINNON, A.O. et al. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5°C or 20°C. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11, 1988 Dublin. *Proceedings...* Dublin, University College Dublin, 1988. V.54, n.3, 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...* American Association of Equine Practitioners, p.25-30. 1989.
- VANDER HOLST, W. De huidige en de toekomstige ontwikkeling van de K.I. bij paarden in Nederland. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, v.53, p302-307, 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. p195-201.
- 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, p515-525, 1989.
- VLACHOS, K., PASCHALERI, E. Research on some factors influencing fertility in solipeds. *Bull. Physiol. Path. Reprod. Artif. Insem.*, v.1, p.18-32, 1965. In: *Anim. Breed. Abstr.*, v.37, p1227, 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, p.829-834, 1975.

Recebido em 06/12/96

Aceito em 04/07/97