

**ANÁLISE DE PROTOCOLOS DE INSEMINAÇÃO EM TEMPO FIXO COM SÊMEN
DESCONGELADO DILUÍDO E NÃO DILUÍDO EM ÉGUAS MANGALARGA
MARCHADOR**

PAULA GOMES RODRIGUES¹, MARINA BOTTREL REIS NOGUEIRA², RENATO CAMPOS
ANDRADE³, LUCAS FERREIRA GUERRA⁴, RAFAELA RODRIGUES DE CARVALHO⁵, JOSÉ
CAMISÃO DE SOUZA⁶

RESUMO: Devido à utilização cada vez mais frequente da inseminação artificial com sêmen congelado, inúmeras pesquisas vêm sendo feitas para melhorar os resultados desta técnica para a espécie equina. O objetivo foi avaliar *in vivo* os efeitos da diluição seriada do crioprotetor dimetil-formamida sobre o sucesso da inseminação artificial de éguas Mangalarga Marchador em um tempo fixo de 20 horas após indução da ovulação. Foram testados o sêmen descongelado diluído (n=27) ou não diluído (n=27). A taxa de prenhez foi avaliada dentro de cada tratamento, dentro de diferentes classes de idade das éguas e de acordo com o tempo transcorrido entre ovulação e inseminação. A taxa de prenhez foi maior em éguas inseminadas com sêmen descongelado diluído (42,9%) em relação àquelas inseminadas conforme metodologia convencional (4,8%), sem a diluição do sêmen. Éguas cuja ovulação ocorreu até 16 horas após a inseminação apresentaram maior taxa de prenhez (33,3%) em relação àquelas que ovularam após 16 horas (5,9%). A idade das éguas não influenciou a taxa de prenhez. Reduzir o estresse osmótico por meio da diluição seriada do sêmen incrementa a taxa de prenhez, além disso, um período inferior a 16 horas entre a inseminação artificial e ovulação foi um fator determinante para a melhora da taxa de fertilização das éguas. Inseminações com menor concentração espermática e de crioprotetores são menos nocivas ao trato reprodutivo da égua.

Palavras-chave: Crioprotetor, Diluição seriada, Eficiência reprodutiva, Fertilidade

INTRODUÇÃO

Dada a notoriedade do interesse comercial pelo uso da técnica de inseminação artificial (IA) com sêmen congelado, pesquisas na área de criopreservação de sêmen equino têm sido constantemente desenvolvidas, embora seus resultados sejam ainda pouco satisfatórios no que diz respeito aos índices de fertilidade.

Segundo Watson (2000), a criopreservação de sêmen equino ainda não atingiu uma padronização de técnica que proporcione resultados satisfatórios e repetitivos, como ocorre na espécie bovina. A maior limitação ao uso do sêmen congelado na espécie equina decorre da grande variabilidade individual na congelabilidade espermática, em virtude de fatores genéticos e ambientais (Ecot et al., 2000).

Muitos estudos têm como foco a identificação dos danos causados aos espermatozoides durante o processo de congelamento e descongelamento. Parece haver duas classes de danos espermáticos: o oxidativo e o osmótico. Para uma melhoria na sobrevivência espermática pós-congelamento é imprescindível minimizar estes danos.

Para o processo de criopreservação, é necessário o uso de agentes crioprotetores junto ao sêmen para manutenção da viabilidade espermática, uma vez que protegem tais células dos danos causados pelo choque térmico devido à formação de cristais de gelo, desidratação e posterior descongelamento (Snoeck et al., 2007; Alvarenga et al., 2005).

¹Zootecnista, Doutoranda em Produção Animal, DZO/UFLA, paulagrodrigues@hotmail.com

²Médica Veterinária, Mestranda em Reprodução Animal, DMV/UFLA, mabottrel@yahoo.com.br

³Graduanda em Zootecnia, DZO/UFLA, otaner51@hotmail.com

⁴Graduando em Zootecnia - DZO/UFLA, lucasferreiraguerra@yahoo.com.br

⁵Graduanda em Medicina Veterinária, DMV/UFLA, rrodrigues_carvalho@hotmail.com

⁶Professor Adjunto, DZO/UFLA, jcamisao@dzo.ufla.br

No entanto, esses agentes também causam efeitos tóxicos deletérios às células espermáticas quando adicionados ou retirados destas. Acredita-se que a variação no volume celular decorrente da entrada e da saída do crioprotetor e da água (choque osmótico) seja uma das principais causas da baixa viabilidade do sêmen após o descongelamento (Ball & Vo, 2001).

Para o sucesso da IA com sêmen congelado, além da necessidade de utilização de protocolos de pós-descongelamento comprovados, é essencial contar com um bom histórico reprodutivo das éguas que serão utilizadas. Deve-se realizar o acompanhamento folicular diário e utilizar a melhor técnica para a deposição do sêmen no ambiente uterino.

O objetivo foi avaliar *in vivo* os efeitos da diluição seriada do crioprotetor dimetilformamida antes da inseminação artificial de éguas em um tempo fixo de 20 horas após indução da ovulação, utilizando sêmen descongelado diluído ou não diluído, sobre a proporção de éguas prenhes.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Floresta – Haras Porteira de Tábua (Três Pontas, Minas Gerais), durante o período de setembro de 2009 a fevereiro de 2010. Foram utilizadas 27 éguas Mangalarga Marchador, férteis, previamente vermifugadas e com idade entre 3 e 15 anos.

Os tratamentos experimentais foram: tratamento A – éguas (n=27) inseminadas com sêmen descongelado não diluído (metodologia tradicional); e tratamento B – éguas (n=27) inseminadas com sêmen descongelado diluído em etapas. Todas as éguas foram utilizadas em ambos os tratamentos, um grupo de éguas foi primeiramente alojado no tratamento A, e após detecção ou não de prenhez passaram a fazer parte do tratamento B; enquanto que no outro grupo as demais éguas iniciaram o experimento no tratamento B e depois foram alojadas no tratamento A.

Após o diagnóstico de prenhez por meio de ultrassonografia (Aloka SSD 500V e frequência de 5Mhz) 15 dias após a condução do primeiro tratamento ao qual o animal foi submetido, foi aplicado 1 ml / égua de cloprostenol luteolítico via intramuscular (Lutalyze[®], São Paulo, Pfiser) de maneira a induzir o retorno à atividade ovariana e permitir a entrada deste animal no segundo tratamento.

Em ambos os tratamentos as éguas foram acompanhadas diariamente por meio ultrassonografia até a detecção de edema uterino e de pelo menos um folículo dominante com, no mínimo, 35 mm de diâmetro. Os animais foram então submetidos à aplicação endovenosa de 6 mg de extrato de gonadotrofina coriônica equina, substância indutora da ovulação. A IA foi realizada 20 horas após a indução da ovulação e o sêmen foi depositado no corno uterino correspondente ao ovário que continha o folículo dominante. Após a IA, a égua foi acompanhada ecograficamente a cada 2 horas para determinação exata do tempo transcorrido entre a indução e ovulação.

As éguas foram alojadas em pastagem de grama batatais (*Paspalum Notatum*), capim jaraguá (*Hiparrhenia rufa*) e capim gordura (*Melinis Minutiflora*) em sistema de pastejo contínuo. Água e sal mineral foram disponibilizados à vontade.

Foi utilizado sêmen de um único garanhão Mangalarga Marchador de 8 anos de idade e em perfeitas condições reprodutivas. Foi utilizado o meio de congelamento comercial Botucio[®] (Biotech[®], Botucatu, São Paulo), contendo dimetil formamida como crioprotetor. Foram congeladas 7 partidas em dias alternados com auxílio de vagina artificial. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml devidamente identificadas, com concentração espermática média de 100 milhões de espermatozóides viáveis. Foram utilizadas 3 palhetas por égua em cada IA, tanto no tratamento A quanto no B.

No tratamento A o descongelamento do sêmen foi realizado mantendo-se a palheta congelada a 45°C durante 20s, após este período foi feita a IA. No tratamento B o descongelamento inicial foi feito da mesma maneira que no A. Após o descongelamento da palheta, para se fazer a diluição, as mesmas foram armazenadas em tubos de microcentrífuga previamente esterilizados, aquecidos à 37°C e acrescentado 1,5 ml de diluente Botusêmen[®] (diluição 1:1) (Biotech[®], Botucatu, São Paulo). Passados 3 minutos, foram adicionados mais 3 ml de Botusêmen[®] (diluição 1:1), totalizando 6 ml de sêmen que foi utilizado para a inseminação das éguas. Pelo fato do Botusêmen[®] não conter crioprotetor, a diluição seriada fez com que a concentração do crioprotetor passasse de 5% nas palhetas após o descongelamento; para 2,5% à primeira diluição e para 1,25% após a segunda diluição.

Análises estatísticas

O programa estatístico utilizado para as análises foi o Statistical Analysis Systems – SAS (SAS®, 1998). O delineamento utilizado foi em ensaio de reversão (*Switch Back*). Para as análises foram criadas classes de idade (Ball et al., 1987), sendo: classe 1 – animais jovens com idade entre 3 e 7 anos; classe 2 – animais mais velhos entre 8 e 15 anos. Foram ainda criadas classes para o tempo transcorrido entre a IA e a ovulação após indução, sendo: classe 1 – tempo variando de 2 a 16 horas entre a IA e ovulação; classe 2 – tempo entre 17 e 36 horas.

Com o objetivo de se comparar a taxa de éguas prenhes em cada tratamento, bem entre as classes de idades definidas e tempo transcorrido entre a IA e a ovulação após indução foi utilizado o teste Qui-Quadrado. Foi realizada ainda análise de variância entre o tempo transcorrido entre a ovulação e a IA com os tratamentos e classes de idades. Para todas as análises o nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de prenhez das éguas inseminadas com sêmen descongelado diluído foi maior ($P<0,05$) do que a proporção de éguas prenhes inseminadas com sêmen descongelado (Tabela 1), seguindo a metodologia tradicionalmente utilizada pelos profissionais de campo.

Tabela 1 – Efeito do método de descongelamento* do sêmen equino sobre a proporção de éguas gestantes após inseminação artificial.

Tratamento ¹	Gestantes (%)	Vazias (%)	Total ²
Sêmen diluído	6 (42,9)	8 (57,1)	14
Sêmen não diluído	1 (4,8)	20 (95,2)	21
Total	7	26	35

*Sêmen diluído: inseminação 20 horas após indução da ovulação com sêmen descongelado na concentração de 5%, diluição com Botucrio® (Biotech®, Botucatu, São Paulo) à 2,5% e 1,25%. Sêmen não diluído: inseminação 20 horas após indução da ovulação, com sêmen descongelado não diluído.

¹ $P=0,005$.

²Algumas éguas (13 éguas para o tratamento com sêmen diluído e 6 para o tratamento com sêmen não diluído) apresentaram falhas reprodutivas e não puderam ser inseminadas (ausência de ovulação, inatividade ovariana e ovulação de folículo menor que 35mm).

A maior taxa de gestação em éguas inseminadas com sêmen diluído pode estar relacionada à redução da osmolaridade deste sêmen (Ball & Vo, 2001). Quando se realiza a diluição após o congelamento, o choque osmótico ao qual o sêmen é exposto quando introduzido no ambiente uterino no momento da inseminação artificial é minimizado, o que pode aumentar a viabilidade dos espermatozóides bem como sua capacidade de fecundação do oócito.

A taxa de prenhez não diferiu ($P=0,16$) entre as classes de idades das éguas (27,3% e 7,7%, respectivamente para éguas com idade entre 3 e 7 anos e entre 8 e 15 anos). Resultados semelhantes foram obtidos por Rodrigues (2009), que não encontrou diferença na taxa de prenhez de éguas doadoras com idade inferior a 6 anos, entre 6 e 13 e superior a 13 anos.

Segundo Ginther et al. (2009), o principal problema das éguas com idade superior a 13 anos está relacionado ao baixo número de oócitos maduros que são produzidos e ovulados a cada ciclo estral. Contudo, a qualidade e capacidade de desenvolvimento e fixação deste oócito no endométrio da após a fertilização permanecem semelhantes entre mais éguas jovens, abaixo dos 13 anos, e as mais velhas, acima desta idade.

A taxa de prenhez das éguas inseminadas em até 16 horas após a ocorrência da ovulação foi superior ($P<0,05$) àquela observada em éguas cuja inseminação ocorreu 16 horas após a ovulação (Tabela 2).

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

Tabela 2 – Efeito das classes de tempo* da ovulação após a inseminação artificial sobre a proporção de éguas gestantes.

Classe de tempo ¹	Gestantes (%)	Vazias (%)	Total ²
Até 16 horas	6 (33,3)	12 (66,7)	18
Mais que 16 horas	1 (5,9)	16 (94,1)	17
Total	7	28	35

*Para análises independentes do tratamento foram criadas classes de tempo em relação ao tempo transcorrido entre a ovulação e a inseminação artificial. Sendo a classe de tempo até 16 horas referente à diferença de tempo entre a ovulação e inseminação entre 2 e 16 horas; já classe de tempo maior que 16 horas se refere às inseminações realizadas 16 horas após a ovulação.

¹P=0,04.

²Algumas éguas (9 éguas para inseminação até 16 horas após a ovulação e 10 para inseminação após 16 horas) apresentaram falhas reprodutivas e não puderam ser inseminadas (ausência de ovulação, inatividade ovariana e ovulação de folículo menor que 35mm).

Possivelmente a qualidade de um oócito 16 horas após a ovulação seja inferior à qualidade de um oócito recém ovulado, o que diminuiria a fertilidade deste gameta, sua capacidade de divisão, implantação uterina, e promoção do reconhecimento materno da gestação, resultando em menor índice de prenhez.

O tempo necessário para a ocorrência da ovulação do folículo dominante, após sua indução com hCG, não foi diferente (P>0,05) entre os dois grupos de éguas inseminadas com sêmen diluído ($20,6 \pm 3,1$ horas) e não diluído ($20,2 \pm 2,5$ horas), ou seja, o efeito observado da diluição do sêmen não sofreu interferência do tempo de ovulação.

O tempo transcorrido entre a indução da ovulação e a ovulação propriamente dita não foi diferente (P>0,05) entre as classes de idades das éguas ($19,8 \pm 2,4$ horas e $21,0 \pm 3,2$ horas, respectivamente para éguas com idade entre 3 e 7 anos e éguas entre 8 e 15 anos).

CONCLUSÕES

Reduzir o estresse osmótico por meio da diluição seriada incrementa a taxa de prenhez em éguas inseminadas em períodos de até 16 horas após a ovulação. Além disso, o tempo transcorrido desde a inseminação artificial até a ovulação foi um fator determinante sobre a taxa de fertilização das éguas. O protocolo estudado pode ser recomendado em programas comerciais de IA com sêmen congelado, mesmo considerando a necessidade maior de manipulação prévia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 105-113, Oct. 2005.

BALL, B. A.; LITTLE, T. V.; WEBER, J. A.; WOODS, G. L. Survival of day 4 embryos transferred from the oviduct of normal and sub-fertile donor mares to the uterus of normal recipient mares. **Theriogenology**, Stoneham, v. 27, n. 1, p. 208-215, Jan., 1987.

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, California, v. 22, n. 6, p. 1061-1069, Mar. 2001.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

ECOT, P.; VIDAMENT, M.; MONARC, A. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 56, p. 141-150, 2000. Jun. Supplement.

GINTHER, O. J.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; JACOB, J. C.; BEG, M. A. Age-related dynamics of follicles and hormones during na induced ovulatory follicular wave in mares. **Theriogenology**, Stonehan, v. 71, n. 8, p. 780-788, Sep., 2009.

RODRIGUES, P. G. **Comparação entre escore de condição corporal e espessura de gordura subcutânea e sua relação com a eficiência reprodutiva de éguas doadoras Mangalarga Marchador**. 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SNOECK, P. P. N.; HENRY, M.; MELO, M. I. V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 1, Fev., 2007.

STATISTICAL ANALYSYS SYSTEMS. **User's guide**: version 6. Cary, NC, 1998. 1686 p.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 481-492, 2000.