



## A arte de inseminar éguas com sêmen congelado

*The art of inseminating mares with frozen semen*

**Carlos Eduardo Camargo**

Curso de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

### Resumo

Nos últimos quinze anos, a equideocultura foi uma atividade em destaque com significativo crescimento no Brasil e no mundo. O Brasil é o segundo país no mundo que mais utiliza transporte de sêmen equino, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e a utilização do sêmen congelado no país vem expandido a cada dia. O índice de prenhez por ciclo, com sêmen equino congelado é variável e oscila entre 25 e 40%. Adicionalmente, sabe-se que o sêmen de alguns garanhões apresenta baixa viabilidade após o descongelamento. A primeira prenhez obtida com sêmen equino congelado foi relatada há cinco décadas. Segundo Cazalez, 2020, é muito difícil recomendar uma dose inseminante padrão para sêmen congelado em equinos. A maioria dos estudos científicos não consegue controlar o efeito de outros fatores “de confusão” como método de processo, fator égua, fator garanhão, técnica de inseminação etc., tornando difícil uma comparação crítica dos mesmos. Rigby et al. (2001) obtiveram taxas de prenhez similares ao se comparar a inseminação artificial profunda em corno uterino com endoscópio e pipeta flexível.

**Palavras-chave:** éguas, inseminação, sêmen congelado

### Abstract

*In the last fifteen years, equine breeding has been a prominent activity with significant growth in Brazil and in the world. Brazil is the second country in the world that most uses equine semen transport, second only to the United States, and the use of frozen semen in the country is expanding every day. The pregnancy rate per cycle with frozen equine semen is variable and ranges from 25 to 40%. Additionally, it is known that the semen of some stallions has low viability after thawing. The first pregnancy obtained with frozen equine semen was reported five decades ago. According to Cazalez, 2020, it is very difficult to recommend a standard insemination dose for frozen semen in horses. Most scientific studies cannot control for the effect of other “confounding” factors such as processing method, mare factor, stallion factor, insemination technique, etc., making it difficult to critically compare them. Rigby et al. (2001) obtained similar pregnancy rates when comparing deep artificial insemination in the uterine horn with an endoscope and flexible pipette.*

**Keywords:** mares, insemination, frozen semen

### Introdução

Nos últimos quinze anos, a equideocultura foi uma atividade em destaque com significativo crescimento no Brasil e no mundo. Em 2015 a indústria do cavalo foi responsável por movimentar cerca de 16 bilhões de reais na economia nacional, empregando cerca de 3 milhões de trabalhadores de forma direta e indireta (Lima e Cintra, 2016).

No entanto, a criação de equinos de alto valor genético enfrenta diversas barreiras. Uma delas se deve ao fato de que a alta seleção genética dessa espécie é baseada no padrão racial e desempenho atlético e não no aspecto reprodutivo, sendo assim diversos animais com problemas de fertilidade são selecionados como reprodutores ou matrizes.

Desta forma, alternativas para melhorar os índices reprodutivos ao mesmo tempo melhorando a genética dos animais são almeçadas pelos criadores, o que incentiva a utilização de biotecnologias ligadas à reprodução como a Inseminação Artificial (IA) e Transferência de Embriões (TE) (Papa et al., 2005).

Por muitas décadas, o desenvolvimento e a utilização da IA na espécie equina estiveram restritos, devido a imposições por muitas associações de criadores que não permitiam a utilização da técnica (Samper; Estrada; Mckinnon, 2007). Recentemente, as legislações em diversos países do mundo se tornaram mais flexíveis, permitindo o registro de potros oriundos dessa biotecnologia, fazendo com que



houvesse um grande impacto na indústria do cavalo em todo o mundo, principalmente a dos USA (Loomis, 2006), da Europa (Aurich; Aurich, 2006) e do Brasil (PAPA et al., 2005).

O Brasil é o segundo país no mundo que mais utiliza transporte de sêmen equino, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e a utilização do sêmen congelado no país vem expandido a cada dia (PAPA et al., 2005).

A utilização do sêmen congelado traz alguns benefícios ao médico veterinário pois existe a facilidade do material estar em seu botijão de nitrogênio no momento da inseminação artificial, não demandando uma coleta de sêmen ou mesmo despesas com envio de sêmen refrigerado via ônibus ou avião.

Porém, o índice de prenhez por ciclo, com sêmen equino congelado ainda é muito variável e oscila entre 25 e 40%. Adicionalmente, sabe-se que o sêmen de alguns garanhões apresenta baixa viabilidade após o descongelamento (Hoffmann et al., 2011).

Quando se opta pela utilização do sêmen congelado, temos de um lado essa tal facilidade, porém de outro temos um sêmen de pior qualidade, com tempo médio de sobrevivência pós descongelamento de mais ou menos 12 horas. Somado a isso, um oócito que suporta em média 8 horas viável pós ovulação. Sendo assim, é necessário um controle folicular bem intenso dessas éguas e uma inseminação artificial muito próxima da ovulação. Atualmente com a qualidade dos hormônios indutores de ovulação, a precisão da ovulação tem facilitado muito a vida do médico veterinário do campo.

O uso de agentes indutores de ovulação é essencial para gerar um prazo confiável para o agendamento de exames de acompanhamento folicular. Existem protocolos de inseminação de dose única e múltipla com taxas de sucesso iguais, permitindo alguma flexibilidade no planejamento do manejo da égua e nos custos associados.

O manejo pós-inseminação geralmente é necessário para resolver quaisquer respostas inflamatórias uterinas indesejadas. Esses tratamentos dependem da égua e de sua resposta individual ao sêmen e aos tratamentos administrados, podendo variar de algumas injeções de ocitocina a múltiplas lavagens uterinas com vários litros de solução fisiológica ou ringer lactato.

A primeira prenhez obtida com sêmen equino congelado foi relatada há cinco décadas e através de congelamento de sêmen da cauda do epidídimo de um garanhão (Barker & Gandier, 1957). A partir desse importante marco científico, várias técnicas foram testadas para a criopreservação espermática utilizando-se diferentes forcas e diluentes de centrifugação, curvas de refrigeração, diluentes de congelamento, crioprotetores e suas concentrações, bem como protocolos de descongelamento (Martin et al., 1979; Samper & Morris, 1998; Squires et al., 2004; Vidament, 2005; Sieme et al., 2008; Rodriguez et al., 2011).

Segundo Cazales, 2020, é muito difícil recomendar uma dose inseminante padrão para sêmen congelado em equinos. A maioria dos estudos científicos não consegue controlar o efeito de outros fatores “de confusão” como método de processo, fator égua, fator garanhão, técnica de inseminação etc., tornando difícil uma comparação crítica dos mesmos.

Um dos poucos estudos retrospectivos com um número considerável de inseminações (> 2000 inseminações), demonstrou que mais de 80% das inseminações com sêmen congelado tiveram entre 400 e 500 milhões de espermatozoides totais por dosagem, usando em média 8 palhetas de 0,5 mL e no local da inseminação no corpo do útero (Samper et al., 2002).

No entanto, se sabe que em situações em que os garanhões que já morreram ou que possuem doses de sêmen muito caras, a utilização de 8 palhetas se torna inviável e com isso ao longo dos anos diversos estudos apareceram com o objetivo de se reduzir a dose inseminante em éguas com sêmen congelado. No início, as técnicas mais comuns eram utilizando a histeroscopia e atualmente devido ao custo do equipamento e a dificuldade de manejo dele, se utiliza uma pipeta flexível de baixo custo.

A técnica de inseminação será determinada pelo número e custo das doses disponíveis por ciclo, pelo estado da égua a ser inseminada e pela fertilidade do sêmen congelado. Se as doses de sêmen forem muito caras ou apenas uma dose estiver disponível, recomenda-se realizar uma única IA profunda na ponta da trompa pós-ovulação com uma pipeta flexível guiada transretalmente.

O número de palhetas por dose dependerá da fertilidade de cada garanhão e da técnica de inseminação. Se a égua a inseminar for uma égua “problema”, suscetível a endometrite pós-cobertura persistente, recomenda-se a realização de uma IA profunda com baixa dose e baixo volume (1 a 4 palhetas) e a aplicação de uma lavagem uterina precoce 2 a 4 horas pós-cobertura IA. Devido a anatomia do sistema reprodutor da égua, a deposição de 5 ou mais palhetas irá favorecer que o sêmen volte para o corpo uterino e não fique próximo da junção útero tubárica.

Em um esforço para aumentar a uniformidade em relação ao número total de espermatozoides por dosagem, a Federação Mundial de Criação de Cavalos de Esporte (www.wbfs.org) estabeleceu um padrão



para dosagens de sêmen congelado entre países membros que implicam o uso de uma dose de inseminação com um mínimo de 250 milhões de espermatozoides móveis progressivos, com uma porcentagem de motilidade progressiva após o descongelamento de pelo menos 35%.

Uma dificuldade encontrada nesse momento é se considerarmos que ao se congelar são introduzidos em cada palheta 100 milhões de espermatozoides móveis e que haja uma perda de 50% na qualidade do material em todo processo, temos então uma dose de 5 palhetas com 50 milhões em cada uma ou seja, a dose recomendada de 250 milhões. Porém, caso esse material descongele com apenas 35 milhões, para obter a mesma dose de 250 milhões serão necessárias 7 palhetas aproximadamente e sabemos que devido à anatomia do sistema reprodutor da égua, esse volume de 3,5 ml provavelmente não irá aderir à junção útero tubárica e irá escorrer para o corpo do útero, trazendo junto uma menor chance de efetivar uma gestação.

Em um estudo envolvendo um grande número de éguas comerciais, Alvarenga et al., 2003 inseminou com doses entre 50 e 75 milhões de espermatozoides pós descongelamento por histeroscopia na junção útero tubárica e 57,2% (95/166) das éguas engravidaram.

Lindsey, et al, 2002 usaram ultrassonografia transretal para verificar o posicionamento da pipeta próximo à ponta do corno uterino; 0 em 10 éguas engravidaram após a deposição de 5 milhões de espermatozoides de um garanhão fértil, em comparação com uma taxa de prenhez de 50% usando inseminação com o uso da histeroscopia.

Rigby et al. (2001) obtiveram taxas de prenhez similares ao se comparar a inseminação artificial profunda em corno uterino com endoscópio e pipeta flexível.

Há uma pressão constante da indústria equina para diminuir a dose necessária para estabelecer gestações para obter um uso mais eficiente do sêmen congelado, melhorar as taxas de gestação do sêmen de garanhões subfêrteis, garanhões oligospermicos e tecnologias emergentes, como sêmen sexado (Brinsko, 2006; Varner et al. 2008; Hayden et al. 2012).

Dois métodos para inseminação de baixa dose de esperma foram relatados: (1) inseminação histeroscópica profunda e inseminação profunda na ponta do corno uterino usando uma pipeta flexível (Brinsko et al. 2003; Hayden et al. 2012).

Embora seja muito difícil comparar resultados de prenhez entre diferentes estudos, devido aos diferentes potenciais de fertilidade de éguas, garanhões, experiência profissional, tudo indica que a deposição de sêmen próximo à junção útero-tubárica (UTJ) com pipeta flexível tem resultados semelhantes ao endoscópio (Brinsko, 2006; Samper e Plough, 2010; Hayden et al., 2012). Ambas as técnicas permitem reduzir drasticamente as doses de inseminantes sem afetar as taxas de prenhez.

No Brasil, algo que vem ocorrendo de forma sistêmica em algumas raças, é a definição de 5 palhetas com dose inseminante. Porém, é sabido que em algumas raças, no entanto, o número de palhetas é restrito e mesmo com 1 ou 2 palhetas as prenhez são obtidas. Vale ressaltar que a importância do operador no momento da técnica também é de extrema relevância na obtenção do sucesso com doses reduzidas. Temos a soma de um comprometimento em cima de um excelente controle folicular de 6 em 6 ou no máximo 8 em 8 horas, com uma técnica perfeita de conduzir a pipeta flexível o mais próximo da junção útero tubárica e depositando o sêmen de forma lenta.

Trabalhando dessa forma, o médico veterinário deve a cada dia se encorajar mais a diminuir as doses inseminantes e deixar de utilizá-las como um protocolo padrão 5 palhetas, mas sim, analisar garanhão por garanhão égua por égua e adequar a melhor dose para cada situação.

### Considerações finais

Vivemos nos últimos anos muitos avanços quando o tema é a inseminação artificial com sêmen congelado. Desde a grande e rápida evolução dos diluentes para congelamento do sêmen equino, bem como um avanço na qualidade dos indutores de ovulação e que somados tornam a vida do médico veterinário mais tranquila quando se trata de sêmen congelado. Há uma tendência que no futuro, o sêmen congelado se torne uma realidade na grande maioria dos criatórios no Brasil pois a facilidade logística que ele entrega é muito maior que qualquer outro tipo de sêmen.

### Referências

**Alvarenga M, Trinque CC, Lima MM, et al.** Utilization of hysteroscopy for the application of stallion frozen semen in commercial programmes. In: Proceedings of the Havemeyer Foundation Workshop on Transporting Gametes and Embryos; 2003. p.27.



- Aurich J., Aurich C.** Developments in european horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reproduction Domestic Animals*, v. 41, n. 4, p. 275-279, 2006.
- Ball BA.** Hysteroscopic and low-dose insemination techniques in the horse. In: Ball BA, editor. *Recent Advances in Equine Reproduction*. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service Website; 2004 p.A0216.1204<http://www.ivis.org>.
- Brinsko S.;** (2006) Insemination doses: How low can we go? *Theriogenology* 66:3 543:550 (Proc. Annual Conference of the Society for Theriogenology).
- Brinsko SP, Rigby SL, Lindsey AC, Blanchard TL, Love CC, Varner DD.** Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally guided insemination at the utero-tubal papilla with low sperm numbers. *Theriogenology* 2003;59:1001-9.
- Cazales Penino, N., et al.** Inseminación artificial con semen congelado equino: reacción inflamatoria, transporte espermático y técnica de inseminación. *Veterinaria (Montev.)* [online]. 2020, vol.56, n.214
- Lima, R. A. S.; Cintra A. G.** Revisão Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: MAPA, ESALQ/USP, 54 p. 2016.
- Lindsey AC, Morris LH, Allen WR, Schenk JL, Squires EL.** Hysteroscopic insemination of low numbers of nonsorted or flow cytometrically sorted spermatozoa. *Equine Vet J* 2002;34:128-32
- Loomis, P. R.** Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. *Veterinary Clinics North American Equine Practice*, v. 22, n. 3, p. 663-676, 2006.
- Manning ST, Bowman PA, Fraser LM, Card CE.** Development of hysteroscopic insemination of the uterine tube in the mare. *Proc Annu Conv Am Assoc Equine Pract* 1998;44:70-1.
- Metcalf ES.** Optimizing pregnancy rates using frozen-thawed equine semen. *Anim Reprod Sci* 2005;89:297-9 [Abstract].
- Morris LHA, Allen WR.** An overview of low dose insemination in the mare. *Reprod Domest Anim* 2002;37:206-10.
- Morris LHA, Tiplady C, Allen WR.** Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Vet J* 2003;35:197-201.
- Morris LHA.** Low dose insemination in the mare: an update. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:625-32.
- Morris, L.H.A., Hunter, R.H.F., Allen, W.R.** Hysteroscopic insemination of small number of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *J. Reprod. fertil. Cambridge, Inglaterra*, v.118, p. 95-100, 2000.
- Pace MM, Sullivan JJ.** Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *J Reprod Fertil* 1975;23(Suppl. 23):115-21.
- Papa, F. O.** et al. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p. 19-27, 2005. Suppl. 1.
- Papa, F. O.** et al. Inovações metodológicas na Biotecnologia de refrigeração e congelamento de sêmen equino. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 19, 2005, Angra dos Reis. Anais da 19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. 2005. p. 19-27.
- Papa, F.O., Dell' Aqua Júnior, J.A.** Efeito do tipo de envasamento e método de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade de sêmen congelado equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, São Paulo. v.25, p. 458-46, 2001.
- Petersen MM, Wessel MT, Scott MA, Liu IKM, Ball BA.** Embryo recovery rates in mares after deep intrauterine insemination with low numbers of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology* 2002;58:663-5 [Abstract].
- Rigby S.L., et al.** Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or rectally guided utero-tubal insemination with low numbers. *Anim Reprod Sci. Champaign, US.* v.68, p. 331-333, 2001.
- Salzman AA.** The injection of sperm into the horns of the uterus in the artificial insemination of mares. *Probl Zivotn* 1937;5:164-5.
- Samper, J. C., et al** Insemination with frozen semen. In: *Current therapy in equine reproduction*. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2007. p. 285-288.
- Silva Filho, J. M.** Aspects of the reproductive handling and of the semen in the artificial insemination in mares. 1994. 402 f. Thesis (Doctor Scientiae) – Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1994.
- Silva Filho, J. M.; Palhares, M. S.; Bergmann, J. A. G.** Inseminação artificial e transporte de sêmen equino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1987. 7., CBRA, Belo



Horizonte. Anais... São Paulo: Foundation Cargil, 1987. p. 78.

**Squires EL.** Integration of future technologies into the equine industry. *Anim Reprod Sci* 2005;89:187–98.

**Vazquez JJ, Medina VM, Liu IKM, Ball BA, Scott MA.** Non- surgical uterotubal insemination in the mare. *Proc Annu Conv Am Assoc Equine Pract* 1998;44:68–9.

**Volkman DH, vanZyl D.** Fertility of stallion semen frozen in 0.5 ml straws. *J Reprod Fertil* 1987;23(Suppl. 35):143–8.

---