

## ASPECTOS RELACIONADOS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN CONGELADO EQUINO: REVISÃO DE LITERATURA

Marcélio Leite de Oliveira<sup>1</sup>, Olival Martinelli Tristão de Oliveira<sup>1</sup>, Paulo Roberto Souza de Oliveira<sup>1</sup>; Maria Clara Viana Barroso Tramontana<sup>2</sup>; André Torres Geraldo<sup>2</sup>; Adriano Lima Stelzer Bindaco<sup>2</sup>; Maria Carolina Toni<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária

<sup>2</sup> Docente Centro Universitário Multivix – Vitória

### RESUMO

Atualmente, as biotécnicas da reprodução vêm crescendo e se destacando no mercado equino, principalmente em busca da melhoria de eficiência reprodutiva com os diferentes tipos de sêmen, sobressaindo-se o congelado diante das suas vantagens como a exemplo o rompimento das barreiras geográficas e disseminação da genética. O objetivo dessa revisão foi discutir os critérios de seleção de éguas e garanhões, especialmente a utilização desse tipo de sêmen nos processos de inseminação artificial (IA) e os fatores relevantes para o seu sucesso com a utilização de sêmen equino congelado, dentre eles o número total de espermatozoides por dose inseminante, o número de inseminações realizadas por estro, a técnica utilizada para a deposição do sêmen, o momento ideal para a inseminação, bem como nuances relacionados a características fisiológicas das éguas, como, por exemplo, a suscetibilidade a endometrite pós cobertura/inseminação. A metodologia empregada foi a revisão bibliográfica, realizada em artigos publicados nas bases de dados da Scielo, BVS, PUBVET e Science Direct. Verificou-se que uma dose mínima recomendada para inseminação artificial convencional no corpo do útero com sêmen congelado foi estabelecida em  $250 \times 10^6$  espermatozoides com motilidade progressiva, porém essa concentração espermática dependerá das individualidades de cada garanhão e, especialmente, do local de deposição seminal. Em suma, a biotécnica de inseminação artificial com sêmen congelado será determinada com base em diversos aspectos, dentre eles o status da égua a ser inseminada e a fertilidade do sêmen congelado.

Palavras-chave: Fertilidade. Inseminação. Sêmen. Congelado. Equinos.

### ABSTRACT

Currently, reproductive biotechniques have been growing and standing out in the equine market, mainly in search of improving reproductive efficiency with different types of semen, with frozen semen standing out given its advantages, such as the breaking of geographical barriers and the dissemination of genetics. The objective of this review was to discuss the selection criteria for mares and stallions, especially the use of this type of semen in artificial insemination (AI) processes and the relevant factors for its success with the use of frozen

equine semen, including the number total sperm per insemination dose, the number of inseminations performed per estrus, the technique used for semen deposition, the ideal time for insemination, as well as nuances related to physiological characteristics of mares, such as, for example, susceptibility to endometritis post mating/insemination. The methodology used was a bibliographic review, carried out on articles published in the Scielo, VHL, PUBVET and Science Direct databases. It was found that a minimum recommended dose for conventional artificial insemination in the body of the uterus with frozen semen was established at  $250 \times 10^6$  spermatozoa with progressive motility, however this sperm concentration will depend on the individualities of each stallion and, especially, on the site of seminal deposition. In short, the biotechnique of artificial insemination with frozen semen will be determined based on several aspects, including the status of the mare to be inseminated and the fertility of the frozen semen. Keywords: Fertility. Insemination. Semen. Frozen. Equines.

## INTRODUÇÃO

A fertilidade consiste na capacidade de machos e fêmeas produzirem descendentes, nascidos de um óvulo ou depois de levar uma gestação a termo. A espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo. Contudo, com a utilização de biotecnologias de reprodução como a Inseminação Artificial, tem possibilitado melhor aproveitamento dos animais, bem como êxito no processo reprodutivo (BARBOSA et al., 2017). É uma técnica singular muito utilizada visando o melhoramento genético dos animais, já que um reprodutor selecionado pode ser utilizado para inseminação de várias fêmeas anualmente (HAFEZ, HAFEZ, 2004).

Durante a reprodução natural, um garanhão depositará milhões de espermatozoides dentro do ambiente intrauterino da égua (ZIRKIN; PAPADOPOULOS, 2018). Entre essa população, há uma ampla gama de espermatozoides viáveis, o que representa a capacidade do sêmen de fertilizar um ovócito e produzir descendentes (EVANS et al., 2014). Embora alguma variação na morfologia e fisiologia do esperma entre indivíduos da mesma espécie ou dentro de uma ejaculação não afete os desfechos de fertilização e desenvolvimento de embriões, alguns parâmetros estão correlacionados com os resultados de fertilização, desenvolvimento de embriões e prenhez.

Nas últimas décadas, houve avanços nos programas de inseminação com sêmen congelado em equinos. Em geral, os garanhões que são utilizados em programas de

inseminação artificial com sêmen congelado não são selecionados por sua eficiência reprodutiva, mas por seu mérito genético, desempenho individual e outras variáveis de mercado, o que cria um grande desafio para a obtenção de índices reprodutivos satisfatórios (BARRANDEGUY; THIRY, 2012). No entanto, avanços importantes foram feitos nessa biotécnica, que permitem compensar certas situações de mau prognóstico. Entre eles estão o cateter flexível para inseminação profunda na ponta do corno uterino, sem influência na reação inflamatória uterina (ALVES et al, 2017), o uso de análogos de GnRH (Hormônio Liberador de Gonodrofinas) e HCG (Gonodrofina Coriônica Humana) para indução da ovulação (FARIAS et al, 2016), melhorias nos métodos de seleção e concentração de espermatozoides, métodos de congelamento e entre outros (MOORE; HASLER, 2017).

A utilização de sêmen congelado para a inseminação de éguas oferece algumas vantagens ao médico veterinário e proprietário em relação ao sêmen refrigerado, tais como: (a) os garanhões podem ser coletados em uma época específica do ano, sem a necessidade de adequá-lo às demandas do ciclo reprodutivo da égua, permitindo-lhe assim um desempenho melhor esportivo; (b) o sêmen de garanhões que, por algum motivo perca a qualidade, ou mesmo de animais que vieram a óbito e tiveram seu sêmen congelado e preservado; (c) o sêmen pode ser mantido congelado por tempo indeterminado no botijão de nitrogênio no Haras, além de permitir a importação de sêmen de garanhões de diversos continentes; (d) há menos desperdício de sêmen, pois todo o ejaculado pode ser processado na forma de doses inseminantes (CASTRO et al., 2017).

Apesar dos avanços a inseminação com sêmen congelado, apesar de emergente, ainda não substituiu a realizada com sêmen fresco ou refrigerado na produção equina diante as taxas de prenhez reduzidas de alguns garanhões, bem como as nuances relacionadas ao processamento do sêmen congelado, além das características e diversas técnicas e estratégias de inseminação utilizadas por veterinários e centros de criação de equinos (AURICH et al, 2020).

Além disso, percebe-se a maior fragilidade do sêmen congelado, o que remete a redução de sua longevidade, devido alterações na "capacitação" do espermatozoide durante o processo de congelamento/descongelamento, o que implica na redução da fertilidade em comparação a outras técnicas, como a utilização e sêmen congelado ou resfriado. Essa redução, que ocorre posteriormente ao congelamento e descongelamento do sêmen, está relacionada aos danos sofridos pelas células, que

são afetadas principalmente em aspectos como motilidade e vigor, e nas estruturas das membranas plasmáticas (ATAÍDES et al, 2021). Análises científicas sugerem que, diante a individualidade de cada garanhão, alguns espermatozoides presentes no sêmen congelado possam permanecer viáveis no trato reprodutivo da égua por 48h, porém a grande maioria dura em torno de 12h. Dessa forma, torna-se necessário o uso de protocolos de inseminação que exigem manejo intensivo das éguas, aumentando assim os custos derivados dos processos relacionados a técnicas de inseminação artificial com sêmen congelado (ESTRADA et al, 2020).

Estudos de fertilidade do sêmen equino abrangem biogênese do espermatozoide, além de motilidade e metabolismo (MEYERS; BULKELEY; FOUTOUHI, 2019). Além disso, busca-se entender aspectos sobre sua morfologia, elementos bioquímicos relacionados a sua função, interações das células com secreções de glândulas sexuais acessas (AL-ESSAWE et al., 2018), interações com secreções de glândulas sexuais (GUASTI et al., 2020), interações com secreções de glândulas sexuais acesas (AL-ESSAWE et al., 2018) e interações com secreções de glândulas sexuais acessórias (GERVASI; VISCONTI, 2017).

O objetivo da revisão a seguir é discutir a fertilidade do sêmen congelado dos equinos nos processos atinentes a inseminação artificial, levando em consideração fatores que possam influenciá-la, como: número total de espermatozoides por dose utilizada, número de inseminações por ciclo estral, momento ideal a realização da inseminação em relação à ovulação, local da deposição seminal e técnica utilizada.

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

Uma dose padrão para inseminação de equinos com sêmen congelado não é possível ser definida diante de diversas vertentes que envolvem, sejam processuais ou mesmo de caráter fisiológico nos animais. Alguns estudos fornecem dados sobre o número total de espermatozoides sem a porcentagem de motilidade progressiva e em outros o número de espermatozoides com motilidade progressiva por inseminação. Além disso, a maioria dos estudos científicos não costuma controlar o efeito de outros fatores importantes, como método de processamento, fator égua, fator garanhão, fator idade, técnica de inseminação etc., o que a possibilidade de análise crítica entre eles (ESTRADA et al, 2020).

Um estudo realizado por Samper et al (2002), um dos poucos que abarca um número

elevado de inseminações artificiais com sêmen congelado, totalizando 2289 inseminações, apontou que 86,2% das doses utilizadas seriam de 8 palhetas de 0,5ml, contendo entre 400 e 500 milhões de espermatozoides.

Conforme afirma Aurich et al (2020), em um esforço para aumentar a uniformidade em relação ao número total de espermatozoides por dose, a Federação Mundial para a Criação de Cavalos Esportivos estabeleceu um padrão para doses de sêmen congelado entre os países membros que envolvem o uso de uma dose de inseminação com um mínimo de  $250 \times 10^6$  espermatozoides, com uma porcentagem de motilidade progressiva após o descongelamento de pelo menos 35%. Contudo, em muitos casos essa dose pode exceder o número mínimo de espermatozoides necessários para atingir a fertilidade máxima de cada garanhão determinado (SIEM et al, 2004).

Segundo um estudo realizado, conforme tabela abaixo, não houve diferença nas taxas de prenhez por ciclo em éguas inseminadas no corpo uterino com  $100 \times 10^6$  ou  $800 \times 10^6$  espermatozoides totais com mais de 35% motilidade progressiva dos 17 garanhões utilizados, distribuídos uniformemente entre os dois grupos.

Tabela 1: taxa de prenhez conforme número total de espermatozoides com motilidade progressiva maior que 35% utilizados em inseminação artificial com deposição seminal no corpo uterino

Nº total de spz utilizados	Número total de animais	Número de prenhez	% de prenhez alcançados
$100 \times 10^6$	123	55	45%
$800 \times 10^6$	21	9	43%

Fonte: Elaborado pelos autores com base Goveare et al, 2004.

No entanto, outros estudos com menores doses de espermatozoides mostraram diferença nas taxas de prenhez entre éguas inseminadas no corpo uterino, com base no total de espermatozoides progressivamente móveis utilizados, conforme tabela abaixo:

Tabela 2: taxa de prenhez conforme número total de espermatozoides utilizados em inseminação artificial com deposição seminal no corpo uterino

Nº total de spz utilizados	Número total de animais	Número de prenhez	% de prenhez alcançados
$400 \times 10^6$	39	19	43%
$137 \times 10^6$	39	11	40%
$50 \times 10^6$	35	14	26%

27x10<sup>6</sup>

35

5

14%

---

Fonte: Elaborado pelos autores com base Estrada, 2020.

Essas diferenças entre os estudos demonstram que há um fator limitador diante a quantidade de espermatozoides progressivamente móveis abaixo do qual há comprometimento da fertilidade, porém isso dependerá das características seminais de cada ganhão.

Assim, foi demonstrado que é possível obter taxas de prenhez aceitáveis (63%) após a inseminação de éguas no corpo uterino com apenas  $14 \times 10^6$  espermatozoides progressivamente móveis de dois ganhões de alta fertilidade. Nestes ganhões, observou-se que o limiar de dose de espermatozoides estava muito abaixo do esperado, uma vez que a fertilidade não caiu abaixo de 15% até que a dose de inseminação fosse reduzida para  $3 \times 10^6$  de espermatozoides (CAZALES et al., 2020).

Analisando o efeito que os espermatozoides exercem sobre o útero, observamos que eles estimulam as contrações uterinas necessárias para o transporte rápido dos espermatozoides em direção à junção útero-tubária, bem como para a eliminação do excesso de espermatozoides e contaminantes pelo colo do útero. Os espermatozoides também são responsáveis por gerar uma reação forte inflamatória que é proporcional ao número de espermatozoides inseminados (LEWIS et al., 2015).

Em éguas suscetíveis à endometrite pós-cobertura, quanto maior o número de espermatozoides presentes na dose inseminante, maior a resposta inflamatória e mais rápida sua resolução (pico inflamatório entre 4 e 12 horas pós-inseminação); enquanto baixas doses nos espermatozoides geram uma resposta inflamatória mais branda, porém mais sustentada ao longo do tempo (pico inflamatório > 12 horas pós-inseminação) (CAZALES et al., 2018). Isso poderia indicar que essas éguas, mesmo com a possibilidade de gerar uma forte reação inflamatória, é possível a utilização de uma dose padrão que garanta uma resolução adequada e rápida do quadro inflamatório, visando proporcionar um ambiente uterino adequado à chegada do embrião, por volta do sexto dia pós-ovulação (LEWIS et al., 2015).

Nessas éguas, que apresentam suscetibilidade a endometrite pós cobertura, seria aconselhável o uso de inseminação profunda, na ponta do corno uterino, com baixa dose de espermatozoides, associado ao uso sistêmico de corticosteroides no momento da deposição seminal, para atenuar a resposta inflamatória e assim poder aplicar um tratamento eficaz, que ajuda a eliminar os produtos derivados da inflamação (CRESPILO et al., 2019).

A produção adequada de espermatozoides de alta qualidade pelo macho é fundamental para os processos reprodutivos naturais e artificiais. Portanto, é fundamental entender os caminhos pelos quais os gametas masculinos são derivados. Esse processo, conhecido como espermatogênese, ocorre no epitélio germinal dos túbulos seminíferos dos testículos, e é iniciado durante a puberdade. Seções transversais dos túbulos seminíferos revelam associações celulares adjacentes que produzem esperma de forma cíclica, repetindo aproximadamente a cada 12 dias no ganhão para a produção constante de espermatozoides (P UNESCU et al., 2014).

O comprimento do espermatozoide equino da cabeça à cauda é de aproximadamente 60 $\mu$ m e contém três componentes principais: cabeça, peça intermediária e cauda que são totalmente encapsulados por uma membrana plasmática. (FOSTER; GERTON, 2016). Já a hélice mitocondrial é o agrupamento primário de organelas responsáveis pela motilidade ativa e metabolismo na célula espermatozoide, que auxilia na fertilidade dos ganhões através da produção localizada de ATP (Adenosina Trifosfato) para o movimento flagelador de espermatozoide. De fato, a função mitocondrial, que pode ser aproximada pelo potencial da membrana mitocondrial e pela atividade da cadeia de transporte de elétrons, é conhecida por estar positivamente correlacionada com a função geral do espermatozoide (RAMALHO-SANTOS; AMARAL, 2013).

A produção de ATP ocorre na membrana mitocondrial interna dentro do espaço intermembrano entre as membranas internas e externas. O processo de fosforilação oxidativa é o principal mecanismo de geração de ATP necessários para as atividades intrínsecas do espermatozoide dos ganhão (MORAES; MEYERS, 2018). É notável que a fosforilação oxidativa (o método primário da geração ATP em espermatozoide de ganhão), juntamente com o estresse oxidativo leve, é benéfica para vias funcionais do espermatozoide, como hiperativação, capacidade, reação acrossômica e fertilização. Dessa forma, quantidades menores de ATP podem ser produzidas por glicólise sob condições esgotadas de oxigênio para manutenção de alta velocidade de espermatozoide. Além disso, pesquisas em ganhões têm mostrado correlações entre espécies reativas a oxigênio (EROS) e motilidade, viabilidade e função mitocondrial e, portanto, é altamente benéfico entender os mecanismos mitocondriais no que se referem à fertilidade dessa célula (SULLIVAN; SAEZ, 2013).

No espermatozoide equino, o precursor da reação acrossômica é a sua capacitação, que ocorre no trato reprodutivo feminino à medida que o espermatozoide se aproxima do oócito. A capacitação pode ser geralmente caracterizada pela aquisição tanto da motilidade hiperativa quanto da capacidade de submeter-se à reação acrossômica através de várias vias moleculares e cascatas de fosforilação proteica (GERVASI; VISCONTI, 2017).

Já o oócito da égua pode ser viável pelo período de 12-15h pós-ovulação, sem que realmente haja um aumento significativo nas taxas de mortalidade embrionária em comparação com aquelas coberturas que ocorrem em pré-ovulação (ESTRADA et al, 2020). No entanto, é rotineiro a realização das inseminações artificiais pós-ovulatórias, geralmente entre 3-6h após a ovulação. Esse conhecimento é o mais rotineiro, apesar da necessidade de maior quantidade de manejo reprodutivo com exames de ultrassonografia no intuito de identificar o horário da ovulação e realizar a inseminação em até 6h após (IMMONEN; CUERVO-ARANGO, 2020).

A execução de biotécnicas de inseminação artificial com sêmen congelado frequentemente enfrenta o dilema de inseminar com uma única dose de sêmen congelado por estro, aumentando o número de exames ultrassonográficos, ou inseminar mais de uma vez, geralmente em um horário fixo, com base no horário de administração indutor de ovulação (SAMPER et al., 2016).

Diante a existência de diversas variáveis, não é simples delimitar o efeito exato do número de inseminações realizadas no mesmo estro com as taxas de prenhez a serem obtidas. Essas variáveis possuem grande influência na fertilidade e podem ser exemplificadas pela a hora da última inseminação em relação à ovulação ou o número de espermatozoides depositados no ambiente intrauterino no mesmo cio (MOORE; HASLER, 2017).

Os resultados de estudos reprodutivos sugerem que não há influência no número de inseminações em relação a taxa de prenhez, desde que sejam feitas no mesmo estro e com dose com concentração de espermatozoides com motilidade progressiva adequada (LEWIS et al., 2015).

Assim, ensaios clínicos indicam que as taxas de prenhez não foram diferentes, utilizando uma única semelhante de  $800 \times 10^6$  espermatozoides totais, em éguas inseminadas duas vezes, ou seja, 24 e 40h após a aplicação de HCG (129/280; 46%) ou uma vez 6h pós-ovulação (120/255; 47%). Da mesma forma, verifica-se que as taxas de prenhez também não foram alteradas em éguas inseminadas duas vezes,

sendo realizadas pelo menos 12h antes e 12h após a ovulação (31/62; 50%) ou uma vez dentro de 12h após a ovulação (24/48; 50%) (IMMONEN; CUERVO-ARANGO, 2020).

Em contrapartida, duas ou mais inseminações no mesmo estro pode influenciar negativamente nas taxas de prenhez. Esse fato, provavelmente, se dá devido ao aumento da reação inflamatória uterina em resposta a presença seminal. Desta forma, seria aconselhável inseminar éguas com dificuldade de limpeza uterina apenas uma vez.

Já os protocolos de inseminação com sêmen congelado utilizando-se dose única normalmente se faz pós ovulação devido em parte, à redução de viabilidade dos espermatozoides descongelados, que gira em torno de 12 h (IMMONEN; CUERVO-ARANGO, 2020). O intuito desse protocolo é garantir que o sêmen depositado esteja viável no momento do contato com o óocito após a ovulação, fato que aumenta, em tese, as chances de fertilização em caso de não se conhecer as demais vertentes envolvidas (LEWIS et al., 2015).

Evidências científicas sugerem as variantes taxas de prenhez e taxas de mortalidade embrionária não sofrem alterações no caso de inseminações realizadas de 0 a 6h e 6 a 12h após a ovulação. Dessa forma, pode ser deduzir que é possível, com a mesma taxa de prenhez, realizar exames com menor frequência durante o dia, por exemplo a cada 12h, em detrimento da necessidade de diversas intervenções diárias (ESTRADA et al, 2020).

Estudos realizados com a utilização e 867 ciclos estrais demonstram que as variantes taxas de prenhez e morte embrionária precoce não foram afetadas em éguas inseminadas com sêmen congelado ao ser detectado folículo pré-ovulatório no exame que antecedeu ovulação em alguns intervalos de tempos analisados:

**Tabela 3:** Taxas de prenhez e perda embrionária com base em inseminação artificial realizadas no período pré-ovulatório.

Tempo antes da ovulação (h)	Percentual de prenhez obtidas	Percentual de perdas embrionárias
0-3	42,5%	10,5%
3-6	44,7%	11,9%
6-9	45,1%	5,6%
9-12	55,8%	7,5%
12-15	47,9%	3,6%

Fonte: Elaborado pelos autores com base Newbombe et al, 2011, apud Estrada et al, 2020.

Em um outro estudo, em que foram utilizadas 159 éguas, com o uso de sêmen congelado, não foram encontradas diferenças nas taxas de prenhez e morte embrionária, quando a deposição seminal se deu 4, 8 ou 16h antes da ovulação, com a presença de folículo ovulatório.

**Tabela 4:** Taxas de prenhez e perda embrionária com base em inseminação realizada antes da ovulação, após ser detectada com presença de folículo ovulatório.

Tempo antes da ovulação (h)	Percentual de prenhez obtidas	Percentual de perdas embrionárias
4	34,1%	13,3%
8	26,1%	0%
16	45,5%	10%

Fonte: Elaborado pelos autores com base Immonen e Cuervo-Arengo, 2020.

Além disso, em éguas inseminadas 6h antes ou 6h após a ovulação não foi percebido, conforme demonstra a tabela abaixo, diferenças nas taxas de prenhez ou mesmo nas taxas de mortalidade embrionária.

**Tabela 5:** Taxas de prenhez e morte embrionária conforme o momento da inseminação artificial com sêmen congelado.

Momento da IA (h)	Número total de animais	% de prenhez alcançados	% de perdas embrionárias
6h antes da ovulação	225	39%	8,1%
6h depois da ovulação	351	38%	9,3%

Fonte: Elaborado pelos autores com base em Estrada, 2020.

No entanto, deve-se notar que em éguas com alterações de limpeza uterina (geralmente éguas idosas com acúmulo de líquido intrauterino) o atraso da inseminação em relação à ovulação pode prejudicar suas defesas uterinas já cometidas (CUERVO-ARANGO; MARTÍN-PELÁEZ; CLAES, 2020).

Por esta razão, mesmo em éguas reprodutivamente normais que são inseminadas no período pós-ovulatório, é aconselhável, dependendo de cada caso, o uso de tratamentos mais contundentes em comparação aos casos de inseminações pré-ovulatórias, como, por exemplo, a lavagem uterina e uso de ocitocina (NEWBOMBE et al, 2011, apud ESTRADA et al, 2020)

Embora seja difícil para o médico veterinário alterar um protocolo de trabalho de inseminação artificial pós-ovulatória tão arraigada, é interessante conhecer as

chances de sucesso de inseminações realizadas no período de 12-15h após a ovulação, pois em inúmeras ocasiões é possível se deparar com situações em que a égua ovula antes do previsto, mesmo sem ter sido detectado folículo pré ovulatório. Diante desse cenário clínico, seria altamente recomendável o inseminar a égua, especialmente quando a ovulação parece ter ocorrido em menos de 12-15h de acordo com indicadores como morfologia e ecogenicidade do corpo lúteo inicial (CUERVO-ARANGO; MARTÍN-PELÁEZ; CLAES, 2020).

## **2. METODOLOGIA**

Tratou-se de uma revisão de literatura, onde os critérios de inclusão foram publicações completas publicadas nos últimos vinte anos e na língua portuguesa, já como critérios de exclusão foram material incompleto utilizado das seguintes bases de dados Biblioteca Virtual de Saúde (BVS-BIREME), PUBVET e Science Direct. As palavras-chaves utilizadas foram: fertilidade, sêmen, fertilização e inseminação artificial, relacionadas a equinos.

A metodologia utilizada pauta-se em pesquisa bibliográfica exploratória. Sobre as pesquisas exploratórias, que sua característica principal é gerar a familiaridade entre o pesquisador e o objeto pesquisado de modo a auxiliá-lo na compreensão do problema investigado. Também, este tipo de pesquisa solicita por parte do pesquisador a coleta de uma série de informações acerca de um dado fenômeno, uma dada realidade de um grupo específico ou de certa população da qual se deseja conhecer seu comportamento (GIL, 2011).

A pesquisa em questão se fundamenta no método de raciocínio dedutivo, já que se trata de um estudo com abordagem qualitativa. O método dedutivo cria a partir do conhecimento geral um conhecimento específico, ou seja, parte do geral para o particular (das leis e teorias aos dados), já que ele permite que se aprofunde nos argumentos, fazendo-se uso das regras da lógica para que se chegue a uma conclusão. “Parte de princípios reconhecidos como verdadeiros e indiscutíveis e possibilita chegar a conclusões de maneira puramente formal, isto é, em virtude unicamente de sua lógica.” (GIL, 2011).

Quanto aos procedimentos técnicos adota-se a pesquisa bibliográfica, cuja coleta de dados ocorreu através de pesquisa em livros, artigos e periódicos. Torna-se oportuno mencionar que considerando a imperatividade de buscar uma literatura mais recente

sobre o tema, foi imprescindível um levantamento de informações teóricas que abordassem o assunto em âmbito mundial.

### **3. DISCUSSÕES**

As técnicas de inseminação artificial com sêmen congelado, de baixa dose espermática, foram desenvolvidas no intuito de aumentar a viabilidade do sêmen congelado, com foco, inclusive, nas demandas de mercado de interesse. Para tanto, apesar de haver recomendação de uma dose mínima de  $250 \times 10^6$  espermatozoides, com percentual acima de 35% de motilidade progressiva após o descongelamento, essa indicação varia conforme as individualidades de cada garanhão e suas características seminais, conforme relata Aurich et al (2020).

Conforme estudos, o local de inseminação com sêmen congelado possibilita aumentar as taxas de prenhez com menores doses de espermatozoides quando depositados em baixo volume próximo a ponta do corno uterino (GOVAERE et al., 2014).

Segundo Cazales et al (2020), mesmo em doses e volumes maiores depositados do meio intrauterino, a dispersão seminal se dá rapidamente devido aos movimentos de contração uterina. Em contrapartida, Samper et al (2016) afirma que, da mesma forma, em doses inseminantes com baixo volume e número de espermatozoides, a dispersão no ambiente uterino se dá de forma rápida, inclusive com casos de prenhez gemelar em decorrência de ovulação bilateral, mesmo quando inseminação se deu na ponta de apenas um dos cornos uterinos. Nesse contexto, após a inseminação o sêmen depositado se dispersa no ambiente uterino e um percentual de espermatozoides viáveis são direcionados à tuba uterina.

Alguns estudos realizados com sêmen contendo espermatozoides marcados radioativamente apontam que, após 8 minutos da inseminação, já foi possível perceber a presença de espermatozoides na ponta do corno uterino. Oito minutos após a inseminação, foram identificados na ponta do corno uterino. Em torno de 30 minutos de inseminação artificial com sêmen fresco, foram identificados espermatozoides nas tubas uterinas em 67% das éguas e a população máxima de espermatozoides foi atingida em torno de 4h após a deposição seminal, no local de fertilização na tuba uterina (CAZALES et al, 2020).

Sendo assim, após esse período torna-se viável a realização da lavagem uterina sem afetar as taxas de prenhez, a partir de 4h após a inseminação, já que haverá um reservatório de espermatozoides adequado para a fertilização na tuba uterina

(CUERVO-ARANGO; MARTÍN-PELÁEZ; CLAES, 2020) .

Conforme relata Samper et al (2016), éguas lavadas entre 1-4h após a inseminação com sêmen congelado teve as mesmas taxas de prenhez utilizando doses entre 100 e 500x 10<sup>6</sup> espermatozoides. Esses estudos sugerem que a inseminação artificial com sêmen congelado, direcionado na ponta do corno uterino, garante que um número suficiente de espermatozoides viáveis, dependendo da qualidade seminal, estejam disponíveis na tuba uterina de forma mais célere, para fertilização do oócito.

Já Cazales et al. (2020) corrobora com a tese apresentada ao demonstrar, por intermédio de estudos, que a utilização da inseminação na ponta do corno uterino viabilizou e acelerou o transporte espermático até a tuba uterina e local de fertilização em torno de 2h após a inseminação, mesmo com a utilização de doses baixas de concentração de espermatozoides, em uma única palheta. Com base nesse estudo, é possível perceber que, quando foram utilizadas doses maiores que 400 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides, não foi confirmado qualquer diferença entre o tempo de transporte seminal até a tuba uterina, seja com a deposição no corpo uterino ou na ponta do corno uterino. Isso remete a viabilidade de utilização da inseminação profunda na ponta do corno com doses menores de sêmen utilizados.

É comum, na atualidade, a busca constante de melhoria de eficiência reprodutiva com o uso de sêmen congelado equino, diante das vantagens que ele fornece, especialmente a preservação da genética e a possibilidade do rompimento de barreiras geográficas por intermédio do transporte por longos períodos e distâncias (COELHO; DIAS, 2021).

Dessa forma, na literatura é possível, visando a utilização de baixas doses inseminantes, dois métodos a serem utilizados: inseminação profunda histeroscópica e inseminação profunda na ponta do corno uterino usando uma pipeta flexível. (CRESPILHO, et al, 2019).

Conforme relata Estrada et al (2020), diante as divergências potenciais entre éguas e garanhões, além de expertise dos profissionais que executarão as biotécnicas de reprodução, os estudos indicam que os resultados obtidos com inseminação artificial no ponta do corno uterino com pipeta flexível e a utilização de histeroscopia, com uso de endoscópio, apresentam resultados semelhantes em relação as taxas de fertilidade. Já Crespilho et al (2019) corrobora com as afirmações do autor na medida que afirma que as duas técnicas permitem o uso de doses reduzidas de sêmen, porém mantendo a capacidade fertilizante.

Para Brisko et al (2003), caso uma dose inseminante seja de  $1 \times 10^6$  espermatozoides com mobilidade progressiva, a taxa de prenhez tende a ser maior com um histeroscópio do que com a inseminação profunda com pipeta guiada por via transretal. Contudo, o mesmo autor remete a estudos em que não foi vislumbrado diferenças entre as taxas de prenhez no caso da utilização de  $0,5 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^6$  espermatozoides, seja com histeroscopia ou pipeta guiada pela rota transretal. Em um comparativo entre a inseminação no corpo uterino e a inseminação na ponta do corno uterino, o autor supracitado apresenta informações que remetem que, com a utilização de doses superiores a  $100 \times 10^6$  de espermatozoides, é improvável que as técnicas de inseminação profunda de baixa dose melhorem a taxa de prenhez em comparação com a inseminação no corpo uterino. Em contrapartida, com a utilização de doses reduzidas, menores que  $50 \times 10^6$  de espermatozoides com baixa mobilidade progressiva, há indicativo que a inseminação na ponta do corno uterino tenha vantagens sobre a inseminação no corpo do útero em termo de fertilidade e prenhez (ESTRADA et al, 2020).

Em um comparativo entre a reação inflamatório endometrial pós cobertura, conforme Lewis et al (2015), a inseminação na ponta do corno uterino com pipeta flexível possui menor potencial para causar inflamação do que a inseminação no corpo uterino. Já em relação a inseminação com a utilização da técnica de histeroscopia, essa causou, quando a manobra durou acima de 07 minutos, uma reação inflamatório mais aguda e menores taxas de prenhez, tendo como sugestão que não é viável para éguas com problemas com dificuldade de eliminação de líquido uterino (CRESPILHO et al., 2019). O uso de baixas doses inseminantes com sêmen congelado são, por vezes, necessidades de mercado, que remetem não somente as características seminais, mas também outros fatores, como, por exemplo, nos casos de haver pouca disponibilidade de doses para uso, os preços das doses conforme o valor zootécnico do garanhão, bem como, atualmente, a indústria de sêmen sexado. Contudo, tem relação a essa vertente, percebe-se que diferentemente dos bovinos para os equinos há ainda uma limitação, pois esses animais requerem uma concentração elevada de espermatozoides, necessitando de mais estudos no intuito de tornar essa biotécnica comercialmente sustentável (RAMIREZ et al, 2018).

Além disso, há outras áreas em que o uso da inseminação com sêmen congelado possui relevância, como por exemplo os casos de garanhões com oligospermia, éguas com problemas de limpeza uterina, o uso de espermatozoides de cauda de epidídimo,

dentre outros. Diante disso, há uma maior tendência de, na rotina de reprodução, a utilização de inseminação profunda da ponta do corno uterino, com a utilização de pipeta flexível para uso do sêmen congelado. Ainda assim, mais pesquisas são necessárias para determinar se de fato há melhorias nas taxas de prenhez quando essas técnicas são usadas em algumas categorias de animais, que vai depender de caso a caso, especialmente quando usado sêmen congelado (ESTRADA et al, 2020).

#### 4. CONCLUSÃO

Embora existam uma variedade de técnicas para separar e selecionar para espermatozoides com base na qualidade e viabilidade, nem todos os métodos ainda foram traduzidos para a indústria equina. As diferentes técnicas de inseminação artificial afetam o transporte espermático e a reação inflamatória pós-inseminação, sendo a inseminação profunda com pipeta flexível guiada por via transretal uma opção para aumentar o número de espermatozoides e acelerar a chegada a tuba uterina, reduzindo ainda a possibilidade de reação inflamatória, em comparação a inseminação no corpo uterino. Dessa forma, a inseminação artificial na ponta do corno com sêmen congelado possibilita a utilização de um número baixo de espermatozoides, não sendo recomendada a deposição seminal no corpo uterino

Além do uso da pipeta flexível guiada por via transretal, há a possibilidade de uso de inseminação profunda com histeroscópio, com as mesmas características em relação à fertilidade e uso do sêmen. Porém, devido à simplicidade e baixo a pipetagem guiada por via transretal, é o método de escolha para atuações, especialmente em campo para inseminação artificial com sêmen congelado em equinos.

Em resumo, a técnica de inseminação a ser utilizada será determinada não somente pela concentração espermática da dose inseminante, mas também pelo número e custo das doses disponíveis pelo ciclo, o estado da égua a ser inseminada e a fertilidade do sêmen congelado.

#### REFERÊNCIAS

- AL-ESSAWE, E. M. et al. Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. **Theriogenology**, v. 115, p. 99–107, jul. 2018.
- ALVES, M. B. R. et al. Relação entre a qualidade do sêmen com a endometrite pós cobertura em equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.169-174, jan./mar. 2017

- ATAÍDE, J. L. S. et al. Avaliação da longevidade de espermatozóides equinos congelados e descongelados submetidos a centrifugação e filtração. **Brazilian Journal of Development**. 2021. Acesso em: 01nov22. Disponível em:  
[https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/download/31862/pdf?\\_\\_cf\\_chl\\_tk=GwYaeZ3id5jZT\\_BN7wBWYscXm5dhq33dsQkkHyOqOnA-1668350260-0-aN ycGzNB2U](https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/download/31862/pdf?__cf_chl_tk=GwYaeZ3id5jZT_BN7wBWYscXm5dhq33dsQkkHyOqOnA-1668350260-0-aN ycGzNB2U)
- AURICH, et al. Efficiency of Semen Cryopreservation in Stallions. **Animals**. v. 10, no. 6. p. 1033. 2020.
- BARBOSA, L. M. et al. **Aspectos do manejo reprodutivo de equinos**. Nutritime Revista Eletrônica, on-line, Viçosa, v.14, n.2, p.5046-5053, mar./ abr. 2017
- BARRANDEGUY, M.; THIRY, E. Equine coital exanthema and its potential economic implications for the equine industry. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 191, n. 1, p. 35–40, jan. 2012.
- BRINSKO S. P. et al. Taxas de prenhez em éguas após inseminação histeroscópica ou guiada por via transretal com baixo número de espermatozoides na papila útero-tubária. **Theriogenology**, v. 59, p. 3-4. fev. 2003.
- CANISSO, I. F.; STEWART, J.; COUTINHO DA SILVA, M. A. Endometritis: Managing Persistent Post-Breeding Endometritis. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 465–480, dez. 2016.
- CASTRO, C. S. et al. Aplicação da Criopreservação do sêmen equino. **Revista Espacios**. v.38, n. 2, p. 18, 2017.
- CAZALES, N. et al. Do Insemination dose and site with frozen semen affect sperm transport and inflammatory response in mares? **J Equine Vet Sci**, 66, 109-110. 2018.
- CAZALES, N. et al. Sperm transport and endometrial inflammatory response in mares after artificial insemination with cryopreserved spermatozoa. **Theriogenology**, v. 158, p. 180–187, 1 dez. 2020.
- COELHO, R. W. A; DIAS, J. C. O. Congelação de sêmen equino após 24 horas de resfriamento. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, 2021.
- CRESPILHO, A. M. et al. Can Sperm Selection, Inseminating Dose, and Artificial Insemination Technique Influence Endometrial Inflammatory Response in Mares? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 73, p. 43–47, 1 fev. 2019.
- CUERVO-ARANGO, J.; MARTÍN-PELÁEZ, M. S.; CLAES, A. N. A practical guide to estimate the age of the early CL by ultrasonography in mares examined for the first time to be used as recipients in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 153, p. 48–53, 1 set. 2020.
- EVANS, E. et al. Riding the Spermatogenic Wave: Profiling Gene Expression Within Neonatal Germ and Sertoli Cells During a Synchronized Initial Wave of Spermatogenesis in Mice<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 5, 1 maio 2014.
- FARIAS, L. D. et al. Indução de ovulação em éguas: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.40, n.1, p.17-21, jan./mar. 2016

FOSTER, J. A.; GERTON, G. L. The Acrosomal Matrix. Em: BUFFONE, M. G. (Ed.). **Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization**. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 220p. 15–33.

GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology**, v. 5, n. 2, p. 204–218, mar. 2017.

GIL, A. C. **Métodos e Técnicas de Pesquisa Social**. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2011.

GINTHER, O. J. Equine Embryo Mobility. A Friend of Theriogenologists. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 106, p. 103747, nov. 2021.

GOVAERE, J. L. J. et al. Effect of artificial insemination protocol and dose of frozen/thawed stallion semen on pregnancy results in mares. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 49, n. 3, p. 487–491, jun. 2014.

GUASTI, P. N. et al. Equine seminal plasma and sperm membrane: Functional proteomic assessment. **Theriogenology**, v. 156, p. 70–81, out. 2020.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 381 p.

IMMONEN, I.; CUERVO-ARANGO, J. Effect of Timing of Postovulatory Insemination Relative to Human Chorionic Gonadotropin/Buserelin Treatment With 1 Straw of Frozen-Thawed Semen on Mare Fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 87, p. 102900, 1 abr. 2020.

LEWIS, N. et al. Utilization of One-Dose Postovulation Breeding With Frozen-Thawed Semen at a Commercial Artificial Insemination Center: Pregnancy Rates and Postbreeding Uterine Fluid Accumulation in Comparison to Insemination With Chilled or Fresh Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 11, p. 882- 887.e1, 1 nov. 2015.

MEYERS, S.; BULKELEY, E.; FOUTOUHI, A. Sperm mitochondrial regulation in motility and fertility in horses. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, p. 22–28, set. 2019.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10314–10331, dez. 2017.

MORAES, C. R.; MEYERS, S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. **Animal Reproduction Science**, v. 194, p. 71–80, jul. 2018.

P UNESCU, T. G. et al. High-resolution helium ion microscopy of epididymal epithelial cells and their interaction with spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 10, p. 929–937, 1 out. 2014.

RAMÍREZ, C. H. et . Nano-partículas magnéticas para separación de espermatozoides X en semen equino. Resultados de campo e comerciales. **Revista CES Medicina Veterinária y Zoología**. Disponível em:

<https://www.thefreelibrary.com/Nanoparticulas+magneticas+para+separacion+de+espermatozoides+x+en...-a0595956207>. Acesso em: 29out22.

RAMALHO-SANTOS, J.; AMARAL, S. Mitochondria and mammalian reproduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 379, n. 1–2, p. 74–84, out. 2013.

SAMPER, J. C., Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi-center study. **Theriogenology**, v. 58, p. 647-650. 2002.

SAMPER, J. C. et al. Post-breeding inflammation in mares after insemination with large and low doses of fresh or frozen semen: **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v. 32, n. 1, p. 24–26, 2016.

SIEM, H. et al. Effects of artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. **Theriogenology**, v.62, p. 915-928, 1 set. 2004.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. **REPRODUCTION**, v. 146, n. 1, p. R21–R35, jul. 2013.

ZIRKIN, B. R.; PAPADOPOULOS, V. Leydig cells: formation, function, and regulation†. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 1, p. 101–111, 1 jul. 2018.