



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TROPICAL

INFLUÊNCIA DO TEMPO NA FERTILIDADE DO SÊMEN
DESCONGELADO DE GARANHÕES DA RAÇA QUARTO DE
MILHA

ILLANNA DE SOUZA LIMA BRANDÃO

RECIFE - PE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TROPICAL

INFLUÊNCIA DO TEMPO NA FERTILIDADE DO SÊMEN
DESCONGELADO DE GARANHÕES DA RAÇA QUARTO DE
MILHA

ILLANNA DE SOUZA LIMA BRANDÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal tropical.

Orientador: Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

RECIFE - PE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B817i

Brandão, Ilanna de Souza Lima

Influência do Tempo na Fertilidade do Sêmen Descongelado de Garanhões da Raça Quarto de Milha / Ilanna de Souza Lima Brandão. - 2020.

75 f. : il.

Orientadora: Gustavo Ferrer Carneiro.

Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, 2020.

1. Equino. 2. Criopreservação. 3. Longevidade espermática. I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orient. II. Título

CDD 636.089

ILLANNA DE SOUZA LIMA BRANDÃO

**INFLUÊNCIA DO TEMPO NA FERTILIDADE DO SÊMEN
DESCONGELADO DE GARANHÕES DA RAÇA QUARTO DE
MILHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal tropical.

Aprovada em: ___/___/_____.

COMISSÃO EXAMINADORA

PRESIDENTE/ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO FERRER CARNEIRO
DMV – UFRPE

PROF. DR. VICTOR NETTO MAIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AGRESTE DE PERNAMBUCO – UFAPE

PROF. DR. LUIZ CARLOS FONTES BAPTISTA FILHO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AGRESTE DE PERNAMBUCO – UFAPE

A Deus, que me deu forças para ir até o fim.
A minha mãe, irmã, esposo e filha, por terem estado ao meu lado, como pilares.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o amado de minha alma. Aquele que me guarda e que é luz para o meu caminho, não permitindo que eu tropece. Que me dá colo e que me conforta em todos os momentos, reafirmando seu amor incondicional por mim.

A minha mãe e irmã, minhas grandes incentivadoras, meus exemplos de amor, bondade, doação, paciência, braços abertos e mãos estendidas...

A minha filha, Maria Luísa, que é a luz dos meus olhos. Quem me alegra e me faz lutar para ser uma pessoa melhor todos os dias. Meu coração fora de mim...

A meu companheiro, amigo e esposo, Felipe Holands. Por todo amor, paciência e incentivo. Por segurar as pontas sempre que precisei me ausentar e entender minhas ausências.

A cada um de minha família e amigos, por acreditarem em mim e por me incentivarem a não desistir. Em especial, ao meu avô Elias e meu tio João, por terem me ensinado tudo que sou e o que queria ser. Não posso imaginar a alegria que teriam em me ver crescer (*in memoriam*).

A minha sogra Hygia por tudo que é e tem feito pela nossa família. E ao meu sogro, Sr. Sérgio (*in memoriam*), por todo amor que tinha por mim, e por acreditar na educação como ferramenta de mudança, de dias melhores.

Ao meu querido orientador, Professor Gustavo Ferrer, pelo carinho com que sempre me tratou, por toda dedicação para que pudéssemos produzir esse trabalho. Por acreditar e confiar em mim.

A todos do LABRAPE, em especial a Andreza Viana, por cada dia em que me ajudou sem medir esforços, muitas vezes deixando de lado sua rotina de trabalho de lado. E a todos do ANDROLAB, em especial a Professora Maria Madalena Pessoa Guerra, pelas portas abertas, Lucinha e Robespierre, por toda ajuda e ensinamentos.

Ora, a fé é a certeza daquilo que esperamos,
e a prova das coisas que não vemos
(Hebreus, 11.1).

RESUMO

Quando se trata de biotecnologias da reprodução, é conhecido que o índice de fertilidade do sêmen congelado equino ainda é reduzido, uma vez que, os processos de congelamento e descongelamento levam a efeitos deletérios sobre o espermatozoide, diminuindo sua taxa de motilidade e vigor, modificando sua morfologia e, conseqüentemente, reduzindo o potencial fértil dos reprodutores. Por isso a necessidade de testes *in vitro* que avaliem a qualidade do sêmen equino descongelado, assim como sua viabilidade *in vivo*, levando-se em consideração a possível influência da individualidade do animal sobre a forma de se comportar das células espermáticas frente aos processos de congelamento e descongelamento. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar parâmetros de qualidade seminal *in vitro* de diferentes garanhões durante o teste de termorresistência, com o propósito de se obter uma técnica com maior repetibilidade, e que auxilie no incremento dos resultados no uso de sêmen congelado equino. Para isso, foram utilizadas amostras de sêmen de 4 garanhões da raça Quarto de Milha, em 5 repetições, submetidos a TTR nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos. A cinética espermática foi avaliada através do CASA. A integridade de membrana, foi avaliada pela coloração dupla (Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídio), e a integridade do acrossoma, o Isotiocianeto de Fluoresceína conjugado a Peanut agglutinin. A morfologia espermática foi analisada através de microscopia em câmara úmida com microscópio de contraste de fase. A viabilidade *in vivo*, foi testada pela inseminação de 10 éguas para gestação ou coleta de embriões distribuídos entre os reprodutores. Os dados foram analisados pelo Statistical Analysis System (SAS), com linearidade mista e parcelas repetidas no tempo, adotando covariância autorregressiva; e as médias comparadas pelo teste de Tukey Kramer. As correlações entre as variáveis foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Foi observada uma interação significativa nos parâmetros Reprodutor, Tempo e interação reprodutor x tempo ($p < 0,001$) na cinética espermática, indicando individualidade entre garanhões em termos de longevidade espermática. Essa individualidade se repetiu na integridade de membrana, onde apenas um dos garanhões manteve membrana íntegra sem diferença significativa até os 90 minutos pós-TTR, enquanto que os demais reprodutores obtiveram diferença na integridade de membrana aos 30 e aos 60 minutos, respectivamente. Não houve diferença na patologia espermática ou na integridade de acrossoma entre tempos ou reprodutores. 50% das éguas inseminadas apresentaram embrião ou prenhez e todas as amostras seminais apresentaram pelo menos 1 égua prenhe ou embriões. Demonstrando nitidamente a individualidade dos reprodutores e a necessidade de mais conhecimento das características seminais de longevidade espermática dos mesmos, a fim de se padronizar protocolos de IA para poder determinar o momento mais adequado para a inseminação de acordo com o tempo da ovulação, mantendo-se índices de fertilidade melhores.

Palavras-chave: Equino; criopreservação; longevidade espermática.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo das fases da espermatogênese equina.....	18
Figura 2 – Eixo hipotalâmico-hipofisário do garanhão equino	19
Figura 3 – Coleta de sêmen utilizando manequim artificial	22
Figura 4 – Coleta de sêmen utilizando manequim natural	22
Figura 5 – Exemplo de equipamento do sistema <i>Computer Assisted Sperm Analysis</i> (Análise de Motilidade Assistida por Computador) - CASA.....	32
Figura 6 – Célula espermática marcada pelo composto diacetato de carboxifluoresceína..	34
Figura 7 – Coloração acrossômica por isotiocianato de fluoresceína – Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> (FITC-PSA), evidenciando o acrossoma reagido (AcR) e acrossoma íntegro (AcI) de células espermáticas.....	36
Figura 8 – Padrões morfológicos de células espermáticas.....	39
Figura 9 (Fig.1 artigo) – Morfologia de células espermáticas. Para a mesma condição morfológica, letras diferentes indicam diferença entre os animais, pelo teste de Tukey ($p<0,05$). G1 = Garanhão 1; G2 = Garanhão 2; G3 = Garanhão 3; G4 = Garanhão 4.....	64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Valores das variáveis Integridade da membrana plasmática (IMP), Integridade do acrossoma (IAC), Motilidade total (MT) e Motilidade progressiva (MP), de acordo com o animal e o tempo (Média ± erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 60
- Tabela 2 – Valores das variáveis Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR) e Índice de oscilação (WOB), de acordo com o animal e o tempo (Média ± erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 61
- Tabela 3 – Valores das variáveis Porcentagem de células rápidas (RAP), Frequência de batimentos (BFC) e Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), de acordo com o animal e o tempo (Média ± erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 62
- Tabela 4 – Valores das variáveis Velocidade curvilínea (VCL), Velocidade linear progressiva (VSL) e Velocidade média de trajetória (VAP), de acordo com o animal e o tempo (Média ± erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

AMH – Hormônio anti-mülleriano

ANDROLAB – Laboratório de Andrologia

BCF – Frequência de batimentos

CASA – *Computer Assisted Sperm Analysis* (Análise de motilidade assistida por computador)

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CD46 – Proteína intra-acrossomal

CFDA – Diacetato de carboxifluoresceína

CONA – *Concanavalia ensiformis*

DBP – Diâmetro biparietal

DMSO – Dimetil sulfoxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FSH – Hormônio folículo estimulante

G – Garanhão

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

IAC – Integridade do acrossoma

IMP – Integridade da membrana plasmática

IP – Iodeto de propídeo

LABRAPE – Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco

LH – Hormônio luteinizante

LIN – Linearidade

LP – Longpass

MP – Motilidade progressiva

MT – Motilidade total

P – Proporção

PBS – Tampão fosfato salino

PGF2 α – Prostaglandina

pH – Potencial hidrogeniônico

PNA (a) – *Arachis hipógea*

PNA (b) – *Peanut agglutin*

PSA – Aglutinina de *Pisum sativum*

RAP – Porcentagem de células rápidas

SAS – Statistical analysis sistem

STR – Retilinearidade

T – Tempo

TTR – Tempo de termorresistência

UFAPE – Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

VAP – Velocidade média de trajetória

VCL – Velocidade curvilínea

VSL – Velocidade linear progressiva

WOB – Índice de oscilação

x – Número de vezes

LISTA DE SÍMBOLOS

g – Gramas

° C – Graus Celsius

Hz – Hertz

> – Maior

± – Mais ou menos

< – Menor

mg – Miligrama

min. – Minutos

μL – Microlitro

μm – Micrômetros

nm – Nanômetro

p – Interação

r – Correlação

/min. – Por minuto

/seg. – Por segundo

% – Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 CONSIDERAÇÕES REPRODUTIVAS DO GARNHÃO	17
3.2 MÉTODOS DE COLETA DO SÊMEN	20
3.3 TÉCNICAS DE CONSERVAÇÃO DO SÊMEN	24
3.3.1 Sêmen resfriado	24
3.3.2 Sêmen criopreservado ou congelado.....	26
3.4 PRINCIPAIS MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO	28
3.4.1 Análise da motilidade assistida por computador (CASA)	31
3.4.2 Avaliação da integridade da membrana plasmática	34
3.4.3 Avaliação da integridade acrossomal	35
3.4.4 Morfologia espermática	37
REFERÊNCIAS	40
ARTIGO CIENTÍFICO	45
Eficiência do teste de termorresistência na avaliação da qualidade de sêmen congelado na espécie	
equina.....	46
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	47
Material e Métodos.....	49
Obtenção e local de análise das amostras.....	49
Análises laboratoriais.....	49
Teste de termorresistência.....	49
Cinética espermática.....	49
Integridade da membrana plasmática.....	50

Integridade do acrossoma.....	50
Avaliação da morfologia espermática.....	51
Viabilidade <i>in vivo</i>	51
Análise estatística.....	51
Resultados.....	52
Discussão.....	53
Conclusões.....	56
Referências.....	57
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO (CEUA-UFRPE).....	65
ANEXO B – REGRAS DA REVISTA BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ANIMAL PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO.....	66

1 INTRODUÇÃO

Durante a domesticação, o homem transformou gradualmente os processos reprodutivos dos animais domésticos, antes de pastoreio livre e sistema de acasalamento estacional, para intensiva produção com sistema reprodutivo abrangendo o ano inteiro. Em consequência, a eficiência reprodutiva dos rebanhos declinou devido aos fatores ambientais e as demandas da produção econômica. Esses fatores podem resultar em falha reprodutiva parcial ou completa, exigindo ao longo dos anos, a criação e desenvolvimento de técnicas que explorassem o potencial reprodutivo nos sistemas de produção (Araújo, 2010).

A criação de cavalos destinados ao segmento esportivo sofreu um grande aumento nas últimas décadas. O plantel aumentou rapidamente sem que existisse número adequado e proporcional de bons garanhões a disposição nas temporadas reprodutivas. Esse fato, aliado as vantagens econômicas e sanitárias, vem proporcionando crescente aceitação no uso de diferentes biotécnicas ligadas à reprodução (Bortot, 2013).

A utilização de biotecnologias cada vez mais modernas tem contribuído para o avanço da reprodução de diversas espécies animais, em especial animais de produção. O desenvolvimento de técnicas adequadas para a preservação e armazenamento de sêmen é um dos passos de maior importância neste avanço, uma vez que possibilita o maior aproveitamento de animais de grande potencial genético e de animais que não possam – temporária ou permanentemente – ser utilizados na reprodução, ou até de animais ameaçados de extinção, além de permitir o transporte de sêmen a longas distâncias, sendo considerado como o melhor seguro biológico de reprodutores geneticamente superiores (Gomes, 2006).

Este fato é bem evidente na criação de equinos, que como consequência do aumento da demanda nos sistemas de criação, gerou a necessidade de desenvolvimento de técnicas que possibilitassem um maior e melhor aproveitamento do potencial produtivo e reprodutivo dessa espécie. A criopreservação de sêmen é uma dessas técnicas, que veio para facilitar e otimizar a produção, e sofreu avanços significativos a partir da descoberta do glicerol como crioprotetor (Brandão, 2008).

De acordo com a biotécnica reprodutiva a ser utilizada, há uma diferença relativa quanto à técnica empregada para a conservação do sêmen e ao tempo decorrido entre sua colheita e utilização. Dessa forma, o sêmen pode ser conservado, basicamente, através das técnicas de refrigeração e congelamento (Bochio, 2012).

A criopreservação do sêmen proporciona inúmeras vantagens, como aumento da disponibilidade de espermatozoide, facilitando os trabalhos de reprodução assistida, otimização do uso de garanhões com comprovada superioridade genética, com a possibilidade do armazenamento de sêmen, mesmo fora da estação de monta e a quebra das barreiras geográficas, que torna possível a remessa de sêmen para qualquer parte do mundo (Barreto *et al.*, 2008).

Por outro lado, a fertilidade do sêmen congelado ainda é reduzida, uma vez que, os processos de congelação e descongelação levam a efeitos deletérios sobre o espermatozoide, diminuindo sua taxa de motilidade e vigor, influenciando sua morfologia e, conseqüentemente, reduzindo o potencial fértil dos reprodutores. É importante salientar que também há obstáculos relacionados as diferenças individuais de congelabilidade espermática entre garanhões, ejaculados do mesmo indivíduo e também pela baixa capacidade dos espermatozoides equinos de resistirem aos danos causados pelos processos de congelamento e descongelamento (Candeias, 2010).

Logo, para uma melhor predição da fertilidade e melhoria dos métodos de congelamento, é importante que técnicas de avaliação da qualidade do sêmen *in vitro* sejam desenvolvidas, como também se faz necessário o entendimento da variabilidade entre os garanhões. As técnicas mais eficientes de avaliação disponíveis, como por exemplo, sistema de avaliação computadorizado das características seminais (CASA), teste de termorresistência (TTR), técnicas de coloração, sondas fluorescentes, citometria de fluxo são mais laboriosas, necessitando uma estrutura laboratorial que não está à disposição do veterinário de campo na maioria das vezes, assim como também, são onerosas, por vezes. Dessa forma, na maioria dos casos só são analisadas a motilidade das amostras de sêmen, por ser uma técnica fácil e rápida, e está ao alcance do médico veterinário no campo. Porém essa análise não é capaz de determinar defeitos celulares e possui baixa correlação com a fertilidade do garanhão (ALLEN, 2005). Uma vez que a melhor maneira de se predizer a fertilidade de um garanhão ainda é através da taxa de prenhez *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência do tempo durante diferentes provas de avaliação de sêmen criopreservado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar avaliação espermática através do sistema CASA considerando o tempo de longevidade espermática associada a viabilidade de cada um dos reprodutores;
- b) Avaliar a interação entre as variáveis tempo x animal, e animal x animal;
- c) Correlacionar longevidade espermática e integridade da membrana plasmática a viabilidade de cada um dos reprodutores;
- d) Relacionar a longevidade espermática com a integridade do acrossoma associando a viabilidade dos reprodutores;
- e) Relacionar o tempo de longevidade espermática com suas respectivas patologias espermáticas.
- f) Testar a viabilidade *in vivo* das amostras espermáticas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONSIDERAÇÕES REPRODUTIVAS DO GANHÃO

O aparelho reprodutivo do ganhão é constituído basicamente pelo pênis, bolsa escrotal, testículos, prepúcio, uretra, glândulas acessórias como as glândulas vesiculares, com a função de produzir maior parte do sêmen, as glândulas bulbouretrais e próstata responsáveis pela fração pré-espermática; epidídimo e ducto deferente responsáveis pela fração rica em espermatozoides; e vesículas seminais, responsáveis pela fração pós-espermática ou fração pobre, formada por espermatozoides remanescentes no canal uretral e líquidos, o gel. (Cunningham, 2014; Neves *et al.*, 2016).

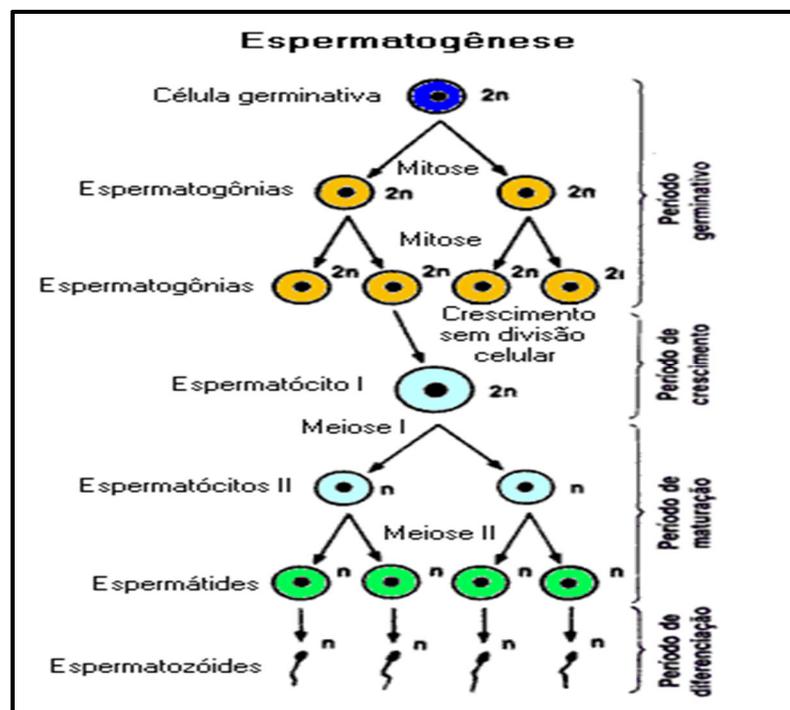
Em seus aspectos funcionais, destacam-se as funções celular, responsável pela produção de espermatozoides, e a endócrina, encarregada da produção de hormônio antimülleriano (AMH) na vida fetal; produção de inibina, responsável pela auto regulação; produção de testosterona, importante para desenvolvimento e manutenção da secreção das glândulas sexuais acessórias, responsável por parte da espermatogênese, produção de feromônios para atração sexual e marcação de ambiente, além de garantir características sexuais masculinas secundárias (Cunningham, 2014; Taffner *et al.*, 2016).

De forma geral, a gametogênese é um processo organizado que ocorre no parênquima testicular, consistindo em um conjunto de divisões e diferenciações celulares a partir de uma célula primordial, a espermatogônia, e resultando na produção de espermatozoides, células bem diferenciadas. Esse processo tem início próximo à puberdade, e continua por toda a vida do ganhão. O tempo necessário para que uma espermatogônia se torne um espermatozoide, gira em torno de 55 a 57 dias. Por volta de nove dias ocorre o transporte dos espermatozoides através do sistema de ductos epididimários, e conseqüentemente, uma nova população de espermatozoides pode ser ejaculada após 64 a 66 dias aproximadamente. Todavia, é válido lembrar que de acordo com o passar da idade e a sazonalidade, é possível observar alterações nas características seminais e comportamento sexual do ganhão (Rua, 2014).

A espermatogênese é subdividida, basicamente, em três etapas. A saber: A primeira, designada fase de proliferação ou espermatocitogênese, consiste em todas as divisões mitóticas das espermatogônias. Existem várias gerações de espermatogônias e cada uma sofre divisão mitótica, gerando um grande número de espermatogônia do tipo B. Algumas dessas células voltam a um estágio mais primitivo, promovendo assim uma contínua renovação do sistema de células a partir de uma nova espermatogônia (Singer e Nicolson, 2003).

A segunda etapa, denominada de meiótica envolve espermatócitos primários e secundários. Durante esta etapa a diversidade genética é garantida por meio da replicação do DNA e pelo crossing over, produzindo espermátides haploides (n). E a terceira fase da espermatogênese é a de diferenciação, denominada de “espermio gênese”. Durante esta fase, não ocorre mais divisão celular, a espermátide indiferenciada e arredondada passa por uma série de transformações que resulta na produção de uma célula altamente diferenciada que é o espermatozoide propriamente dito; contendo uma cabeça (material nuclear), um flagelo incluindo a peça intermédia (com hélice mitocondrial) e uma peça principal (Cunningham; Rua, 2014) (Figura 1).

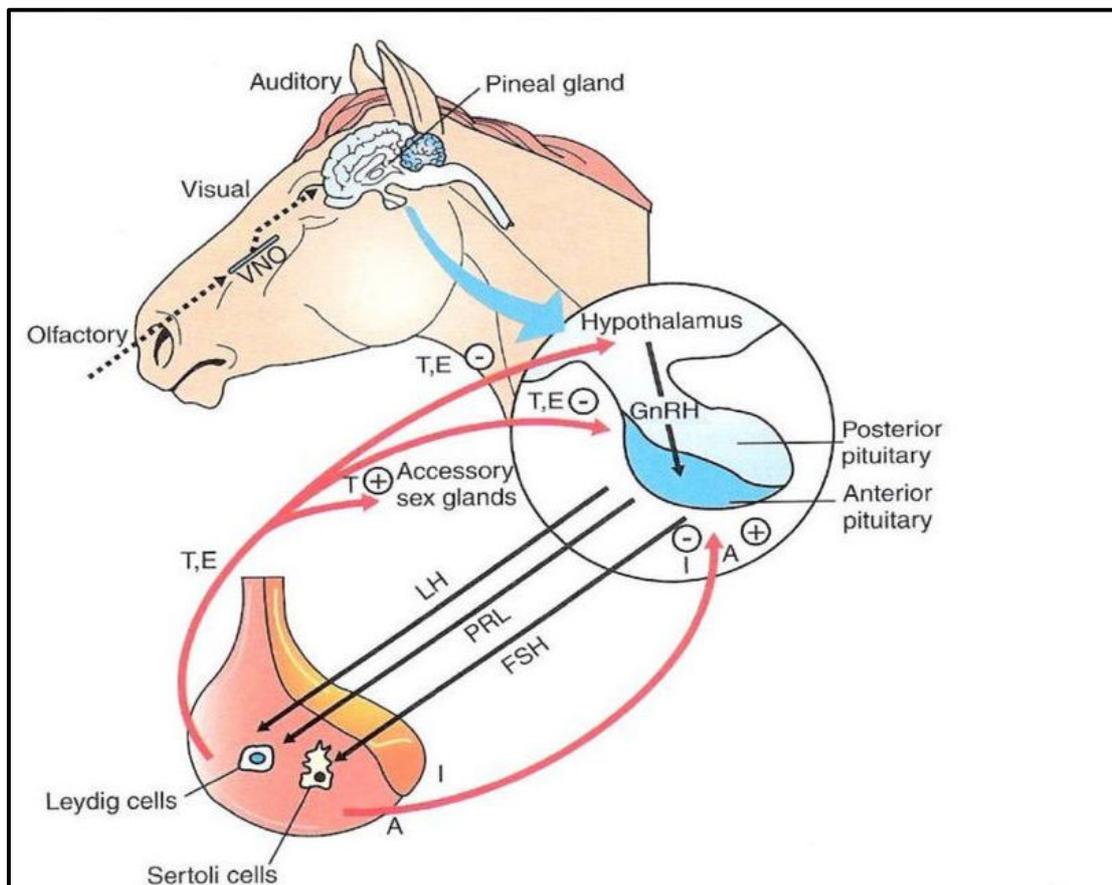
Figura 1 – Esquema ilustrativo das fases da espermatogênese equina.



Fonte: <https://www.google.com.br/search?q=espermatog%C3%AAnese+cavalo&tbm>

Esse processo é dependente de uma perfeita interação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, o qual envolve ação endócrina de gonadotrofinas, mecanismos de feedback de esteroides e proteínas, assim como modulação parácrino-autócrina. O controle endócrino envolve mudanças nos padrões de secreção do hormônio hipotalâmico, o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), e hormônios da pituitária anterior, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), também hormônios testiculares como os andrógenos e inibina (Rua, 2014) (Figura 2).

Figura 2 – Eixo hipotalâmico-hipofisário do garanhão equino.



Fonte: academia.edu/28695281/caracteristicas_reprodutivas_equinas

O nível de testosterona controla a liberação de LH e o nível de inibina controla a secreção de FSH, a fim de que o LH aja nas células de Leydig ou células intersticiais, estimulando assim a produção de testosterona, enquanto o hormônio FSH vai agir nas células de Sertoli ou somáticas, importantes liberadoras de proteínas essenciais para produção e diferenciação dos espermatozoides (Taffner et al., 2016).

Uma vez que apresentam a atividade reprodutiva primariamente regulada pelo fotoperíodo, os garanhões podem ser classificados como reprodutores sazonais de dias longos. Para que haja organização dos ritmos circadianos e sazonais, as informações sobre os ciclos claridade:escuridão são transmitidas para as funções biológicas do corpo pelos padrões de secreção de melatonina. A melatonina tem uma função chave na regulação sazonal da atividade reprodutiva. Sinais de luz são recebidos pela retina e transmitidos à glândula pineal, que por sua vez sintetiza e secreta a melatonina. Sua secreção segue um ritmo circadiano, pois é liberada em quantidades bem maiores nas horas de escuridão, ou seja, está inversamente correlacionada à exposição à luz (Leme, 2003; Rodrigues et al., 2017).

Um aumento no período diário de secreção de melatonina está associado com a diminuição na liberação de GnRH e conseqüentemente com a regressão das gônadas de animais estacionais em dias longos. Inversamente, o mesmo sinal de melatonina é seguido por uma ativação das gônadas nos animais de reprodução em dias curtos (Leme, 2003).

Sendo assim, uma atividade reprodutiva mais intensa concentra-se em períodos do ano com dias de maior intensidade e durabilidade de luz. Fora desse período, ocorre diminuição do peso testicular dos garanhões, com conseqüente diminuição da produção de espermatozoides, que varia de 20% a 50% nos animais jovens (4 a 5 anos) e adultos (6 a 12 anos), respectivamente (Neves *et al.*, 2016).

No entanto, é válido salientar que, ao contrário das éguas que se tornam anovulatórias fora da estação reprodutiva, os garanhões não são azoospermicos durante este mesmo período. Uma vez que, os eventos neuroendócrinos que dão início à estação reprodutiva são iniciados meses antes dessa estação começar, a fim de garantir ao macho usufruir de capacidade reprodutiva máxima (Leme, 2003).

3.2 MÉTODOS DE COLETA DO SÊMEN

Ao longo dos anos, as técnicas para coleta de sêmen foram surgindo e sendo aprimoradas de acordo com as necessidades e finalidades de cada manejo reprodutivo, visando a máxima eficiência reprodutiva. Basicamente, é possível destacar os seguintes métodos: coleta através de vagina artificial (a mais utilizada) com manequim artificial ou natural, coleta em estação, e método farmacológico.

É de grande relevância que haja uma área específica para uma colheita adequada do sêmen, constituída de amplo espaço físico, limpo e livre de barulhos, pessoas e animais que possam distrair o garanhão; e a superfície do solo deve sempre ser abrasiva o suficiente, a fim de permitir que o garanhão tenha uma boa tração mesmo quando o chão estiver molhado, evitando assim derrapagens e conseqüentemente, acidentes (Samper, 2009).

A coleta de sêmen utilizando vagina artificial é a mais empregada devido a sua facilidade de aplicação, existindo diferentes tipos e modelos disponíveis no mercado cada um com suas particularidades. Estas podem ser do tipo fechadas, como Hannover®, Nishikawa®, Colorado®, Missouri®, Botucatu®; ou do tipo abertas, como a Polonesa®. Independente do modelo a ser empregado, antes da coleta de sêmen, deve ser preenchida com água aquecida (45 a 50° C) para que sua temperatura final fique em torno de 44 a 48°C. A fim de se testar conforto térmico, pode ser feito teste prático introduzindo o braço enluvado em seu lúmen da nos 5 primeiros segundos. Adicionalmente a pressão da vagina deve ser ajustada para permitir um melhor contato com toda superfície peniana sem interferir na ereção (Sancler-Silva, 2014).

O manequim artificial consiste de um cilindro oco fechado nas extremidades, e recoberto por material acolchoado com material não abrasivo e livre de dobras. Deve possibilitar regulagem de altura e angulação para tornar possível a adaptação a diferentes pesos e estaturas de garanhões. Sua utilização proporciona maior segurança tanto para o garanhão como para o veterinário, permitindo assim que animais mais agressivos, porém com alto valor genético sejam utilizados (Samper, 2009) (Figura 3).

Figura 3 – Coleta de sêmen utilizando manequim artificial.



Fonte: Google imagens.

Em casos de garanhões de alto potencial genético, no entanto que apresentam baixa libido ou relutância em montar em manequim artificial, o manequim natural passa a ser a alternativa de eleição, e nada mais é que a utilização de uma égua no período do estro. É válido salientar alguns cuidados que devem ser tomados quando da utilização deste tipo de método, como contenção física adequada da égua usada, por meio de peias e às vezes cachimbo, para garantir a segurança do garanhão e dos operadores envolvidos. Uma vez que, mesmo em período reprodutivo adequado, algumas éguas podem não aceitar a monta, e acabam demonstrando comportamento agressivo (Aidar, 2013) (Figura 4).

Figura 4 – Coleta de sêmen utilizando manequim natural.



Fonte: Google imagens.

Na coleta em estação, é possível usar vagina artificial ou estimulação manual, e a ejaculação se dá através da estimulação peniana sem que ocorra a monta. Este método é especialmente útil em processos patológicos que impossibilitam a monta, como distúrbios neurológicos, músculo esquelético ou pós-cirúrgicos. Empregando-se a vagina artificial para coleta, o garanhão em estação é estimulado com uma égua em cio, e no momento em que há ereção completa, a vagina artificial é introduzida no pênis, podendo-se posicionar a mão na base peniana para incentivar o estímulo excitatório. Outra possibilidade é a estimulação manual na qual o operador após colocar uma mucosa plástica sobre o pênis realiza-se estímulos na extremidade distal da glândula até que ocorra a ejaculação propriamente dita (Sancler-Silva, 2014).

Os problemas relacionados ao comportamento sexual do garanhão consistem na maioria das vezes por distúrbios que interferem na capacidade de ejaculação, tais como déficit de ereção, distúrbios ejaculatórios, impossibilidade de realizar cobertura por debilidade ou dor na monta, “déficit” de libido e paralisia, lesão ou neoplasia em pênis e que foram submetidos à penectomia. Geralmente a ereção e capacidade de monta estão

preservadas, todavia não ocorre ejaculação. A indução farmacológica da ejaculação visa mimetizar os eventos neurofisiológicos que desencadeiam o processo de ejaculação, embora estes mecanismos ainda não estejam bem claros (Alvarenga e Papa, 2009; Cavalero, 2018).

Basicamente, os principais compostos empregados incluem α -adrenérgicos e agentes estimuladores da musculatura lisa, como xilazina, detomidina, prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) e ocitocina. Que podem atuar das seguintes formas: como inibidores de recaptção neuronal de neurotransmissores (imipramina), estimuladores dos receptores α -adrenérgicos (xilazina e detomidina) ou indutores de contrações da musculatura lisa genital do garanhão ($\text{PGF}_{2\alpha}$ e ocitocina). Os protocolos de indução de ejaculação de garanhões possuem diversas variações de doses, horários de aplicação, vias de administração, combinações de agentes e procedimentos de pré-tratamento que variam de acordo com o caso e o protocolo adotado (Macdonnell, 2001).

A coleta do ejaculado pode ser realizada com o auxílio de um copo coletor acoplado a um suporte. No entanto, a colocação de um suspensório associado a uma mucosa plástica recobrando todo o perímetro prepucial é a técnica mais utilizada devido a sua maior praticidade e menor manipulação do animal. Características do ejaculado variam significativamente entre os protocolos terapêuticos utilizados, e essa variação ocorre pela estimulação ou inibição da contração da musculatura lisa das ampolas e das glândulas sexuais acessórias (Sancler-Silva, 2014).

A utilização de protocolos farmacológicos eficientes na indução da ejaculação vem se destacando como uma importante alternativa para impedir o descarte de garanhões de alto valor genético, porém, diagnosticados com enfermidades relacionadas a incapacidade de efetuar a monta, alterações na libido, déficit de ereção, traumas psicológicos ou distúrbios ejaculatórios (Cavalero, 2018).

3.3 TÉCNICAS DE CONSERVAÇÃO DO SÊMEN

O aumento da demanda nos sistemas de criação equina levou a necessidade do desenvolvimento de técnicas que possibilitassem um maior e melhor aproveitamento do potencial produtivo e reprodutivo dessa espécie, culminando no surgimento de métodos de conservação de sêmen que favorecem, conseqüentemente, a difusão de melhoramento genético de rebanhos equinos, o melhor aproveitamento de garanhões, a geração de bancos genéticos, e o aprimoramento de biotécnicas da reprodução.

De acordo com a biotécnica reprodutiva a ser utilizada, há uma diferença relativa quanto à técnica empregada para a conservação do sêmen e ao tempo decorrido entre sua colheita e utilização. Dessa forma, o sêmen pode ser conservado, basicamente, através das técnicas de refrigeração e congelamento (Bochio, 2019).

É de grande importância salientar que a inseminação artificial é a biotécnica da reprodução equina mais comumente empregada. Possui grande aplicação por necessitar de poucos machos selecionados para a produção de espermatozoides para a inseminação de centenas de fêmeas por ano, por reduzir a transmissão de patógenos através do coito, por exigir menos do garanhão e por possibilitar a reprodução através de facilidade no transporte do sêmen equino para diferentes regiões do país, sem a necessidade de transportar a égua, possibilitando assim, melhor aproveitamento de reprodutores geneticamente superiores (Oliveira *et al.*, 2013b).

3.3.1 Sêmen resfriado

A necessidade e interesse pela manutenção do potencial fértil dos espermatozoides por um período de tempo mais longo após a coleta (de 24 a 36 horas), impulsionou estudos ao longo do tempo visando a preservação de sêmen através de resfriamento, conferindo ao veterinário flexibilidade para coletar e enviar o sêmen em momento mais oportuno. Uma vez que, o referido processo possibilita transporte do material genético, conseqüentemente promove redução nos gastos e do estresse relacionado ao deslocamento e hospedagem de animais, e riscos de acidentes e de infecções adquiridas resultantes do transporte dos mesmos para outras localidades (Pugliese, 2009).

Apesar das vantagens, o sucesso no uso do sêmen resfriado depende de alguns fatores, tais como temperatura de armazenamento, composição do meio diluidor, dose inseminante, número de inseminações, qualidade do sêmen a fresco e manuseio do mesmo. Os fatores mais críticos dessa técnica são a velocidade e a temperatura sob as quais o sêmen será submetido. Quando resfriado entre 37 °C e 20 °C, os danos são menores. O resfriamento de 37 °C a 8 °C, empregando temperaturas superiores a 0,3 °C/min pode causar choque térmico, sendo observado principalmente por movimentos anormais, rápida queda na motilidade durante o armazenamento e danos à membrana acrossomal, devido a perdas de enzimas e conteúdo intracelular. Logo, taxas de resfriamento lentas, resultam em menores danos às células espermáticas, e conseqüentemente, melhores taxas de fertilidade (Varner *et al.*, 1989).

A utilização da temperatura como conservante do sêmen tem sido rotineiramente aplicada na indústria equina, uma vez que a redução de 10°C da temperatura do sêmen provoca redução de 50% do metabolismo, sendo que a 5°C, apenas 10% do metabolismo espermático, é necessário para que as células se mantenham viáveis. Ainda, quando diluído em condições de anaerobiose, há redução da taxa metabólica da célula espermática e as vias metabólicas aeróbias, promovendo aumento no tempo de manutenção da viabilidade e motilidade espermática (Batellier *et al.*, 2001).

Basicamente, o sêmen pode ser refrigerado através de dois sistemas, ativos ou passivos. Os sistemas ativos possuem taxas de refrigeração predeterminadas, no entanto, são sistemas muito caros e de pouca praticidade em condições de campo, o que os torna menos acessíveis. Por outro lado, os sistemas passivos são mais baratos, portanto mais amplamente utilizados, e dotados de dispositivos ou contêineres de refrigeração, que tenham no mínimo: completo isolamento térmico do meio exterior; obtenção de taxa de resfriamento lenta; manutenção da temperatura pelo maior tempo possível após estabilização; proteção do sêmen; estrutura forte o suficiente para suportar diferentes meios de transporte; viabilidade econômica, leveza e facilidade no manuseio.

Quem determina a temperatura final do contêiner é o período de armazenamento necessário até a inseminação. Logo, para períodos de armazenamento de até 12 horas após a coleta, o sêmen pode ser armazenado entre 4 °C e 20 °C. Todavia, para estocagem por tempo superior, deve ser refrigerado entre 4 °C a 6°C. Seu armazenamento a esta temperatura mantém a viabilidade das células espermáticas de forma mais satisfatória quando comparado a temperaturas inferiores (Pugliese, 2009).

É de grande relevância salientar que nem todo garanhão apresenta boa viabilidade seminal quanto ao resfriamento do sêmen, geralmente pelo fato de apresentar baixa motilidade progressiva após o processo. O que está relacionado muito mais a fatores como individualidade do reprodutor, meio diluente empregado, e proteínas do plasma seminal. Então, a preservação da fertilidade e motilidade do sêmen refrigerado é fundamental para o sucesso da técnica de refrigeração. Sendo assim, a melhoria da preservação do sêmen refrigerado está atrelada ao uso de diluidores, bem como da adição de componentes específicos para manutenção da integridade da membrana, prevenção do estresse oxidativo e preservação da motilidade (Oliveira, 2011a).

3.3.2 Sêmen criopreservado ou congelado

A criopreservação de sêmen equino vem ganhando espaço no mercado, quando comparada a refrigeração, pois além de proporcionar a possibilidade de um melhor aproveitamento genético de animais altos valores econômicos e zootécnicos, maior praticidade e facilidade de transporte e armazenamento do material genético de garanhões, por um longo período de tempo (Oliveira *et al.*, 2013b).

Em contrapartida, como desvantagem pode-se citar fertilidade reduzida do sêmen congelado, o que dificulta sua utilização em larga escala, uma vez que há obstáculos relacionados as diferenças individuais de congelabilidade espermática entre garanhões, ejaculados do mesmo indivíduo e também pela baixa capacidade dos espermatozoides equinos de resistirem aos danos causados pelos processos de congelamento e descongelamento (Candeias, 2010).

Os danos causados aos espermatozoides durante o processo de criopreservação podem resultar em reduzido número de células viáveis. Estes tem início na membrana plasmática atingindo posteriormente a membrana acrossomal, e por último as membranas mitocondriais afetando o movimento progressivo dos espermatozoides e conseqüentemente a fertilidade (Gallego, 2010).

O processo de criopreservação induz a diminuição na viabilidade da célula espermática no período de descongelamento, ocasionando alterações ultraestruturais, bioquímicas e funcionais determinadas pelo processamento seminal, como, a diluição, o resfriamento, o armazenamento, o congelamento e o reaquecimento espermático. Tais lesões são conseqüência da atuação de vários fatores, como formação de cristais de gelo, toxicidade dos crioprotetores e estresse osmótico, relacionado a adição ou remoção de crioprotetores (Martins *et al.*, 2011).

Todavia, apesar das dificuldades, as vantagens do emprego desta técnica, como armazenamento do sêmen congelado por tempo indeterminado; utilização do sêmen de animais excepcionais mesmo após a perda da capacidade reprodutiva ou morte; maximização do número de descendentes de um único reprodutor; controle de doenças sexuais e facilidade no transporte a longas distâncias, fazem valer a pena os estudos direcionados ao seu aprimoramento (Vita *et al.*, 2011b).

O processo de criopreservação pode ser dividido em fases distintas, tendo início a partir da colheita do sêmen, e passando pelos processos de diluição, envase, refrigeração, armazenamento, congelamento e descongelamento. O modo como cada uma destas etapas é

conduzido, refletirá diretamente na estrutura e funcionalidade da célula espermática (Carvalho, 2017a).

Segundo Keith (1998), no processo de criopreservação o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea (37 °C) à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), o que parece não ocasionar maiores danos ao espermatozoide, desde que seja diluído em meio adequado. O estresse começa quando o sêmen atinge a temperatura de 5 °C, passando do estado líquido para a fase de gel (Vita, 2006a).

Inúmeras técnicas utilizando diferentes velocidades e meios de centrifugação, curvas e meios de congelamento, crioprotetores e suas concentrações, bem como protocolos de descongelamento vem sendo estudadas e testadas, embora ainda não se tenha criado uma metodologia de congelamento padrão específica para essa espécie (Oliveira *et al.*, 2013b).

O processo de descongelamento deve ser diretamente proporcional ao método em que o sêmen foi congelado, logo, a curva de aquecimento deve acompanhar a velocidade com que ocorreu o congelamento. Dessa maneira, se a curva de congelamento utilizada foi lenta, a de descongelamento também deve ser lenta, a fim de que ocorra a reidratação da célula e havendo quebra dos cristais de gelo intracelulares. O contrário também deve ocorrer, caso o sêmen tenha sido congelado rapidamente, também deve ser descongelado na mesma velocidade possibilitando assim que o gelo intracelular formado não tenha tempo de recrystalizar (Amman e Pickett, 1987a).

Foram desenvolvidas máquinas de congelamento automático, programáveis com o objetivo de facilitar e tornar mais específico o processo de criopreservação. Sua utilização torna possível o congelamento de grandes quantidades de palhetas de sêmen, além de controlar a taxa de congelamento. O benefício do congelamento automatizado é que a curva de refrigeração pode ser programada, por exemplo, 4 a 5° C por 4 min., de 5 a -110° C por 25 min. e de -110 a -140° C por 35 min. e, então, as palhetas de sêmen são mergulhadas em nitrogênio líquido (Purdy, 2006).

Com o intuito de reduzir os danos causados pelo frio é importante se atentar ao controle da taxa de resfriamento entre 19 °C e 8 °C e, também, pela adição de lipídeos e lipoproteínas ao diluente, além da utilização de curvas lentas de resfriamento e uso de crioprotetores (Furst, 2006). Entre -5 °C e -10 °C dá-se início a formação de cristais extracelulares que permanecem super-resfriados; logo, ocorre a troca de água entre os meios intra e extracelulares para manutenção da osmolaridade, ocorrendo então, a desidratação celular (Furst, 2006; Vita, 2006a).

A perda de água e a desidratação celular são eventos desejáveis durante o processo de congelamento, uma vez que reduzem a probabilidade de formação de cristais de gelo dentro da célula, o que ocasionaria danos às estruturas internas e/ou à membrana plasmática. Todavia, um processo de desidratação severa promoverá desnaturação de macromoléculas e encolhimento celular excessivo, resultando conseqüentemente, em um colapso da membrana (Medeiros *et al.*, 2002). Sendo assim, nesse ponto a curva de congelamento deve ocorrer de forma rápida o suficiente para evitar o contato do espermatozoide desidratado com o meio hiperosmótico, porém de maneira lenta o bastante para que a água intracelular não congele (Furst, 2006; Vita, 2006a).

Conseqüentemente, as lesões são advindas de vários fatores, tais como: a formação de cristais de gelo intracelular resultantes da mudança de temperatura, alteração na permeabilidade da membrana do espermatozoide, toxicidade dos crioprotetores e o estresse osmótico, associado à adição ou a retirada de crioprotetores. Apesar do uso de crioprotetores ser indispensável, os mesmos possuem efeitos tóxicos, que por muitas vezes podem ter caráter deletério, como aumento da permeabilidade da membrana plasmática (Vita, 2006a; Furst, 2006; Watson, 2000).

3.4 PRINCIPAIS MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO

Mesmo quando os ganhões detêm as qualidades seminais básicas que possibilitam sua utilização em programas reprodutivos, quando se trata da fertilidade, sabe-se que este é um fator variável entre os mesmos. A determinação da taxa de prenhez ou de não retorno ao estro, é a melhor forma de determinação da fertilidade do ganhão, seja por meio de monta natural, inseminação artificial ou produção de embriões. Logo, pesquisadores tem buscado desenvolver ensaios laboratoriais que determinem acuradamente a fertilidade do sêmen a ser empregado. Contudo, os objetivos tem sido de difícil obtenção, uma vez que a maior parte dos problemas está nas diversas características que a célula espermática deve possuir para fertilização do oócito, e em como a fertilização é definida. Não há um teste único capaz de predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen, mas o exame de várias características pode determinar um maior potencial fertilizante (Arruda, 2007b).

Tudo isto é conseqüência do fato de que a fertilidade dos ganhões está firmada como um dos principais parâmetros de seleção e utilização. O espermograma convencional tem configurado o principal método de diagnóstico de fertilidade do macho. Dentre as várias características espermáticas a serem avaliadas pelo método, a motilidade, a concentração e

a morfologia dos espermatozoides destacam-se como as mais importantes. Todavia, por si só, essa análise não é suficiente, uma vez que a estrutura interna da célula espermática não é avaliada, e esta possui indicativos essenciais da funcionalidade dos espermatozoides, da habilidade de fecundação e do desenvolvimento embrionário. Além disso, é preciso levar em consideração o fato de que muitos garanhões apresentam ótima qualidade seminal no espermograma, no entanto, capacidade fertilizante baixa (Muradas *et al.*, 2013).

Uma frequência elevada de espermatozoides com morfologia anormal ou alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade. As anormalidades morfológicas são classificadas de diversas formas, sendo que algumas classificações dividem as alterações de acordo com a região da célula onde a mesma ocorreu como cabeça, peça intermediária ou cauda. Outras simplesmente as dividem em defeitos primários e secundários, ou maiores e menores. Essa classificação foi realizada levando-se em consideração a maior ou menor importância da anormalidade para a fertilidade (Gallego, 2010).

Ensaio laboratoriais testam a qualidade de amostras de sêmen antes do processo de inseminação artificial envolvendo avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis, morfologicamente normais e concentração da dose. Tudo isso tendo em vista a possibilidade de prever o potencial fértil de uma amostra (Gillian *et al.*, 2005).

Em geral, motilidade, concentração e morfologia espermáticas são os parâmetros clássicos da avaliação de amostras de sêmen, seja ele fresco, resfriado ou congelado. Rotineiramente, a motilidade espermática é estimada por análise do sêmen entre lâmina e lamínula, enquanto as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados. Ambas as técnicas são realizadas sob uso de microscopia óptica. No entanto, pesquisas apontam que este tipo de análise manual é impreciso, mesmo se executada por investigador experiente, observada elevada variação entre observações e observadores. Esta imprecisão é oriunda, em parte, da origem subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (Arruda, 2007b).

Além desses métodos anteriormente descritos, a longevidade das células espermáticas diluídas e descongeladas também pode ser avaliada através do teste de termorresistência (TTR), que analisa a motilidade e o vigor espermáticos no tempo zero (momento em que o sêmen é descongelado) e em períodos de tempo que variam de 30 a 90, 180 e 240 minutos. Este teste pode ser afetado pelo efeito do ejaculado, método de congelamento e efeitos do tempo incubação (Santos *et al.*, 2015).

Mesmo que os métodos de análises subjetivas tenham grande valor quanto a predição da fertilidade de um macho, a subjetividade dos mesmos possui reprodutibilidade e acurácia

reduzidas. Com o objetivo de obter técnicas que demonstrem maior repetibilidade para avaliação tanto da morfologia quanto da função espermáticas, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados nos últimos anos (Bergstein *et al.*, 2014).

A fim de que a inseminação artificial apresente resultados mais satisfatórios em equinos, são necessários estudos amplos quanto aos vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados para analisar a viabilidade dos espermatozoides submetidos aos processos de refrigeração, congelamento e descongelamento, pois os danos ocasionados pela criopreservação acarretam prejuízos nas funções celulares, ocasionando fertilidade diminuída (Arruda, 2007b).

Dentre estas, a integridade da membrana espermática aparenta ser a mais afetada e pode exercer papel crítico na sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea. Espécies que tem espermatozoides com acrossomo muito pequeno, como o homem e o cavalo, é impossível que os danos acrossomais sejam vistos com uso apenas de microscopia óptica. Logo, técnicas de marcações específicas tem sido empregadas para visualização do acrossomo, como microscopia óptica ou de fluorescência. Os métodos de coloração empregando corantes fluorescentes (sondas fluorescentes) elevaram a possibilidade de análises mais criteriosas da integridade estrutural dos espermatozoides (Arruda, 2011c).

3.4.1 Análise da motilidade assistida por computador (CASA)

Com a finalidade de se obter uma técnica que demonstre maior repetibilidade tanto para motilidade quanto para morfometria, inúmeros sistemas que empregam análise computadorizada de imagens vêm sendo desenvolvidos e empregados. Teoricamente, programas computadorizados voltados para avaliação espermática são mais objetivos e permitem maior repetibilidade às avaliações relacionadas a identificação de padrões de motilidade ou de normalidade espermáticas, quando comparadas a avaliação humana. Seu poder de análise é definido pela avaliação precisa e acurada dos espermatozoides com alto grau de objetividade, podendo assim aperfeiçoar o processo de avaliação seminal em animais (Arruda, 2007b).

Logo, a avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é importante devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides. Por isso, em 1992, surgiu o HTM-IVOS Sperm Analyzer®, um sistema integrado de computador e microscópio que permitia a obtenção de imagens digitalizadas, fornecendo classificação automática dos movimentos espermáticos, informando porcentagem dos móveis, média de velocidade e porcentagem de progressivos (Iguer-Ouada e Versteegen, 2001).

De forma geral, CASA se refere a um sistema automatizado (Hardware e Software) para visualização e digitalização de imagens sucessivas de espermatozoides, que processa, analisa e fornece informações acuradas, precisas e significativas da cinética individual das células espermáticas, como também valores estatísticos médios da população global. As células móveis observadas são posteriormente identificadas em sucessivas imagens, possibilitando estabelecimento de suas trajetórias. Por fim, as trajetórias obtidas são matematicamente processadas permitindo a definição das mesmas numericamente. Os resultados desses processos são convertidos em uma série de parâmetros que definem acuradamente o exato movimento de cada espermatozoide (Amann e Katz, 2004b) (Figura. 5).

Figura 5 – Exemplo de equipamento do sistema *Computer Assisted Sperm Analysis* (Análise de motilidade assistida por computador) – CASA.



Fonte: Google imagens.

É importante salientar que, esse e outros sistemas computadorizados, realizam a análise através da avaliação dos movimentos da cabeça e não do flagelo, embora seja neste a origem da motilidade, uma vez que é tecnicamente mais fácil acompanhar os movimentos da cabeça que do flagelo. Isso devido ao fato de que a frequência do batimento flagelar é muito elevada, sendo então necessário, pelo menos, 200 observações por segundo para mensurar o padrão do batimento flagelar corretamente. Atualmente, os sistemas de vídeo analisam 25-60 imagens/s, usando assim, uma frequência menor que a necessária para avaliação do batimento flagelar, o que impossibilita a aquisição de boas imagens. Por outro lado, a cabeça não se move tão rapidamente como a cauda, possibilitando a obtenção de imagens relativamente claras, através da tecnologia de vídeo convencional (Mortimer,2000).

A análise tem início, quando cada imagem captada pela câmera acoplada ao microscópio é convertida em imagem digital, e há organização sequencial de várias imagens, dando origem a um filme. Cada conjunto de imagens captadas em diversos campos de observação da amostra espermática em avaliação é automaticamente analisados. O software reconhece as células e desenha para cada uma, uma sequência completa do movimento a fim de reconstituir sua trajetória, classificando-a conforme os padrões definidos como: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel (Matos, 2008).

Por conseguinte, uma série de outras características de movimento espermático é calculada, fornecendo parâmetros de motilidade como: porcentagem de móveis, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Estes valores são usados para diferenciação dos padrões do movimento espermático. Todas as células espermáticas de um campo são identificadas e avaliadas antes que as imagens do próximo campo, captadas na sequência, sejam analisadas, tendo suas trajetórias reconstruídas simultaneamente (Mortimer,2000).

A motilidade espermática é rotineiramente assinalada como uma das mais importantes características associadas com a capacidade fértil do espermatozoide, todavia, quando mensurada microscopicamente, não é bem correlacionada com a fertilização *in vivo* ou *in vitro*, uma vez que além do erro humano durante a avaliação subjetiva desse parâmetro, há ainda a limitação do método para avaliar de forma detalhada as características do movimento espermático. Nos últimos anos, os sistemas de avaliação automático tem mostrado ser uma ferramenta útil na avaliação das propriedades cinemáticas do espermatozoide de forma individual do ejaculado, mostrando grande potencial para predizer a fertilidade do macho, por meio da correlação da velocidade de natação do espermatozoide com a fertilização de ovócito *in vitro* e *in vivo* (Cox *et al.*, 2006).

Segundo Matos (2008), além da motilidade, a morfologia da célula espermática também tem sido estudada através do CASA, e incorporada na rotina de análises de sêmen. Isso porque este parâmetro é um importante indicador de fertilidade, tanto em homens como em animais, além de ser um bom sinalizador de danos espermáticos resultantes da ação de agentes físicos ou químicos. O sistema é programado para determinar parâmetros como diâmetros máximo e mínimo, área da cabeça, porcentagem de acrossomo e fator de elipse, que são utilizados para classificar as células segundo sua forma em: normal (formato de cabeça regular), afilada, redonda, macro, micro ou amorfo (cabeça irregular).

Embora seja considerada um método de avaliação objetivo, o sistema CASA apresenta variação nos resultados entre 11 e 23%, o que pode ser atribuído a fatores como preparação da amostra incluindo técnica de fixação e técnica de coloração, bem como fatores como correta iluminação, foco, aumento, sistema de classificação, interpretação e experiência do profissional (Hirai *et al.*, 2001).

3.4.2 Avaliação da integridade da membrana espermática

Ao longo dos anos, inúmeros métodos foram sendo desenvolvidos com a finalidade de avaliar a integridade física tanto da membrana plasmática como do acrossoma de espermatozoides em preparações coradas. A coloração com os corantes eosina nigrosina e sondas fluorescentes como diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), o iodeto de propídio (IP) e o Hoechst® são alguns dos métodos utilizados para detectar a integridade de membrana celular (Magistrini *et al.*, 1997).

Todavia, o iodeto de propídio ocupou lugar de destaque nas pesquisas devido a facilidade em sua preparação e aplicação da técnica, além da estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana plasmática. (Muradas *et al.*, 2013)

O iodeto de propídio é um corante não permeável à membrana plasmática, penetrando apenas através de membranas danificadas, através de ligação e coloração do DNA celular. Sendo assim, este corante em solução salina quantifica as células mortas, o que resulta em fluorescência vermelho-brilhante no núcleo da célula. Já o diacetato de carboxifluoresceína é um composto hidrofóbico capaz de penetrar a membrana celular sem interferência fisiológica. No interior da célula o mesmo é hidrolisado através de interação enzimática e, então convertido

num composto hidrofílico fluorescente – carboxifluoresceína, não penetrante à membrana plasmática, que se acumula no interior celular, e promovendo nos compartimentos com membrana íntegra uma coloração verde fluorescente quando expostos a luz azul (Gomes, 2006; Schimitt, 2008) (Figura 6).

Figura 6 – Célula espermática marcada pelo composto diacetato de carboxifluoresceína.



Fonte: Google imagens.

O maior benefício da utilização de sondas fluorescentes é a obtenção de maior contraste, menor variabilidade e maior especificidade quando comparadas às colorações clássicas. Garner *et al.* (1986) utilizaram a combinação de duas substâncias fluorescentes, o CFDA e o IP, para verificar a integridade física da membrana de espermatozoides bovinos e de outras espécies com citometria de fluxo. A mesma técnica foi modificada para avaliação em microscopia de fluorescência por meio da utilização de baixas concentrações de formaldeído para paralisação dos espermatozoides (Neild *et al.*, 2005).

A utilização do CFDA associado ao IP é considerada mais segura e com resultados mais satisfatórios quando se objetiva avaliar a integridade de membrana da célula espermática, se comparado ao emprego isolado dos corantes. Quando empregados separadamente, o PI é caracterizado como confiável do que o CFDA. Todavia, é válido salientar que a principal desvantagem dessa técnica é o tempo de utilização dos corantes que deve ser o mais rápido possível, uma vez que a cor se perde em detrimento da passagem dos compostos fluorescentes através da membrana (Oliveira, 2011a).

3.4.3 Avaliação da integridade acrossomal

A capacidade de fecundação do espermatozoide depende do potencial desta célula em ser hiperativada, capacitada no momento da junção com o oócito, com seu acrossoma intacto para, só então, passar por reação acrossômica, aptidão para penetrar na zona pelúcida do oócito e possuir DNA íntegro para formação de um embrião capaz de se desenvolver. Logo, a integridade dessa estrutura é notoriamente, pré-requisito para a fecundação (Gillan *et al.*, 2005).

De forma básica e geral, quando avaliados, os espermatozoides podem ser classificados quanto à integridade da membrana acrossômica como portadores de acrossomas intactos, quando apresentarem região acrossomal corada com fluorescência verde, ou portadores de acrossomas reagidos/danificados, quando apresentarem faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática, ou não apresentarem fluorescência verde em toda região acrossômica (Roth *et al.*, 1998).

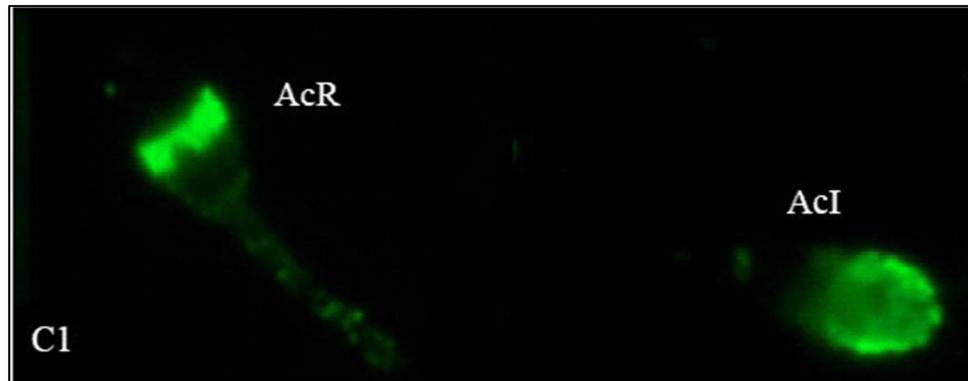
As porcentagens de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras são mais fortemente relacionadas com a fertilidade, quando se compara a relação motilidade x fertilidade, no entanto, estas análises predizem apenas a penetração da célula espermática no oócito, e não o sucesso durante o desenvolvimento embrionário (Brandão, 2008).

Dessa forma, para determinação da integridade da membrana acrossômica, podem ser empregadas as lecitinas conjugadas aos fluoróforos (marcadores de lisossomos) ou a anticorpos anti-proteínas intra-acrossomal (anti-CD 46). Estas lecitinas se ligam a cadeias de carboidratos glicoproteicos presentes no acrossoma. As mais utilizadas são *Pisum sativum* (PSA); *Arachis hipógea* (PNA) e *Concanavalia ensiformis* (ConA). Dentre os fluoróforos conjugados às lecitinas, destaca-se o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Silva *et al.*, 2006a; Gadella *et al.*, 2007).

O uso da aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), quando conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), marca com sucesso o acrossomo espermático na cor verde amarelado, o que facilita a visualização e a identificação dos acrossomos lesados, sendo utilizado em espermatozoides humano, bovinos, equinos e suínos (Arruda *et al.*, 2007b).

Com intuito de comprovar a eficiência e especificidade do FITC-PSA na avaliação da integridade de membrana acrossomal, Souza (2001) comparou quatro diferentes técnicas para exame acrossômico: câmara úmida por microscopia de contraste de fase e de interferência diferencial, coloração por *Trypan Blue*/Giemsa e microscopia de epifluorescência, utilizando o FITC-PSA como marcador em amostras de sêmen equino pós-descongelamento. Foi verificado que a técnica de microscopia de epifluorescência com a sonda fluorescente FITC-PSA é a mais eficiente em detectar lesões de acrossomo (Figura 7).

Figura 7 – Coloração acrossômica por isotiocianato de fluoresceína – Aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA), evidenciando o acrossoma reagido (AcR) e acrossoma íntegro (AcI) de células espermáticas.



Fonte: <http://cielo.br>

O uso da FITC-PSA para avaliar a integridade do acrossoma de células espermáticas equinas *in natura* ou submetidas à injúria por congelamento foi investigado através de misturas contendo diferentes proporções de espermatozoides com acrossoma intacto (sêmen fresco) e espermatozoides com acrossoma danificado (sêmen criopreservado). Havendo correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides ligados ao FITC-PSA e a proporção de espermatozoides com acrossoma danificado nas amostras ($r = 0,98$; $P < 0,05$), comprovando assim, a eficiência de seu uso na determinação da integridade do acrossoma espermático (Arruda *et al.*, 2003a).

As amostras coradas pelas sondas fluorescentes podem ser avaliadas em microscópio de fluorescência ou em citômetro de fluxo. Esses corantes fluorescentes nada mais são do que sondas usadas na identificação de condições subcelulares, possibilitando a identificação de alterações estruturais ou metabólicas no interior da célula espermática (Santos *et al.*, 2018b).

A descoberta de fluorocromos e componentes conjugados a sondas fluorescentes possibilitaram maior qualidade na avaliação do sêmen no que se diz respeito aos seus aspectos bioquímicos, ultraestruturas e funcionais. No entanto, células espermáticas quando analisadas por microscopia óptica ou epifluorescência, permite avaliação apenas de um pequeno número de uma determinada população, demandando tempo, resultados muitas vezes subjetivos e mensuração das características espermáticas, por vezes, separadamente. A adaptação destas sondas para avaliação das células através de citometria, culminou em maior acurácia e rapidez, tornando possível avaliar em grande escala várias características espermáticas. O que torna

possível as correlações entre ensaios laboratoriais e a fertilidade do sêmen congelado (Kirk *et al.*, 2001).

3.5 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

As anormalidades morfológicas variam entre indivíduos, durante o período reprodutivo, e podem ou não estar associadas a outras características seminais, não havendo, necessariamente, um comprometimento efetivo sobre a fertilidade (Fernandes e Pimentel, 2002).

O sêmen da maioria dos machos apresenta alguns espermatozoides anormalmente formados. Normalmente, este fato não está associado a níveis de fertilidade diminuída até que a proporção de espermatozoides anormais exceda cerca de 20%; mesmo que, certos tipos de anormalidades possam não estar associadas com infertilidade. Grandes números de espermatozoides anormais podem ser detectados em amostras na estimativa da porcentagem de células móveis (Gomes, 2006).

Para avaliação das patologias espermáticas podem ser realizadas análises microscópicas, através da utilização do método panótico rápido para observação das cabeças dos espermatozoides. As amostras de sêmen são descongeladas em banho-maria a 37 °C, durante 30 segundos. Após, é feito esfregaço em lâmina utilizando 10µL do sêmen descongelado, e a mesma é mergulhada por 10 segundos nos corantes e vista em microscópio imediatamente após a secagem e método da câmara úmida. Para observação de peça intermediária e cauda é feita a diluição em formol-salina e o sêmen levado ao microscópio de contraste de fase em objetiva de imersão (aumento de 1000x) para análise, onde devem ser contadas 200 células espermáticas de cada amostra, onde são contadas células normais e apenas um defeito por célula anormal. Quando observados dois ou mais defeitos na mesma célula, registrou-se em ordem de prioridade, o defeito maior em relação ao menor e, se observados dois defeitos de mesma classificação, registra-se apenas o de maior frequência/incidência (Araújo, 2010; CBRA, 2013)

Diferentes sistemas foram estabelecidos para classificação da morfologia espermática em equinos. Basicamente, há três sistemas de classificação para os defeitos morfológicos dos espermatozoides, a saber (Gamboa, 2011):

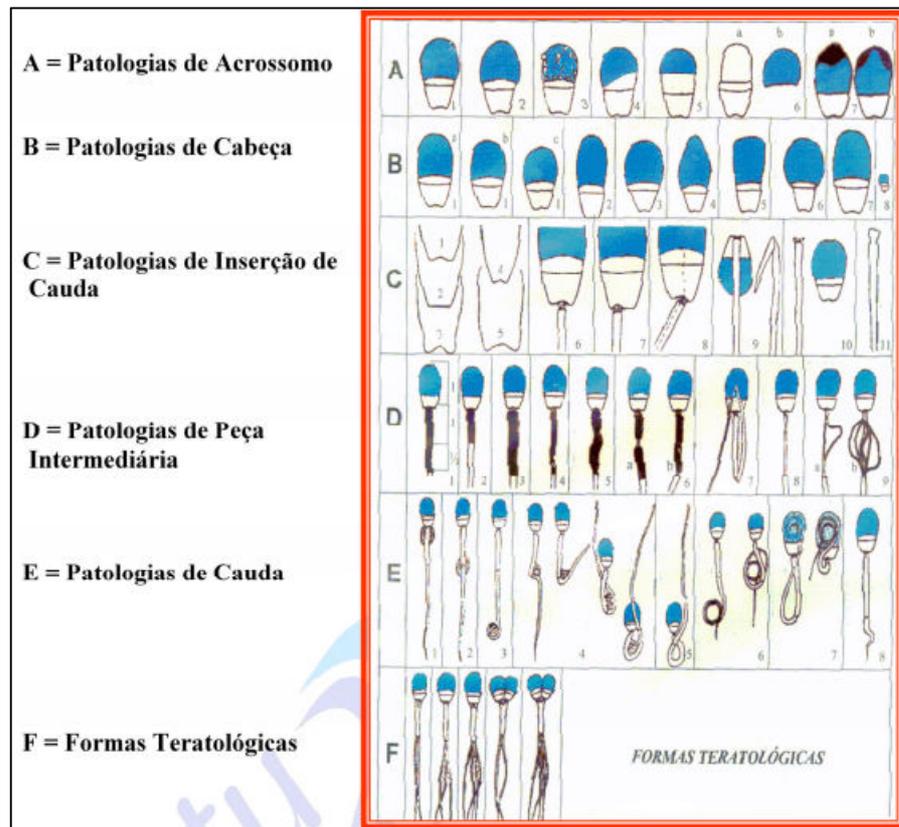
- O primeiro, baseado em três categorias morfológicas: defeitos primários, ou seja, aqueles que ocorrem durante a espermatogênese (traduzem falhas na espermatogênese e são de origem testicular); defeitos secundários, aqueles que surgem durante o trajeto das células pelos

ductos excurrentes (traduzindo falhas na maturação, como as gotas citoplasmáticas proximais); e defeitos terciários, aqueles que surgem após a ejaculação (como enrolamentos do flagelo).

- O segundo, que classifica as alterações morfológicas em maiores e menores, de acordo com o impacto que tem sobre a fertilidade: os primeiros incluem cabeças, acrossomas e peças intermédias anormais e gotas citoplasmáticas proximais, por possuírem grande impacto na fertilidade; os defeitos menores, como gotas citoplasmáticas distais e enrolamentos ligeiros do flagelo, com pouco ou nenhum efeito sobre a fertilidade.

- O terceiro sistema que inclui a definição de defeito compensável ou não compensável, uma vez que um elevado número de espermatozoides normais na dose inseminante é capaz de compensar, pelo menos parcialmente, uma elevada percentagem de anomalias morfológicas (Figura 8).

Figura 8 – Padrões morfopatológicos de células espermáticas.



Fonte: Manual de exame andrológico Botupharma.

Contudo, a avaliação isolada da morfologia espermática pode não afirmar que o potencial de fertilidade de um ejaculado seja alto, mas pode indicar se o potencial de fertilidade é baixo, principalmente quando houver altas porcentagens de anormalidades espermáticas. Além disso, uma inspeção morfológica criteriosa fornece informações adicionais sobre as

características individuais dos espermatozoides, e este dado é importante porque o sêmen pode possuir boa motilidade dos espermatozoides, e ainda ter uma incidência relativamente alta de anormalidades morfológicas dos espermatozoides. Como também, os garanhões podem ter muitas anormalidades espermáticas e ainda apresentar fertilidade normal (Silva, 2017b).

REFERÊNCIAS

AIDAR, N. B. **Criopreservação de sêmen**. Monografia – Universidade de Brasília/UNB, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Brasília, 2013.

ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive Technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animal**, v.40, p.310- 329, 2005.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, n.6, p.204-209, dez. 2009.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

AMANN, R.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Jornoul Andrology**, v.25, p.317-325, 2004.

ARAÚJO, A. M. S'A.; ARAÚJO, S.A. C. Alterações morfológicas encontradas nas células Espermáticas de garanhões pônei. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VIII, n. 15, Periódico Semestral, 2010.

ARRUDA, R. P. et al. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.228-229, 2003.

ARRUDA, R. P. et al. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veteterinariae**, v.31, p.228-229, 2003.

ARRUDA, R. P. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.8-16, Belo Horizonte/MG, 2007.

ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151. 2011.

BARRETO, M. A. P. et al. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n. 12, p. 2115-2119, 2008.

BATELLIER, F. et al. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.4, p.189-194. 2014.

BOCHIO, L; **Inseminação Artificial**; Associação Brasileira do Cavalo Quarto de Milha. Disponível em: <<http://www.abqm.com.br/SecaoTecnica/Inseminacao.asp>>. Acesso em: 18 dez. 2019.

BORTOT, D. C. Aspectos da reprodução equina: Inseminação artificial e transferência de embrião: Revisão de literatura. **Revista Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano XI, n. 21, Periódicos Semestral, 2013.

BRANDÃO, A. C. **Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides criopreservados de equinos**. Tese – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2008.

BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129-136, 2000.

CANDEIAS L.M. **Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Machador**. Dissertação - Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. 2010.

CARVALHO, C. P. T. **Avaliação do processo de congelamento do sêmen equino in natura diluído, 5°C, -55°C e pós-descongelamento**. Dissertação – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, São Paulo, 2017.

CAVALERO, T. M. S. **Novos protocolos utilizando associações com ocitocina na indução farmacológica da ejaculação em garanhões**. Dissertação – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, 2018.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 2ª ed., Belo Horizonte, MG. 2013. Disponível em: <<http://cbra.org.br/publicacoes/manual-de-exame-andrológico/>>. Acesso em: 16 jan. 2020.

COX, J. F. et al. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p. 860-867, 2006.

Brandão, I.S.L. – Eficiência do teste de termorresist...

CUNNINGHAM. **Tratado de fisiologia veterinária** / Bradley G. Klein. - 5. ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

FERNANDES, C. E.; PIMENTEL, C. A. Características seminais e fertilidade em garanhões. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.5, p.829-834, 2002.

FURST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino**. Tese - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2006.

GADELHA, B. A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, B.M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, v.68, p.147-S155, 2007.

GALLEGO, A. M.; **Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo**. Dissertação – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2010.

GAMBOA, S. C. O. P. **Infertilidade equina: múltiplas fragilidades ou um “fado” do espermatozoide**. Dissertação – Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Coimbra, Portugal, 2011.

GILLIAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445-457, 2005.

GOMES, A. M. C. **Reprodução, clínica e cirurgia equina**. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal de Goiás, Jataí, Goiás, 2006.

HIRAI, M. et al. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Jornal Andrology**, v.22, p.104-110, 2001.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. **Theriogenology**, 55:733-749, 2001.

KEITH, S. L. **Evaluation of new Cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. Tese – Colorado State University, Fort Collins, Colorado, 1998.

KIRK, E. S.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. In: International Symposium on Stallion Reproduction, 3, Fort Collins. Proceedings. **The Symposium**, Fort Collins, p.37, 2001.

LEME, D. P. **Características reprodutivas de garanhões mantidos sob luz natural ou contínua, em ambiente tropical**. Tese – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, 2003.

MCDONNELL, S. M. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation. University of Pennsylvania, School of Veterinary Medicine, Pennsylvania, USA. **Animal Reproduction Science** n. 68, p.153–159, 2001.

Brandão, I.S.L. – Eficiência do teste de termorresist...

MAGISTRINI, M. et al. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391-410, 1997.

MARTINS, L. F. et al. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n.40, v.7. p.1519-25, 2011.

MATOS, D. L. et al. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, 2008.

MEDEIROS, A. S. L. et al. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.273-276, 2002.

MORTIMER, S. T. Casa - Practical aspects. **Jornal Andrology**, p.515-524, 2000.

MURADAS, P. R.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E. Avanço na avaliação espermática de equinos: Revisão. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 11, n. 3, p. 299-313, 2013.

NEILD, D.N., *et al.* Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.47-56, 2005.

NEVES, J. G. S.; Guimarães, J. D.; Freitas, B. W.; Amorim, L. S. Influência da sazonalidade sobre a composição e a qualidade seminal de garanhões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.73-78, 2016.

OLIVEIRA, R. A. **Antioxidantes na viabilidade do sêmen equino congelado e resfriado**. Tese – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiânia, 2011(a).

OLIVEIRA, G. C. et al. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, 2013 (b).

PUGLIESI, G. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5 °C por 24 horas com dois diluidores**. Dissertação – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2009.

PURDY P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rum Resum**, v. 3, n. 63, p. 215-225. 2006.

RODRIGUES, M. B. A. et al. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.40-45, 2017.

ROTH, T. L.; WEISS, R. B.; BUFF, J. L. Heterologous *in vitro* fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology Reproduction**, v.58, p.475-482, 1998.

RUA, M. A. S. et al. Espermatogênese em equinos. **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 7, ed. 256, 2014.

SAMPER, J. C. Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Philadelphia, USA: **W.B.Saunders**, 2nd ed, 336p. 2009.

SANCLER-SILVA, Y. F. R. et al. Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, n.1. p.58-60, 2014.

SANTOS, M. A M. et al. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.11, p.925-932, 2015.

SANTOS, J. F. D et al. Qualidade do sêmen bovino criopreservado. **Revista Espacios**, v. 39 n. 14, p.18. 2018.

SCHIMITT, F. L. **A concentração, a composição e a qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen equino a + 4 °C**. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2008.

SILVA, P. F. N.; GADELLA; B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

SILVA, L. M. et al. Comparação morfológica da célula espermática equina no sêmen fresco e refrigerado. Biofísica e Radiobiologia, Biociências. **Anais: encontro anual da biofísica**, p.22-25, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2017.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. I. The fluid mosaic modelo of the structureof cell membranes. **Science**, v.175, p. 720-731, 2003.

SOUZA, N. L. **Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados equinos**. Dissertação - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, São Paulo 2001.

SQUIRES, E. L. et al. Cooled and frozen stallion semen. **Bulletin**, n.9, p.1-38, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Fort Collins, 1999.

TAFFNER, A. V. et al. **Características reprodutivas equinas e suas diferentes fases no ano**. Trabalho de atividade prática dirigida – Anhanguera Educacional, Campinas, São Paulo, 2016. Disponível em: < https://www.academia.edu/28695281/CARACTERISTICAS_REPRODUTIVAS_EQUIQU?auto=download>. Acesso em: 14 dez. 2020.

VARNER, D. D. et al. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20 °C. **Theriogenology**, v.32, p.515-525, 1989.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VITA, B. **Biotechnology e inseminação artificial com sêmen congelado equino**. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

Brandão, I.S.L. – Eficiência do teste de termorresist...

VITA, B. et al. O. Utilização de sistemas de refrigeração de sêmen equino na estabilização das amostras seminais previamente à congelação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 120 - 125, 2011.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

Influência do tempo na fertilidade do sêmen descongelado de garanhões da raça Quarto de Milha***Influence of time on fertility of thawed semen of Quarter mile stallions*****Illanna de Souza Lima Brandão¹, Antonio Brito da Silva Filho¹, Andreza Rodrigues Viana², Maria Madalena Pessoa Guerra¹, Jurandy Mauro Penitente Filho³, Gustavo Ferrer Carneiro¹**

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil; ²Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, UFAPE, Garanhuns, Pernambuco, Brasil; ³Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar parâmetros de qualidade seminal *in vitro* de diferentes garanhões correlacionando com o tempo, com finalidade de se obter uma técnica com maior repetibilidade, e que auxilie no incremento dos resultados no uso de sêmen congelado equino. Foram utilizadas amostras criopreservadas de sêmen de 4 garanhões da raça Quarto de Milha, em 5 repetições, submetidos a TTR nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos. Foram avaliadas a cinética espermática, a integridade de membrana e acrossômica, a morfologia espermática, e realizada comprovação de viabilidade *in vivo*. A análise dos dados foi realizada pelo Statistical Analysis System (SAS), em modelos lineares mistos com parcelas repetidas no tempo, adotando estrutura de covariância autoregressiva. E as médias comparadas pelo teste de Tukey Kramer. As correlações entre as variáveis em estudo foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Foi observada uma interação significativa nos parâmetros Reprodutor, Tempo e interação Reprodutor x tempo ($p < 0,001$) na cinética espermática, indicando individualidade entre garanhões em termos de longevidade espermática. Essa individualidade se repetiu na integridade de membrana, onde apenas um dos garanhões manteve membrana íntegra sem diferença significativa até os 90 minutos pós-TTR, enquanto que os demais reprodutores obtiveram diferença na integridade de membrana aos 30 e aos 60 minutos, respectivamente. Não houve diferença na patologia espermática ou na integridade de acrossoma entre tempos ou reprodutores. Das éguas inseminadas 50% (5/10) apresentaram embrião ou prenhez e todas as amostras seminais apresentaram pelo menos 1 égua prenhe ou produziram embriões. O estudo demonstrou claramente a individualidade dos reprodutores e a necessidade de mais conhecimento das características seminais de longevidade espermática de cada garanhão a fim de se padronizar protocolos de IA levando-se em consideração a individualidade do garanhão para se determinar o momento mais adequado para a inseminação de acordo com o tempo da ovulação, mantendo-se índices de fertilidade favoráveis.

Palavras-chave: Equino; criopreservação; longevidade espermática.

[†]Correspondência: illanna.brandao@hotmail.com / Fone:(81) 9 98733122.

Abstract

The aim of this study was to evaluate parameters of seminal quality in vitro of different stallions correlating with time, in order to obtain a technique with greater repeatability, and which helps to increase results in the use of frozen equine semen. Cryopreserved semen samples from 4 Quarter Horses stallions were used, in 5 repetitions, submitted to TTR at times 0, 30, 60 and 90 minutes. Sperm kinetics, membrane and acrosome integrity, sperm morphology were evaluated, and in vivo viability was demonstrated. Data analysis was performed by the Statistical Analysis System (SAS), in mixed linear models with plots repeated over time, adopting autoregressive covariance structure. And the means compared by the Tukey Kramer test. The correlations between the variables under study were assessed using Spearman's correlation coefficient. A significant interaction was observed in the parameters Breeder, Time and Breeder x time interaction ($p < 0.001$) in sperm kinetics, indicating individuality between stallions in terms of sperm longevity. This individuality was repeated in the membrane integrity, where only one of the stallions maintained an intact membrane without significant difference until 90 minutes after TTR, while the other breeders obtained a difference in membrane integrity at 30 and 60 minutes, respectively. There was no difference in sperm pathology or acrosome integrity between times or reproducers. Of the inseminated mares 50% (5/10) presented embryo or pregnancy and all seminal samples presented at least 1 pregnant mare or produced embryos. The study clearly demonstrated the individuality of the breeders and the need for more knowledge of the semen characteristics of sperm longevity in order to standardize AI protocols taking into account the individuality of the stallion to determine the most appropriate time for insemination according to the time of ovulation, maintaining favorable fertility rates

Keywords: Equine, criopreservação; sperm longevity

Introdução

É certo que as técnicas de criopreservação de sêmen representam uma importante ferramenta na conservação e disseminação genética para espécie equina, uma vez que, maximizam o uso de reprodutores geneticamente superiores e formam um banco genético disponível por tempo indeterminado. Todavia, apesar de suas vantagens, esse processo possui limitações que geram entraves para sua disseminação. Algo que pode levar ao aparecimento de danos muitas vezes irreversíveis aos espermatozoides, como perda de motilidade, alterações estruturais e funcionais da membrana espermática e, conseqüentemente, diminuição do poder fecundante. (Santos *et al.*, 2015).

Também é importante salientar que, no geral, variáveis como a ausência de seleção genética para características de fertilidade e a individualidade reprodutiva de cada garanhão, muitas vezes não são levadas em consideração, mas estão diretamente relacionadas a capacidade de criossobrevivência das células espermáticas. Sendo assim observadas diferenças na estabilidade espermática em relação ao processo de criopreservação resultando em dano celular e,

consequentemente, comprometimento da função celular, sendo a membrana plasmática o local primário das lesões oriundas de criopreservação (Sieme *et al.*, 2015).

É conhecido que o potencial de fertilização do espermatozoide depende da integridade física e funcional de sua membrana, tornando difícil que um único teste laboratorial seja capaz de determinar a fertilidade seminal. Dessa forma, para se estimar a qualidade de uma amostra seminal é imprescindível se lançar mão de diferentes técnicas para avaliar as características físicas do ejaculado, a motilidade e longevidade dos espermatozoides, a funcionalidade e integridade estrutural das membranas espermáticas (Oliveira, 2007).

O conhecimento prévio da qualidade espermática dos ganhos através da utilização de testes na avaliação das injúrias é de fundamental importância a fim de que sejam criados protocolos de congelamento/descongelamento cada vez menos danosos as células espermáticas, ocasionando assim, impacto negativo menor nos índices de fertilidade (Santos, 2014).

De forma geral, a avaliação da motilidade tornou-se um recurso muito utilizado para se obter informações quanto aos efeitos da criopreservação sobre a célula espermática, sendo empregada em diversos estudos com o objetivo de se comparar diluentes e diluições, métodos de resfriamento e congelação. Uma vez que, a motilidade é considerada um elemento fundamental para a fecundação, onde um dano irreversível pode representar perda da função celular. Assim, pode ser avaliada de modo subjetivo ou através do *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA), que tem um papel importante e crescente para a garantia da qualidade de produto de sêmen comercializados para inseminação artificial de equinos, mas também de bovinos e suínos (Linden, 2012).

Todavia, desde 1988 o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) recomenda o emprego do teste de termorresistência (TTR), como técnica complementar, mas não menos importante, na avaliação de sêmen das diferentes espécies animais (Oliveira, 2010). A longevidade dos espermatozoides diluídos e descongelados pode ser estudada através do TTR, que avalia a motilidade e o vigor espermáticos no tempo zero (momento quando o sêmen é descongelado) e em períodos de tempo que podem variar de 30 a 90, 180 e 240 minutos. Contudo, este tipo de análise pode ser afetada pelo efeito do ejaculado, método de congelamento e efeitos do tempo incubação (Aidar, 2013).

Em vista disso, o trabalho teve como objetivo avaliar parâmetros de qualidade seminal *in vitro* de diferentes ganhos durante o teste de termorresistência, com o propósito de se obter uma técnica com maior repetibilidade, e que auxilie no incremento dos resultados no uso de sêmen congelado equino.

Material e Métodos

Obtenção e local de análise das amostras

Foram utilizadas amostras criopreservadas de sêmen de quatro garanhões da raça Quarto de Milha, oriundos do Haras Monte Verde (Sairé/PE). Todos os procedimentos envolvendo animais teve a anuência da Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE), sob licença nº 013/2019 CEUA/UFRPE. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Andrologia (ANDROLAB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco (LABRAPE) da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE).

Análises laboratoriais

- Teste de termorresistência

Foram utilizadas amostras criopreservadas de sêmen de 4 garanhões da raça Quarto de Milha, em 5 repetições, submetidos a teste de termorresistência avaliando tempo 0, 30, 60 e 90 minutos.

- Cinética espermática

Para determinação da cinética espermática, uma palheta de sêmen congelado de cada garanhão foi descongelada em banho-maria, à 37 °C, por 30 segundos. Em seguida, um volume de 2,5 µL de cada amostra foi disposto sobre lâmina e coberta por lamínula, pré-aquecidas a 37 °C; posteriormente, as lâminas foram avaliadas por microscopia de contraste de fase e as imagens captadas por câmara de vídeo. As amostras foram avaliadas com cinco repetições cada, com intervalos distribuídos nos tempos (T), sendo o T0, considerando-se 10 minutos, o T1 de 30 minutos, T2 de 1 hora, o T3 de 1 hora e 30 minutos, e o T4 de 2 horas, após o descongelamento.

As amostras foram avaliadas quanto aos padrões de movimento, observando-se cinco campos aleatórios e um número mínimo de 150 espermatozoides utilizando-se o sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) (Aidar, 2013). Os parâmetros avaliados da motilidade espermática pelo sistema foram: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; µm/s), velocidade em linha reta (VSL; µm/s), velocidade curvilínea (VCL; µm/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), índice de oscilação (WOB; %); linearidade (LIN; %). O sistema CASA foi configurado com os

Brandão, I.S.L. – Eficiência do teste de termorresist...

seguintes parâmetros: temperatura – 37 °C, magnificação - 100x, imagens por segundo - 25, área de cabeça - 20 a 70 μm^2 , VAP - lentos 10 $\mu\text{m/s}$ < médios 45 $\mu\text{m/s}$ < rápidos 75 $\mu\text{m/s}$, progressividade - 80% STR e movimento circular - 50% LIN.

- Integridade da membrana plasmática

Para essa avaliação, as amostras foram coradas com o método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) e Iodeto de Propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) modificado por Coletto *et al.*, 2002. Volume de 30 μL de sêmen diluídas em 150 μL de Tris (3,605 g de Tris; 2,024 de ácido cítrico; 1,488 g de frutose, 100 mL de água bidestilada; pH 6,8), contendo 5 μL de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 μL de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos à 37 °C e fixadas com solução tampão fosfato salina adicionada de 0,5 μL de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência, com aumento de 400x, usando filtro de imersão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485-520 nm. Foram considerados espermatozoides com membrana intacta, os que se apresentaram marcados em verde, e com membrana plasmática danificada, os marcados em vermelho.

- Integridade do acrossoma

Para avaliação desse parâmetro, os espermatozoides foram corados com Isotiocianato de Fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) de acordo com técnica descrita por Roth *et al.*, (1998). Foram utilizados 5 μL de sêmen para preparação de esfregaço, que foi seco ao ar. Foi preparada uma solução de FITC-PNA para uso com concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$, a partir de uma solução estoque de FITC-PNA (1mg/mL) e PBS na proporção de 1:10. Alíquotas (10-20 μL) desta solução foram colocadas sobre os esfregaços, os quais foram incubados por 15 minutos em câmara úmida à 4 °C, na ausência de luz. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em solução de PBS, refrigerada (4 °C), e dispostas para secar na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 μL de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre a lâmina e a mesma coberta com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x sob óleo de imersão em microscopia de epifluorescência, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os espermatozoides, foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentaram região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossomas reagidos/danificados, quando apresentaram faixa verde fluorescente

na região equatorial da cabeça espermática, ou não apresentaram fluorescência verde em toda região acrossômica.

- Avaliação da morfologia espermática

Foram realizadas análises pelo método de câmara úmida em microscópio de contraste de fase. Na qual os espermatozoides não são corados, e a técnica microscópica é capaz de destacar os contornos celulares. Proporcionando uma melhor observação de defeitos importantes para o diagnóstico de um bom reprodutor, além daqueles relacionados com a fertilização e a formação de um futuro embrião (Reis *et al.*, 2015).

As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37 °C, durante 30 segundos. Em seguida, depositou-se 10 µL da amostra sobre lâmina de microscopia e cobriu-se com lamínula. Para observação de peça intermediária e cauda foi feita a diluição em formol-salina (5%) e o sêmen levado ao microscópio de contraste de fase em objetiva de imersão (aumento de 1000x) para análise, onde foram contadas 200 células espermáticas de cada amostra, contabilizando-se células normais e apenas um defeito por célula anormal. Quando observados dois ou mais defeitos na mesma célula, foi registrado em ordem de prioridade, o defeito maior em relação ao menor e, quando observados dois defeitos de mesma classificação, foi registrado apenas o de maior frequência/incidência (Araújo e Araújo, 2010; CBRA, 2013).

- Viabilidade *in vivo*

Para comprovação de viabilidade *in vivo*, 10 éguas foram inseminadas para gestação ou coleta de embriões distribuídas aleatoriamente entre os reprodutores. A ovulação das éguas foi induzida através da administração endovenosa de 1.500 UI de hCG quando apresentavam, ao exame ultrassonográfico, folículo de 35 mm e inseminadas na ponta do corno ipsilateral a ovulação, 36 horas pós-indução.

- Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizado o Statistical Analysis System (SAS University version). Os dados em porcentagem foram submetidos à transformação angular ($Y' = \arcsen \sqrt{Y}$) e analisados em modelos lineares mistos (Mixed Procedure) com parcelas repetidas no tempo (Littell *et al.*, 2006), de acordo com o modelo matemático: $Y_{ijk} = \mu + A_i + T_j + (AT)_{ij} + e_{ijk}$

Em que: Y_{ijkl} , resposta; μ , constante; A_i , efeito do animal; T_j , efeito do tempo; $(AT)_{ij}$, interação; e e_{ijk} , erro aleatório.

O fator de medidas repetidas foi o tempo em cada nível de coleta (animal) (subject), foi adotada estrutura de covariância autorregressiva (AR(1)). As médias (LS-means) foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. Para maior clareza os dados foram apresentados em porcentagem.

As correlações entre as variáveis em estudo foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

Resultados

A avaliação de múltiplas características espermáticas em uma única amostra de sêmen com alto grau de acurácia e repetibilidade foi realizada através do CASA. A partir das análises realizadas por esse método, foi observado diferenças individuais entre os animais utilizados para o experimento e os tempos testados. Dessa forma, quando observado o fator tempo, constatou-se que para o garanhão G2 não houve diferença significativa em quaisquer das variáveis analisadas. O qual também se destacou dentre os demais animais, quanto a resistência e longevidade espermática.

Quando analisadas as variáveis IMP, IAC e MT, no T90 o resultado foi significativamente menor que nos tempos T0 e T30 para os garanhões G1, G3 e G4. Ao analisar os indivíduos, foi possível observar que no tempo T60 o garanhão G3 apresentou índices de IMP, IAC e MT inferiores aos observados para os garanhões G1, G2 e G4. Em contrapartida, no tempo T90, o garanhão G2 se sobressaiu em relação aos demais (Tab. 1).

Quanto a avaliação de MP, para o garanhão G3 os valores observados nos tempos T60 e T90 foram inferiores aqueles nos tempos T0 e T30. Para o garanhão G4, o índice no tempo T60 foi inferior ao do T0, e o tempo T90 inferior a todos os outros períodos. Quando analisadas as diferenças entre os animais, foi observado que os resultados obtidos para o garanhão G3 foram inferiores aos do garanhão G2 em todos os tempos estudados; e inferior ao garanhão G4 no tempo T60. Ao passo que, o garanhão G1 apresentou resposta inferior a todos os garanhões no tempo T90, e o garanhão G2, mostrou-se superior aos demais (Tab. 1).

Para as variáveis LIN, STR, WOB, VCL, VAP, ALH e BCF houve diferença entre os tempos analisados para os garanhões G3 e G4. Para o garanhão G3, os valores das variáveis nos tempos T0 e T30 foram superiores aos observados em T60 e T90. Enquanto que para o garanhão G4 os tempos T0 e T30 mostraram-se superiores apenas as do tempo T90. Quando comparado os garanhões, no tempo T60, o garanhão G3 apresentou índices inferiores a todos

os outros animais. Enquanto, no tempo T90, o garanhão G1 apresentou índices inferiores aos demais animais, e o garanhão G2 foi superior a todos (Tab. 2, 3 e 4).

Na avaliação do fator VSL, foi observada uma variabilidade acentuada em relação a termorresistência das amostras espermáticas dos diferentes animais. Para o garanhão G1, os tempos T0 e T30 apresentaram resultados superiores aos do tempo T90; assim como para o garanhão G3 também os tempos T0 e T30 foram superiores aos tempos T60 e T90. Enquanto para o garanhão G4, apenas o tempo T0 foi superior ao tempo T90. Quando comparados entre si, foi observado que os garanhões G2 e G4 mostraram respostas superiores ao garanhão G3, no tempo T60. Em contraponto, no tempo T90, o garanhão G2 se mostrou superior aos garanhões G1 e G3 (Tab. 4).

No que diz respeito a morfologia das células espermáticas, as mesmas foram contabilizadas e classificadas em células normais e aquelas que apresentaram defeitos foram divididas em dois grupos, o de defeitos maiores (relacionados a cabeça, acrossoma, peça intermediária e presença de gota proximal), e defeitos menores (relacionados a alterações na cauda e presença de gota distal).

Quanto as células normais, foi observado que o garanhão G1 apresentou maior número quando comparado aos garanhões G3 ($p=0,0002$) e G4 ($p=0,0089$). E que o garanhão G2 se sobressaiu quando comparado ao garanhão G3 ($p=0,0017$). Quando avaliados os defeitos menores, constatou-se que o garanhão G4 apresentou mais defeitos que G1 ($p=0,0089$), não havendo diferença entre os demais indivíduos. E quanto aos defeitos maiores, foi constatado que o garanhão G3 apresentou a maior quantidade de células anormais em detrimento de todos os outros garanhões (G1, $p=0,0037$; G2, $p=0,0008$; e G3, $p=0,0171$) (Fig. 1).

Discussão

A longevidade e a resistência espermáticas, fatores ligados ao índice de fertilidade do animal, são características que estão possivelmente relacionados ao fator genético de resistência celular de cada indivíduo aos consequentes danos do processo de descongelamento, determinando a forma como a membrana celular interage com o crioprotetor, conferindo assim, menor ou maior proteção a mesma (Alvarenga e Papa, 2011; Santos, 2014).

Segundo Almeida (2006) e Amorim (2008), o estresse oxidativo ao qual as células espermáticas são submetidas no processo de descongelamento, é um dos fatores que interfere diretamente no metabolismo celular, reduz a motilidade, e leva a alterações, muitas vezes

irreversíveis, nas membranas plasmática e acrossomal, o que conseqüentemente, acaba reduzindo a longevidade das células espermáticas.

Além disso, Loomis e Graham (2008), afirmam que há diferenças inerentes na capacidade espermática, entre os machos, de sobreviver à criopreservação. Assim, existem particularidades não apenas entre as espécies nas taxas de sobrevivência dos espermatozoides, mas também entre indivíduos de uma mesma espécie. Essas diferenças provavelmente estão relacionadas as características bioquímicas e metabólicas das células espermáticas, determinando assim, a capacidade de criorresistência, que por sua vez são determinados geneticamente.

Esses dados corroboram a maioria dos estudos com sêmen equino, nos quais é possível constatar a queda dos parâmetros relacionados a velocidade e movimento espermáticos conforme o passar do tempo. Segundo Amorim (2008), a criopreservação e o descongelamento, promovem a cristalização da água e mudanças osmóticas no meio extracelular, resultando em alterações nos componentes da membrana plasmática, aumentando sua permeabilidade, diminuindo sua atividade metabólica, causando danos no acrossoma e em outras estruturas, alterações nas concentrações de eletrólitos intracelulares, levando a queda significativa da motilidade, e conseqüente perda da capacidade fecundante.

Todavia, diferentemente do observado no presente estudo, Almeida (2006), demonstrou elevada taxa nos índices de velocidade no pós-descongelamento. Podendo ser explicado pelo fato de que alguns garanhões possuem sêmen de boa congelabilidade em detrimento de outros. O que pode justificar a estabilidade observada nas amostras do garanhão G2 do presente estudo.

Segundo Muradas *et al.* (2013) e Alamaary *et al.* (2019), os padrões de motilidade e velocidade são importantes parâmetros a serem levados em consideração na avaliação de reprodutores. Uma vez que o espermatozoide necessita de uma boa MP para atingir o oviduto, encontrar e penetrar o oócito. Sendo assim, uma porcentagem de espermatozoides com boa motilidade está relacionada ao potencial fértil do sêmen. Logo, pode-se afirmar que para os animais estudados, o tempo T30 para a variável em questão é o ideal, visto que, após esse período o índice decresce, podendo assim comprometer o transporte dos gametas até o oviduto em tempo hábil para a manutenção da fertilidade dos garanhões.

Sendo assim, é possível afirmar que apesar de alguns animais terem mantido as características seminais por mais tempo que outros, o recomendável é que o tempo entre o

processo de descongelamento e a utilização do sêmen seja feito em até 30 minutos, uma vez que as características gerais serão mantidas.

Além disso, outra característica que deve ser levada em consideração quando da avaliação seminal, é morfologia espermática que fornece informações adicionais sobre as características individuais dos espermatozoides, e este dado é de grande valor, uma vez que os espermatozoides podem possuir boa motilidade, e ainda ter uma incidência relativamente alta de anormalidades morfológicas (Neves et al., 2016).

Um reprodutor que apresenta alta taxa de espermatozoides morfolologicamente normais possui uma correlação positivamente com a taxa de fertilidade. No entanto, a avaliação isolada da morfologia espermática pode não afirmar que o potencial de fertilidade de um ejaculado é alto, mas pode indicar se o potencial de fertilidade é baixo, principalmente quando houver altas porcentagens de anormalidades espermáticas. Além disso, os garanhões podem ter muitas anormalidades espermáticas e ainda apresentar fertilidade normal (Silva, 2017).

Apesar de haver individualidade entre os garanhões estudados, houve resultado positivo para viabilidade *in vivo*, visto que para esse teste houve taxa de prenhez nas éguas inseminadas com o sêmen criopreservado de todos os garanhões estudados. O que se torna relevante, uma vez que, a maioria dos estudos de viabilidade espermática, tem sido conduzidos apenas *in vitro*, sendo que neste trabalho tivemos a preocupação de utilizar a comprovação *in vivo* para nos certificarmos da viabilidade espermática das amostras estudadas.

Conclusões

O estudo demonstrou claramente a influência dos fatores tempo e individualidade de cada reprodutor nas provas as quais os mesmos foram submetidos, e a necessidade de mais conhecimento das características seminais de longevidade espermática de cada garanhão a fim de se padronizar protocolos de IA mais eficientes, levando-se em consideração a individualidade do garanhão para se determinar o momento mais adequado para a inseminação de acordo com o tempo da ovulação, mantendo-se índices de fertilidade favoráveis.

Foi comprovado que o sêmen pode ser utilizado com segurança até o tempo T30 minutos após descongelamento, uma vez que, o estudo demonstrou que até esse período de tempo as características seminais são mantidas sem comprometimento da fertilidade do sêmen, desde que, sejam respeitados os princípios de armazenamento e descongelamento do mesmo.

Maiores estudos se fazem necessário correlacionando os dados *in vitro* com os achados de provas de campo, uma vez que as provas *in vitro* podem predizer, com certo grau de acurácia, a viabilidade fértil de um reprodutor, mas só a taxa de prenhez referenda esses resultados.

Referências

- Aidar, N. B.** Criopreservação de sêmen equino. 2013. 52f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2013. Disponível em: <https://bdm.unb.br/bitstream/10483/4774/1/2013_NayaraBragaAidar.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2019.
- Alamaary, M. S.; Haron, A. W.; Ali, M.; Hiew, M. W. H.; Adamu, L.; Peter, I. D.** Effects of four extenders on the quality of frozen semen in Arabian stallions. *Veterinary World*, n. 4, v. 12, p. 34-40, 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6431823/>>. Acesso em: 06 jul. 2020.
- Almeida, J. L.** Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino. 2006. 90f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006. Disponível em:< <https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/5069/1/Juliana%20Lopes%20Almeida.pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2020.
- Alvarenga, M.A.; Papa, F.O.** Principais avanços no processamento e aplicação do sêmen congelado de equinos. *SPERMOVA*, v.1, n.1, p.7-10, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000090&pid=S18096891201400030001100004&lng=pt>. Acesso em: 29 jul. 2020.
- Amorim, E. A. M.** Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen. 2008. 194f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) – Universidade de Viçosa, Minas Gerais, 2008. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/1689>>. Acesso em: 16 jul. 2020.
- Araújo, A. M. S'A.; Araújo, S. A. C.** Alterações morfológicas encontradas nas células espermáticas de garanhões pônei. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, n. 15, ano VII, 2010. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/ZWtYtpN6RuBhs4X_2013-6-25-15-36-32.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2020.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte. 3º edição, p.45-46. 2013.
- Coletto, Z. F.; Guerra, M.M.P.; Batista, A.M.** Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, São Paulo, v. 24, p. 101-104, 2002. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/284041741_Avaliacao_do_semen_congelado_de_caprinos_com_drogas_fluorescentes>. Acesso em: 18 jul. 2020.
- Linden, L. S. V.** Criopreservação do sêmen equino: comparação da gema de ovo de ema (Rhea americana) com a gema de ovo de galinha. 2012. 62f. Dissertação de mestrado (Programa de Medicina Animal: Equinos) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/61445/000865642.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 29 jun. 2020.
- Littell, R. C., Milliken, G. A., Stroup, W. W., Wolfinger, R. D., Schabenberger, O.** SAS® for mixed models, 2nd edn. Cary, NC: SAS Institute Inc. 814p. 2006.
- Loomis P.R.; Graham, J.K.** Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal*

Reproduction Science, n. 105, p.119–128. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18178040/>>. Acesso em: 26 jul. 2020.

Muradas, P. R.; Weiss, R. R.; Kozicki, L. E. Avanço na avaliação espermática de equinos: revisão. Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais, Curitiba, v. 11, n. 3, p. 299-313, 2013. Disponível em: <<https://periodicos.pucpr.br/index.php/cienciaanimal/article/view/11960/1129>>. Acesso em: 08 jun. 2020.

Neves, J. G. S.; Guimarães, J. D.; Freitas, B. W.; Amorim, L. S. Influência da sazonalidade sobre a composição e a qualidade seminal de garanhões. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.73-78, abr./jun. 2016. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p73-78%20\(RB591\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p73-78%20(RB591).pdf)>. Acesso em: 02 jun. 2020.

Oliveira, C. H. Avaliação das características do espermatozoide equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas. Dissertação de mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2007. 85f. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SSLA-7UDHRY>>. Acesso em: 13 jun. 2020.

Oliveira, R. R. Efeito in vitro da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoide de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/5660>>. Acesso em: 13 jun. 2020.

Reis, J. R.; Cavalero, T. M. S.; Jacomini, J. O. Morfologia espermática de touros nelore, pantaneiro e curraleiro avaliada de amostras coletadas diretamente dos testículos e dos epidídimos. Horizonte Científico, Uberlândia, v. 9, n. 2, 2015. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/view/28456>>. Acesso em: 28 jul. 2020.

Roth, T.L.; Weiss, R.B.; Buff, L.M. Heterologous *in vitro* fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). Biol. Reprod., v.58, p.475-482, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9475404/>>. Acesso em: 20 fev. 2020.

Santos, M. A. M. Avaliação das características do sêmen à fresco e congelado-descongelado de garanhões da raça Nordestina. Dissertação mestrado (Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco. 2014. 52f. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2015001100925&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 29 jul. 2020.

Santos, M. A. M. Santos; Gradela, A.; Moraes, E.A.; Souza; W. L.; Alves, N. G.; Costa, J. M. S.; Matos, W. C.G. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 35, n.11, p.925-932, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2015001100925&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 30 jul. 2020.

Sieme, H.; Oldenhof1, H.; Martinsson, G.; Burger, D.; Wolkers, W. F. Equine semen cryopreservation: inter-individual variation, centrifugation processing, protective agents, and freezing protocols. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.11-

14, 2015. Disponível em: <[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n1/pag11-14%20\(RB553\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n1/pag11-14%20(RB553).pdf)>. Acesso em: 26 jul. 2020.

Silva, L. T.; Maia, M. S.; Aquino, J. J. M; Moura, C. E. B. Comparação morfológica da célula espermática equina no sêmen fresco e refrigerado. In: encontro anual da Biofísica, UFPE, 2017, Recife. Anais eletrônicos... Recife: UFPE, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1081560/comparacao-morfologica-da-celula-espermatoca-equina-no-semen-fresco-e-refrigerado>>. Acesso em: 17 jun. 2020.

Anexos

Tabela 1. Valores das variáveis Integridade da membrana plasmática (IMP), Integridade do acrossoma (IAC), Motilidade total (MT) e Motilidade progressiva (MP), de acordo com o animal e o tempo (Média ± erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Animal	IMP (%)				IAC (%)				MT (%)				MP (%)			
	Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)			
	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90
G1	37,1 ± 3,5 ^{aA}	36,6 ± 4,4 ^{aA}	36,1 ± 5,3 ^{aA}	0,0 ^{aB}	77,4 ± 4,5 ^{aA}	68,0 ± 8,8 ^{aA}	75,0 ± 2,5 ^{aA}	16,5 ± 16,5 ^{aB}	58,4 ± 6,4 ^{aA}	52,7 ± 9,0 ^{aA}	41,4 ± 10,6 ^{aA}	9,8 ± 9,8 ^{aB}	26,8 ± 2,9 ^{abA}	18,9 ± 4,9 ^{abA}	10,7 ± 3,4 ^{abA}	3,1 ± 3,1 ^{aB}
G2	34,0 ± 4,0 ^{aA}	41,5 ± 5,5 ^{aA}	34,4 ± 2,0 ^{aA}	28,5 ± 3,8 ^{bA}	83,2 ± 2,1 ^{aA}	79,2 ± 2,1 ^{aA}	82,5 ± 1,6 ^{aA}	77,2 ± 2,3 ^{ba}	73,7 ± 4,3 ^{aA}	63 ± 4,1 ^{aA}	56,4 ± 6,3 ^{aA}	64,3 ± 9,0 ^{ba}	47,1 ± 3,3 ^{aA}	38,2 ± 2,4 ^{aA}	30,5 ± 4,9 ^{aA}	34,8 ± 5,6 ^{ba}
G3	27,2 ± 1,9 ^{aA}	27,1 ± 1,1 ^{aA}	0,0 ^{bb}	0,0 ^{aB}	78,5 ± 4,7 ^{aA}	78,7 ± 3,4 ^{aA}	0,0 ^{bb}	0,0 ^{aB}	42,4 ± 2,9 ^{aA}	35,2 ± 3,5 ^{aA}	0,0 ^{bb}	0,0 ^{aB}	17,7 ± 2,8 ^{ba}	12,6 ± 2,2 ^{ba}	0,0 ^{bb}	0,0 ^{aB}
G4	37,3 ± 2,1 ^{aA}	37,7 ± 2,2 ^{aA}	32,5 ± 2,9 ^{aA}	0,0 ^{aB}	81,1 ± 2,8 ^{aA}	78,4 ± 2,4 ^{aA}	81,3 ± 1,1 ^{aA}	0,0 ^{aB}	71,7 ± 3,2 ^{aA}	57,3 ± 8,5 ^{aA}	40,3 ± 14,4 ^{aA}	16,8 ± 10,3 ^{ab}	43,3 ± 2,7 ^{abA}	26,3 ± 7,3 ^{abAB}	16,5 ± 7,5 ^{aB}	3,6 ± 2,2 ^{ac}

G1 – Garanhão 1; G2 – Garanhão 2; G3 – Garanhão 3; G4 – Garanhão 4; T0 – Tempo zero; T30 – Tempo de 30 minutos; T60 – Tempo de 60 minutos e T90 – Tempo de 90 minutos.

Brandão, I.S.L. – Eficiência do teste de termorresist...

Tabela 2. Valores das variáveis Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR) e Índice de oscilação (WOB), de acordo com o animal e o tempo (Média ± erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Animal	LIN (%)				STR (%)				WOB (%)			
	Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)			
	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90
G1	65,9 ± 2,6 ^{aA}	62,0 ± 3,8 ^{aA}	52,7 ± 13,9 ^{aA}	12,8 ± 12,8 ^{aB}	82,4 ± 2,1 ^{aA}	77,1 ± 2,9 ^{aA}	62,9 ± 16,0 ^{aA}	15,7 ± 15,7 ^{aB}	80,2 ± 1,3 ^{aA}	80,2 ± 2,0 ^{aA}	66,6 ± 16,8 ^{aA}	16,2 ± 16,2 ^{aB}
G2	72,8 ± 1,9 ^{aA}	73,2 ± 0,7 ^{aA}	73,2 ± 1,6 ^{aA}	71,5 ± 2,6 ^{bA}	86,6 ± 0,7 ^{aA}	86,9 ± 0,6 ^{aA}	86,9 ± 0,7 ^{aA}	84,3 ± 1,3 ^{bA}	84,1 ± 1,5 ^{aA}	84,3 ± 0,3 ^{aA}	84,2 ± 1,2 ^{aA}	82,3 ± 1,2 ^{bA}
G3	67,9 ± 2,1 ^{aA}	68,0 ± 2,0 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{aB}	84,4 ± 1,3 ^{aA}	82,9 ± 1,2 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{aB}	80,4 ± 1,3 ^{aA}	82,0 ± 1,6 ^{aA}	0,0 ^{bB}	7,8 ± 7,8 ^{aB}
G4	76,4 ± 1,7 ^{aA}	74,7 ± 0,5 ^{aA}	59,1 ± 14,8 ^{aAB}	30,4 ± 18,6 ^{aB}	89,4 ± 0,8 ^{aA}	88,6 ± 0,9 ^{aA}	69,3 ± 17,3 ^{aAB}	35,4 ± 21,7 ^{aB}	85,5 ± 1,3 ^{aA}	84,2 ± 1,2 ^{aA}	68,0 ± 17,0 ^{aAB}	34,3 ± 21,0 ^{aB}

G1 – Garanhão 1; G2 – Garanhão 2; G3 – Garanhão 3; G4 – Garanhão 4; T0 – Tempo zero; T30 – Tempo de 30 minutos; T60 – Tempo de 60 minutos e T90 – Tempo de 90 minutos.

Brandão, I.S.L. – Eficiência do teste de termorresist...

Tabela 3. Valores das variáveis Porcentagem de células rápidas (RAP), Frequência de batimentos (BFC) e Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), de acordo com o animal e o tempo (Média ± erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Animal	RAP (%)				BFC (Hz)				ALH (µm)			
	Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)			
	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90
G1	9,6 ± 0,4 ^{aa}	9,5 ± 0,5 ^{aa}	7,2 ± 2,0 ^{aA}	1,7 ± 1,7 ^{aB}	2,4 ± 0,2 ^{aA}	2,5 ± 0,3 ^{aA}	1,7 ± 0,5 ^{aA}	0,5 ± 0,5 ^{bB}				
G2	9,4 ± 0,1 ^{aA}	9,6 ± 0,2 ^{aA}	9,4 ± 0,4 ^{aA}	9,6 ± 0,3 ^{bA}	2,3 ± 0,2 ^{aA}	2,4 ± 0,0 ^{aA}	2,4 ± 0,1 ^{aA}	2,5 ± 0,1 ^{aA}				
G3	8,1 ± 1,0 ^{aA}	8,8 ± 0,5 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{aB}	1,9 ± 0,3 ^{aA}	2,2 ± 0,2 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{bB}				
G4	9,1 ± 0,3 ^{aA}	9,6 ± 0,5 ^{aA}	6,7 ± 1,7 ^{aAB}	3,3 ± 2,0 ^{aB}	2,2 ± 0,1 ^{aA}	2,2 ± 0,1 ^{aA}	1,5 ± 0,4 ^{aAB}	0,7 ± 0,4 ^{bB}				

G1 – Garanhão 1; G2 – Garanhão 2; G3 – Garanhão 3; G4 – Garanhão 4; T0 – Tempo zero; T30 – Tempo de 30 minutos; T60 – Tempo de 60 minutos e T90 – Tempo de 90 minutos.

Brandão, I.S.L. – Eficiência do teste de termorresist...

Tabela 4. Valores das variáveis Velocidade curvilínea (VCL), Velocidade linear progressiva (VSL) e Velocidade média de trajetória (VAP), de acordo com o animal e o tempo (Média ± erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Animal	VCL (µm/s)				VSL (µm/s)				VAP (µm/s)			
	Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)			
	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90
G1	68,4 ± 6,0 ^{aA}	61,9 ± 4,0 ^{aA}	42,0 ± 11,7 ^{aA}	10,7 ± 10,7 ^{aB}	44,6 ± 3,0 ^{aA}	38,0 ± 1,9 ^{aA}	26,8 ± 7,0 ^{abAB}	6,8 ± 6,8 ^{aB}	54,3 ± 4,0 ^{aA}	49,4 ± 2,4 ^{aA}	34,5 ± 9,3 ^{aA}	8,7 ± 8,7 ^{aB}
G2	71,7 ± 3,4 ^{aA}	71,8 ± 2,7 ^{aA}	64,0 ± 5,1 ^{aA}	63,3 ± 4,0 ^{baA}	51,6 ± 1,6 ^{aA}	52,2 ± 1,7 ^{aA}	46,7 ± 3,7 ^{aA}	44,9 ± 1,8 ^{baA}	60,2 ± 2,2 ^{aA}	60,1 ± 2,1 ^{aA}	52,0 ± 3,3 ^{aA}	52,2 ± 2,6 ^{baA}
G3	54,8 ± 3,8 ^{aA}	50,1 ± 2,1 ^{aA}	0,0 ^{baB}	7,8 ^{aB}	37,4 ± 3,2 ^{aA}	34,1 ± 1,7 ^{aA}	0,0 ^{baB}	0,0 ^{aB}	44,2 ± 3,4 ^{aA}	41,5 ± 1,9 ^{aA}	0,0 ^{baB}	0,0 ^{aB}
G4	63,6 ± 3,0 ^{aA}	53,2 ± 6,0 ^{aA}	38,9 ± 12,5 ^{aA}	15,2 ± 9,3 ^{aB}	52,4 ± 4,7 ^{aA}	39,6 ± 4,2 ^{aAB}	36,1 ± 14,3 ^{aAB}	17,2 ± 17,2 ^{abB}	52,6 ± 1,7 ^{aA}	44,9 ± 5,2 ^{aA}	31,3 ± 9,1 ^{aAB}	14,1 ± 8,7 ^{aB}

G1 – Garanhão 1; G2 – Garanhão 2; G3 – Garanhão 3; G4 – Garanhão 4; T0 – Tempo zero; T30 – Tempo de 30 minutos; T60 – Tempo de 60 minutos e T90 – Tempo de 90 minutos.

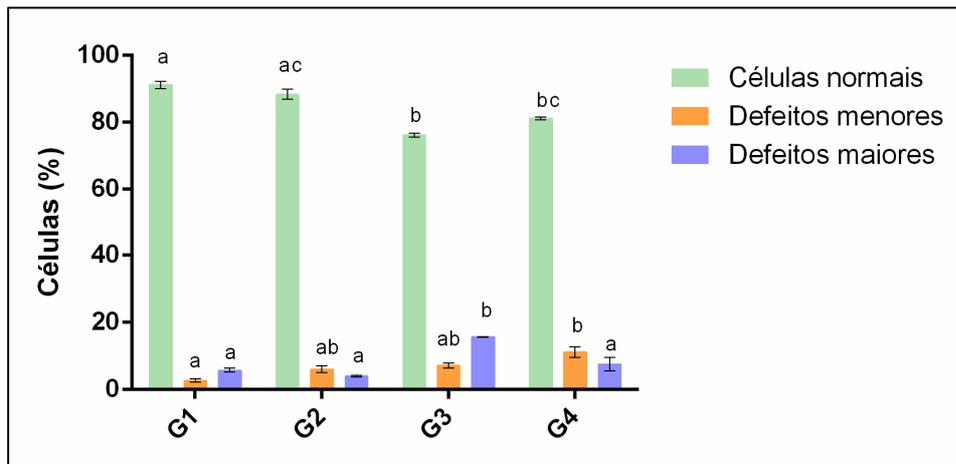


Figura 1. Morfologia de células espermáticas. Para a mesma condição morfológica, letras diferentes indicam diferença entre os animais, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 = Garanhão 1; G2 = Garanhão 2; G3 = Garanhão 3; G4 = Garanhão 4.

**ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO (CEUA-UFRPE)**

- Todos os procedimentos envolvendo animais tiveram a anuência da Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE), sob licença n° 013/2019 CEUA/UFRPE. A saber:



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE



CEUA - UFRPE

Aprovado em
20/03/2019

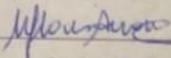
Validade
20/03/2021

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA K 206
Licença condicional para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

A Comissão de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	013/2019
Número do processo	23082.021711/2018-98
Data de emissão da licença	20 de março de 2019
Título do Projeto	“EFEITO DA ADIÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE Binder of Sperm Protein 1 (BSP1) DO FLUÍDO SEMINAL BOVINO, NA QUALIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN HETERÓLOGO”
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão).	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Andreza Rodrigues Viana
Colaboradores	Gustavo Ferrer Carneiro, Arlindo de Alencar Araripe Moura, Gilvannya Gonçalves de Sobral, Oswaldo Gomes Christiano Neto, Maria Madalena Pessoa Guerra
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Equideo macho 04. Total: 04

Profª Drª Marleyne Amorim
Presidente CEUA/UFRPE
STAPE 384977


Profª Drª Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA/UFRPE)

ANEXO B – REGRAS DA REVISTA BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ANIMAL PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO

- Formatação e layout da página, bem como normas de escrita, estão de acordo com a Revista Brasileira de Reprodução Animal, a qual o artigo será submetido. A saber:

Instruções aos autores

A Revista Brasileira de Reprodução Animal (RBRA) destina-se à publicação de artigos científicos, revisões (compilação de informação da literatura, demonstrando análise crítica sobre o tema e com características de excepcionalidade, a juízo do Corpo Editorial), comunicações e relatos de casos, capazes de contribuir, significativamente, para um melhor conhecimento dos fenômenos ligados à reprodução animal, bem como para a divulgação da produção científica da área.

A RBRA, a partir do v.29 de 2005, é publicada exclusivamente on line e está disponível no website do CBRA (<http://www.cbra.org.br>).

Toda correspondência deverá ser encaminhada a Editor-Chefe:

Dr. Marcelo Rezende Luz

Revista Brasileira de Reprodução Animal

E-mail :rbra@cbra.org.br

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA)

Av. Cel José Dias Bicalho 1224, Lj 4, Bairro São Luiz, Pampulha, CEP 31275-050, Belo Horizonte, MG

Fone: (31)3491-7122; Fax: (31)3491-7025.

E-mail : cbra@cbra.org.br e Website: <http://www.cbra.org.br>

POLÍTICA EDITORIAL

Os artigos submetidos à RBRA serão preliminarmente avaliados quanto às normas e a adequação ao escopo da Revista. Somente os artigos aprovados nesta etapa serão encaminhados para a análise do mérito científico por consultores ad hoc.

TIPOS DE ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

Artigo científico: é o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de resultados inéditos e posteriores ao planejamento da pesquisa.

Revisão: análise e discussão do que há disponível na literatura científica e técnica atual sobre um determinado tema. As informações devem ser organizadas de maneira lógica e atrativa, com o objetivo de facilitar ao leitor o acompanhamento da evolução do assunto. As conclusões referem-se ao conjunto dos artigos revistos.

Comunicação: é o relato sucinto de resultados de um trabalho científico adequadamente planejado.

Relato de caso: é o relato de um caso raro, de forma completa e de interesse da clínica médico-veterinária.

NORMAS GERAIS

Os artigos devem ser originais e destinados exclusivamente à publicação na RBRA.

Os autores são responsáveis pelos resultados, pelos conceitos e pelas informações contidas nos artigos.

A redação do artigo deverá estar de acordo com a lexicologia e sintaxe do idioma português. Para ortografia em português, adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras. Para ortografia em inglês, recomenda-se o Webster's Third New International Dictionary.

As unidades de medida devem ser usadas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades. As abreviaturas e os símbolos devem ser evitados, exceto quando forem usadas unidades padrão de medidas.

Os artigos submetidos a aprovação deverão estar em consonância com as normas descritas no capítulo "Preparação do para submissão".

Submissão dos artigos

Os artigos devem ser encaminhados exclusivamente, para o e-mail <rbra@cbra.org.br>. As ilustrações devem ser enviadas em arquivo separado.

Taxa de submissão

A taxa de submissão de R\$95,00 (noventa e cinco reais) por artigo deverá ser depositada na conta Banco Itaú, Agência 3179, conta corrente 08080-3. Uma cópia do comprovante deverá ser encaminhada ao CBRA, via e-mail, juntamente com o artigo submetido. O artigo somente será encaminhado para avaliação se comprovada a quitação do pagamento da taxa de submissão. A taxa de submissão não será devolvida.

Taxa de publicação: Não há taxa de publicação para os artigos aceitos.

PREPARAÇÃO DO TRABALHO PARA SUBMISSÃO

Texto e formato dos arquivos: o artigo deve ser digitado em folha A4 (21.0 x 29.7) com 3 cm de margem (superior, inferior, esquerda, direita), diagramado conforme arquivo modelo anexo. Artigos não diagramados ou diagramados incorretamente não serão aceitos. O arquivo eletrônico deverá ser compatível com Word for Windows. O artigo pode ser escrito em português, inglês ou espanhol.

Tamanho do artigo: O artigo submetido, incluindo as ilustrações e as referências, deverá apresentar no máximo 20 páginas (artigo de revisão), 06-12 páginas (artigo científico), 05 páginas (relato de caso), 05 páginas (comunicação), 05 páginas (nota técnica).

Seções de um manuscrito científico

Artigo científico: Título; Título em inglês; Autor (es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Keywords; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão (ou Resultados e Discussão); Conclusões; Agradecimentos; Referências; Ilustrações. O artigo científico deve conter no máximo 30 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados. (ver detalhes abaixo).

Artigo de revisão: Título; Título em inglês; Autor(es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Keywords; Introdução; Desenvolvimento do assunto (organizado em partes com títulos próprios e, eventualmente, subtítulos); Considerações finais; Agradecimentos; Referências; Ilustrações. As referências devem conter no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Comunicação: Mesma estrutura do artigo científico, de forma sucinta, mas sem subtítulos. A comunicação deve conter no máximo 10 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Relato de caso: Título; Título em inglês; Autor(es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Keywords; Introdução; Metodologia diagnóstica utilizada; Resultados e Considerações finais; Referências, Ilustrações. O relato de caso deve conter no máximo 10 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Descrição das seções de um artigo científico (os demais tipos de manuscritos devem se adaptar ao modelo): atualizar

Título: O título deve ser sucinto, mas representativo do conteúdo do artigo. Apenas a primeira palavra do título com a inicial em maiúscula (exceção para nomes próprios). A citação de suporte financeiro deverá ser colocada junto dos agradecimentos, antes da lista de referências. Título em português/inglês/espanhol, negrito, centralizado, Times New Roman 12.

Título em inglês/português: Logo abaixo do título em português, versão em inglês do título em português. Título em inglês/português, itálico, centralizado, Times New Roman 10, sem espaçamento com o título.

Autor(es): Os nomes dos autores virão abaixo dos títulos em português e inglês, na ordem direta, por extenso. A afiliação de cada autor deverá ser indicada por algarismos arábicos sobrescritos no final do sobrenome. Nome(s) completo(s), negrito, centralizado, número da filiação sobrescrito, Times New Roman 10.

Afiliação(ões): Deve ser citada somente a instituição principal e um segundo nível de filiação, quando da execução do trabalho submetido, seguida da cidade, estado e país. Não citar título, cargo e função. O autor para correspondência deve ser indicado com endereço completo, telefone, fax e e-mail. Endereço(s) de filiação: centralizado, número da filiação sobrescrito, Times New Roman 9.

Resumo: Narrativa sucinta dos objetivos, material e métodos (quando pertinente), principais resultados e conclusões, limitado a 200 palavras (1374 caracteres com espaço) em um só parágrafo. Resumo – palavra em português, centralizado, negrito, Times New Roman 10. Resumo - texto: em português, justificado, parágrafo único, Times New Roman 10.

Palavras-chave: Palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo, não ultrapassando o limite de cinco. Palavras-chave em negrito: demais palavras justificadas a esquerda, Times New Roman 10.

Abstract: Versão em inglês do Resumo. Abstract - palavra: inglês, centralizado, negrito, Times New Roman 10. Abstract texto: inglês, justificado, itálico, Times New Roman 10.

Keywords: Versão em inglês das Palavras-chave. Keywords – palavra em negrito: demais palavras em inglês, itálico, justificadas a esquerda, máximo 5 palavras, Times New Roman 10.

Introdução: Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho. Títulos - palavra: português, negrito, centralizado, Times New Roman 10. Texto justificado, espaçamento simples, Times New Roman 10.

Material e Métodos: Devem ser citados o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. É recomendado o uso restrito de subtítulos. Nos artigos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados, deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança. Títulos: português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.

Resultados: Devem ser apresentados clara e objetivamente os principais resultados encontrados. Resultados – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.

Discussão: Devem ser discutidos somente os resultados obtidos no trabalho. Discussão – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.

Conclusões: As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada. Conclusões – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.

Considerações finais: devem ser utilizadas para revisões de literatura, relatos de caso, Nota Técnica. Considerações Finais – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.

Agradecimentos: Devem ser concisamente expressados. Agradecimentos – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.

Referências: Referenciar somente artigos citados e publicados. As referências devem ser listadas em ordem alfabética do(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) e a seguir do título. Referências – palavra em português, negrito, centralizado, espaçamento simples, Times New Roman 10, ver instruções abaixo.

Ilustrações: Compreende tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data), e a correspondente referência deve figurar na lista final. **Recomendações:** 1) Ilustrações idênticas ao original: os autores devem encaminhar à RBRA a autorização do autor ou detentor dos direitos autorais para reprodução. No artigo, além da identificação da fonte, os autores devem mencionar a autorização nos agradecimentos; 2) Ilustrações adaptadas ou modificadas: os autores devem identificar a fonte, acrescentando a informação "adaptado de ...".

Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos organizados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais apenas na separação do cabeçalho e ao final da tabela. A separação de grupos de dados no corpo da tabela deverá ser feita inserindo-se uma linha em branco. A legenda, colocada acima da tabela, recebendo inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico, e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Tabela em português, centralizada, Times New Roman 10.

Figura: Refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda deverá ser colocada abaixo da ilustração, recebendo inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico, e é referida no texto como Fig., mesmo quando se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão. tif, com alta resolução. Figuras em português, centralizada, Times New Roman 10.

NORMAS PARA CITAÇÃO NO TEXTO E REDAÇÃO DE REFERÊNCIAS

Citação de referência no texto

Brandão, I.S.L. – Eficiência do teste de termorresist...

A citação no texto será feita segundo as circunstâncias, podendo o (s) autor(es) e as data(s) ser(em) citado(s) entre parênteses, ou somente a data. No caso de citação de diversos autores, listar cronologicamente e, havendo coincidência de data, usar a ordem alfabética de autor. Exemplo: Dunne (1967), Morrill (1967), Nutrient... (1968), Lopes e Moreno (1974) Ferguson et al. (1979), OU (Dunne, 1967; Morrill, 1967; Nutrient..., 1968; Lopes e Moreno, 1974; Ferguson et al., 1979).

Referências

São adotadas as normas da ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos abaixo. Para documentos não exemplificados usar a norma original (www.abnt.org.br).

Periódicos

Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, v.48, 1987/88. p.351.

Ferguson JA, Reeves WC, Hardy JL . Studies on Immunity to alphaviruses in foals. Am J Vet Res, v.40, p.5-10, 1979.

Holenweger JA, Tagle R, Wasserman A, Schim FA, Franckel S . Anestesia geral del canino. Not Med Vet , n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

Dunne HW lang=EN-US (Ed.). lang=ES-TRAD Enfermedades del cerdo lang=ES-TRAD . México: UTEHA, 1967.

Lopes CAM, Moreno G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 14, 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: CBMV, 1974. p.97. Resumo.

Morrill CC. Infecciones por clostrídios. In: Dunne HW (Ed.). lang=ES-TRAD Enfermedades del cerdo lang=ES-TRAD . México: UTEHA, 1967. lang=ES-TRAD p.400-415.

Nutrient requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. p.19-20.

Silva NQ. Peritonioscopia na égua. 1971. 38f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1971.

Documentos eletrônicos

Documento publicado disponibilizado em meio eletrônico

Arranjo tributário. Diário do Nordeste On Line, Fortaleza, 27. nov. 1998. Disponível em <http://www.diariodonordeste.com.br>. Acesso em 28 nov. 1998.

Guncho MR. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: Seminário de Bibliotecas Universitárias, 10, 1998, Fortaleza. Anais ... Fortaleza: Tec Treina, 1998. CD-ROM.

Política . In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática, 1998. Disponível em <http://www.priberam.pt/dIDPLO>. Acesso em 8 mar. 1999.

Quality food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acesso em: 27 abr. 2000.

Silva RN, Oliveira R. Os limites pedagógicos do paradigma style='letter-spacing:.2pt'>da qualidade total na educação. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPe, 4, 1996, Recife. Anais eletrônicos ... Recife: UFPe, 1996. Disponível em <http://www.prospeq.ufpe.br/anais/anais/educ/ce04.htm>. Acesso em 21 jan. 1997.

Documento de acesso exclusivo em meio eletrônico

Birds from Amapá; banco de dados. Disponível em <http://www.bdt.org/bdt/avifauna/aves>. Acesso em 25 nov. 1998.

Bioline Discussion List. List maintained by the Bases de Dados Tropical, BDT, in Brasil. Disponível em: lisserv@bdt.org.br. Acesso em 25 nov. 1998.

Civitas. Coordenação de Simão Pedro Marinho. Desenvolvido pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1995-1998. Apresenta textos sobre urbanismo e desenvolvimento de cidades. Disponível em: gcsnet.com.br/oamis/civitas>. Acesso em 27 nov. 1998.

Citação de citação

Devem ser evitadas. Somente a obra consultada no original deverá aparecer na lista de referências. No texto, serão citados o autor e a data do documento original, seguido da expressão "citado por" e do autor e data da obra consultada.

Artigos no prelo

Incluir na lista de referências apenas os artigos já aceitos para publicação. Após a referência, colocar a informação "No prelo". Os artigos apenas submetidos entram na categoria "Informação pessoal".

Informação pessoal

Os dados obtidos por informação oral (palestras, debates, artigos submetidos e em fase de análise, comunicação pessoal etc.) são identificados apenas no texto. Após a informação, coloca-se o autor, a data, instituição do autor e a expressão "Informação pessoal".

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Não serão fornecidas separatas. Os artigos são disponibilizados no formato pdf, no endereço eletrônico da revista (www.cbpa.org.br).

A reprodução e a tradução de qualquer artigo para fins comerciais são proibidas, sendo que transcrição em outras revistas científicas deve ser precedida de anuência do editor.