

RENAN REIS DE OLIVEIRA

**CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE GARANHÕES DA RAÇA
MANGALARGA MARCHADOR EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

O48c
2014 Oliveira, Renan Reis de, 1985-
Características reprodutivas de garanhões da raça Mangalarga
Marchador em diferentes faixas etárias / Renan Reis de Oliveira. -
Viçosa, MG, 2014.
xviii, 79f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.64-78.

1. Mangalarga (Cavalo). 2. Cavalo - Reprodução. 3. Andrologia.
4. Sêmen - Criopreservação. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia.
II. Título.

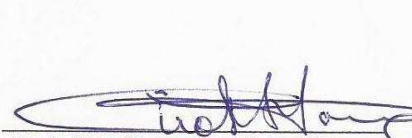
CDD 22. ed. 636.082

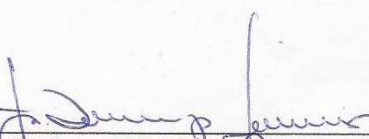
RENAN REIS DE OLIVEIRA

CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE GARANHÕES DA RAÇA
MANGALARGA MARCHADOR EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

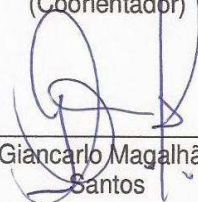
Aprovada: 14 de julho de 2014.


Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Coorientador)


Prof. José Domingos Guimarães
(Coorientador)



Prof. Eduardo Paulino da Costa



Prof. Giancarlo Magalhães dos
Santos



Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

Aos meus familiares, amigos e colegas.

Em especial, à minha mãe, meu pai e meus irmãos (Girleene, Marco Aurélio, Bruno e Carol).

Dedico

Os sonhos nada mais são: vontades geralmente mais complexas que necessitam apenas de empenho e paixão para se concretizarem.

Definição de inteligência: capacidade de resolver problemas. Me impressiono com a distância que isto tem do que aprendemos na escola.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa pela infraestrutura, capacidade de reunir pessoas de qualidade e disponibilizar um ambiente propício para o conhecimento.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa. Ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade.

Ao meu pai, Marco Aurélio de Oliveira, minha mãe, Girlene Galgani Reis de Oliveira e meus irmãos Bruno Reis de Oliveira e Carolina Reis de Oliveira por terem atuado como pilar durante esta jornada. Sem o incentivo e a força de vocês nada disso seria possível.

A Universidade de São Paulo (USP) em nome do professor Rubens Paes Arruda e seus orientados, pelo fornecimento da infraestrutura e apoio técnico necessários para realização da análise computadorizada do movimento espermático.

A Universidade Federal de Minas Gerais em nome do professor Marc Henry pela disponibilidade na avaliação computadorizada do movimento espermático.

A todos os professores que tanto me ensinaram durante minha carreira acadêmica, em especial aos professores Giovanni Ribeiro de Carvalho e José Domingos Guimarães, pelas oportunidades e pela amizade a mim dedicadas durante estes anos de estudo sobre reprodução animal.

Aos membros da banca de defesa de tese, prof. Eduardo Paulino da Costa, prof. Ciro Alexandre Alves Torres e prof. Giancarlo Magalhães.

Aos meus grandes amigos dos tempos de graduação: Carioca, Emílio, Fred, Newton, Rafael Bichu, Renato e Thiagão, pelo companheirismo, pela dedicação e por trazerem sentido à palavra amizade.

Aos companheiros da pós-graduação: Silvia, Madriano, Renata, Diogo, Júlio, Carol, Jura, Camila, Sanely, Bruna, dentre outros.

Aos membros da república K-zona rural: Werder, Goiano, Nelcino, Bernardo, Jorge, Tibil e a não menos importante Dorita.

Aos membros do importante grupo de estudos em reprodução animal, GERA, do qual me sinto parte e com os quais tanto aprendi: Leo, Rogério, Morgana, Chico, Eric, Bruno, Bruna, João Gabriel e Grazi. Sempre contem comigo e saibam que conto com vocês.

Àqueles com quem estagiei e pude aprender a amar a profissão de veterinário especialista na espécie equina: Guará, Chico, Helvécio, Reno e Igor.

À minha equipe de trabalho da Criohorse: Ciu, Geraldinho, Abelha, Careca, Rodrigo, Rafael Goretti, Armando, Leo, Juliana, Paulo Henrique e Pablo.

A todos avôs, tios, primos e amigos de Belo Horizonte com os quais sempre que necessário pude contar e que me mostraram que a distância não separa a força e o pensamento positivo das pessoas que desejam nosso bem.

Aos estagiários que tanto colaboraram durante o experimento e os momentos de descontração: Pablo, Mariana, Vinição, Juliana, Paulo Henrique e Luis Felipe.

Aos meus amigos de mesma orientação que me apoiaram muito no projeto: Daniel Macedo Rates, Guilherme Pugliese, Pedro Gama Ker e Maria Gazinelli.

A todos os funcionários do departamento de Zootecnia em especial do setor de Equideocultura, agradeço em nome do Fernando e da Celeste.

Aos proprietários e funcionários dos haras que se disponibilizaram a participar do projeto.

A ABCCMM e a Botufarma por acreditarem no projeto e atuarem como patrocinadores.

Àqueles que injustamente tenha me esquecido, mas que foram importantes para esta conquista.

E em último lugar, porém não menos importante, aos equídeos que incentivaram e continuam a incentivar minha prazerosa busca pelo conhecimento.

BIOGRAFIA

RENAN REIS DE OLIVEIRA, filho de Marco Aurélio de Oliveira e Girlene Galgani Reis de Oliveira, nasceu na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, em 23 de março de 1985.

Em março de 2004, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Em fevereiro de 2010 obteve título de mestre pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, área de concentração Fisiologia e Reprodução Animal.

Em março do mesmo ano ingressou no programa de Pós Graduação em Zootecnia buscando se capacitar como doutor na área de concentração Fisiologia e Reprodução Animal.

Em 11 de julho de 2014 defendeu a presente tese.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Comportamento reprodutivo de garanhões.....	3
2.2. Biometria testicular em equinos.....	5
2.2.1. Peso testicular.....	5
2.2.2. Avaliação testicular.....	6
2.2.3. Fatores que influenciam no desenvolvimento testicular.....	9
2.2.4. Relação entre idade do animal e peso testicular.....	12
2.3. Mensurações das glândulas acessórias e ampolas do ducto deferente em garanhões.....	13
2.4. Parâmetros seminais em garanhões.....	14
2.5. Refrigeração e congelamento do sêmen de garanhões.....	19
2.5.1. Refrigeração do sêmen de garanhões.....	20
2.5.1.1. Tipos de contêineres.....	21
2.5.1.2. Meios diluidores.....	22
2.5.1.3. Concentração espermática e volume da dose inseminante.....	23
2.5.1.4. Efeito do garanhão no sucesso do refrigeração.....	24
2.5.1.4.1. Ferramentas para melhorar o resultado.....	25
2.5.2. Congelamento do sêmen de garanhões.....	26
2.5.2.1. Etapas do processo de criopreservação.....	29
2.5.2.1.1. Centrifugação.....	29
2.5.2.1.2. Resfriamento.....	29
2.5.2.1.3. Congelamento.....	30
2.5.2.1.4. Descongelamento.....	30
3. EXPERIMENTO I: CARACTERÍSTICAS COMPORTAMENTAIS PRÉ CÓPULA DE GANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR	32
3.1. Objetivos.....	32
3.2. Material e métodos.....	32
3.2.1. Localização.....	32
3.2.2. Animais.....	32
3.2.3. Colheita de sêmen.....	32
3.2.4. Avaliação do comportamento.....	33
3.2.5. Análise estatística.....	33

3.3. Resultados de discussão.....	34
3.4. Conclusões.....	36
4. EXPERIMENTO II: BIOMETRIA TESTICULAR E MENSURAÇÕES DAS GLÂNDULAS ACESSÓRIAS E AMPOLAS DO DUCTO DEFERENTE EM GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR	36
4.1. Objetivos.....	36
4.2. Material e métodos.....	36
4.2.1. Localização.....	36
4.2.2. Animais.....	37
4.2.3. Biometria testicular.....	37
4.2.4. Avaliação ultrassonográfica das glândulas acessórias, ampolas do ducto deferente e parênquima testicular.....	38
4.2.5. Análise estatística.....	38
4.3. Resultados e discussão.....	38
4.4. Conclusões.....	43
5. EXPERIMENTO III: PARÂMETROS SEMINAIS DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR.....	44
5.1. Objetivos.....	44
5.2. Material e métodos.....	44
5.2.1. Localização.....	44
5.2.2. Animais.....	44
5.2.3. Colheita de sêmen.....	44
5.2.4. Avaliação do sêmen.....	45
5.2.5. Análise estatística.....	46
5.3. Resultados e discussão.....	46
5.4. Conclusões.....	51
6. EXPERIMENTO IV: RESISTÊNCIA AO REFRIGERAMENTO E CONGELAMENTO DE SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR.....	52
6.1. Objetivos.....	52
6.2. Material e métodos.....	52
6.2.1. Localização.....	52
6.2.2. Animais.....	52
6.2.3. Colheita de sêmen.....	52
6.2.4. Processamento do sêmen refrigerado.....	53
6.2.4.1. Análise do sêmen refrigerado.....	54
6.2.5. Processamento do sêmen para congelamento.....	54
6.2.5.1. Análise do sêmen congelado.....	55
6.2.6. Análise estatística.....	55
6.3. Resultados e discussão.....	56
6.4. Conclusões.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Médias e desvio padrão da largura escrotal total e de cada testículos de garanhões de idade entre 2 a 16 anos. Adaptado de Thompson <i>et al</i> (1979).....	7
Tabela 02: Médias e variação nas dimensões das glândulas acessórias e ampola de 102 garanhões de diferentes faixas etárias.....	14
Tabela 03: Médias de parâmetros seminais de garanhões para diferentes raças de equinos.....	17
Tabela 04: Médias do percentual de defeitos morfológicos e percentual de espermatozoides normais para diferentes raças de equinos.....	18
Tabela 05: Médias \pm desvio padrão e amplitude de variação das características seminais de garanhões de raça Mangalarga Marchador.....	19
Tabela 06: Médias \pm desvio padrão da média das características de comportamento de garanhões da raça Mangalarga Marchador para diferentes faixas etárias.....	34
Tabela 07: Médias \pm desvio padrão da média das medidas testiculares (testículos direito e esquerdo) para as diferentes faixas etárias de garanhões da raça Mangalarga Marchador.....	39
Tabela 08: Médias \pm desvio padrão da média de medidas das glândulas acessórias e ampolas seminais (direita e esquerda) para as diferentes faixas etárias de garanhões da raça Mangalarga Marchador.....	41
Tabela 09: Número de casos de hidrocele e torção testicular em garanhões da raça Mangalarga Marchador agrupados em diferentes faixas etárias.....	42

Tabela 10: Média \pm desvio padrão da média de alguns parâmetros reprodutivos de garanhões da raça Mangalarga Marchador submetidos a duas colheitas de sêmen e agrupados em diferentes faixas etárias.....45

Tabela 11: Média \pm desvio padrão da média dos defeitos morfológicos e número total de espermatozoides móveis e normais no ejaculado (TSMN) de garanhões da raça Mangalarga Marchador para diferentes faixas etárias.....49

Tabela 12: Concentração espermática e taxa de diluição proporcional para ajuste da concentração do sêmen a ser refrigerado.....53

Tabela 13: Médias \pm desvio padrão da média para os parâmetros seminais analisados do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador submetidos ao refrigeração (15°C/12 horas e 5°C/24 horas) dentro de diferentes faixas etárias.....56

Tabela 14: Médias \pm desvio padrão da média para características físicas do sêmen congelado de garanhões da raça Mangalarga Marchador para diferentes faixas etárias.....59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático das glândulas acessórias e vesículas seminais de garanhões. Em pontilhado estão os cortes ultrassonográficos que foram utilizados para mensurações. 1- Glândula Bulbo Uretral; 2- Lobo prostático direito; 3- Glândula vesicular; 4- Ampola do ducto deferente.....38

Figura 2 - Fluxograma experimental.....63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
°C	Graus celsius
ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BCF	Freqüência de batimentos flagelares
Ca²⁺	Íon cálcio
CASA	Análise computadorizada do sêmen
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
Dma	Defeitos espermáticos morfológicos maiores
Dme	Defeitos espermáticos morfológicos menores
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPBS	Solução salina tamponada de Dulbecco
Dtot	Defeitos morfológicos totais
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
g	Grama
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
hrs	Horas
Hz	Hertz
HOST	Teste hiposmótico
L	Litros
µL	Microlitro
µm	Micrômetros
µg	Microgramas
mg	Miligrama
Mg²⁺	Íon magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mOsmI	Miliosmol
MT	Motilidade total
MP	Motilidade progressiva
Na⁺	Íon sódio
P	Nível de significância
pH	Concentração de íons hidrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAEG	Sistema de Análise Estatística da UFV

Sptzs	Espermatozóides
STR	Retilinearidade
SV	Coloração supra vital
TSMN	Número total de espermatozoides móveis e normais no ejaculado
UI	Unidades internacionais
VAP	Velocidade de trajeto
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade progressiva

RESUMO

OLIVEIRA, Renan Reis de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2014. **Características reprodutivas de garanhões da raça Mangalarga Marchador em diferentes faixas etárias.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Coorientadores: José Domingos Guimarães e Ciro Alexandre Alves Torres.

A Associação de Criadores da raça Mangalarga Machador é a maior da America Latina, no entanto, pouco se sabe a respeito dos aspectos reprodutivos de seus garanhões. Objetivou-se avaliar algumas características reprodutivas de garanhões da raça Mangalarga Marchador, dentre elas: comportamento pré cópula, biometria testicular e das glândulas acessórias, parâmetros seminais, resistência ao refrigeração e congelamento; assim como verificar efeito de diferentes faixas etárias nestas características. **Experimento 1:** 110 garanhões tiveram características comportamentais (tempo de reação, tempo de latência, tempo de monta, duração total da colheita e número de reflexos de flehmen) analisadas durante procedimento de duas colheitas de sêmen (C1 e C2) intervaladas de uma hora. Os animais foram agrupados nas seguintes faixas etárias: G1: 2-3 anos, G2: 4-6 anos, G3: 7-14 anos e G4: mais de 15 anos. O tempo médio de C1 foi de 162 s. e de C2 de 171,9 s. Não foi observado diferenças nas características comportamentais para as diferentes faixas etárias. **Experimento 2:** 101 garanhões tiveram aferidas medidas relativas: à biometria testicular (comprimento, largura e altura dos testículos direito e esquerdo, e largura testicular total), às glândulas acessórias (bulbo uretral, próstata e vesicular) e ampolas do ducto deferente. As médias do largura escrotal total de G1 (88,7 mm) foram inferiores a G2 (94,5 mm) e as de G2 inferiores a de G3 (104,1 mm) e G4 (108,6 mm) ($P < 0,05$) que foram iguais ($P > 0,05$). Foi observado efeito de idade para as mensurações de algumas glândulas acessórias, como, bulbo uretrais, largura do lobo prostático e

altura de ampola do ducto deferente ($P < 0,05$) dentre as faixas etárias analisadas. Observou-se incidência de hidrocele testicular e torção testicular em 10 e 12%, respectivamente, dos animais avaliados.

Experimento 3: 107 garanhões foram submetidos a duas colheitas de sêmen com intervalo de uma hora para avaliação dos seguintes parâmetros: volume de gel, volume sem gel, motilidade total, motilidade progressiva, vigor, concentração, número total de espermatozoides, defeitos morfológicos e número total de espermatozoides móveis e normais (TSMN). O TSMN no ejaculado apresentou efeito das diferentes faixas etárias para C1, G1 (2,8 bilhões), G2 (3,6 bilhões) apresentaram valores inferiores a G3 (5,4 bilhões) ($P < 0,05$). Não houve diferença entre G4 (2,7 bilhões) e os demais grupos ($P > 0,05$).

Experimento 4: 94 garanhões tiveram o sêmen colheitado e processado para refrigeração (R12 – 15 °C/12 horas e R24 – 5 °C/24 horas) e congelamento (duas colheitas com intervalo de uma hora: C1 e C2). O sêmen refrigerado foi avaliado quanto aos parâmetros físicos (análise subjetiva: MT- motilidade total, MP - motilidade progressiva e vigor) e integridade da membrana plasmática (IMP). O sêmen congelado foi submetido à avaliação computadorizada do movimento espermático. Não foi observado efeito das diferentes faixas etárias para os parâmetros avaliados ($P > 0,05$). Em R12 (n=71) e R24 (n=77) obteve-se MT, MP, vigor e IMP valores médios de: 64,4%, 56,1%, 3,2, 70,4%, 59,3%, 52,5%, 2,8 e 67,2%, respectivamente. Ainda, 89% (R12) e 87% (R24) dos animais apresentaram acima de 35% de MP após respectivos períodos de refrigeração. C1 (n=89) e C2 (n=78) apresentaram valores médios de MT, MP e VAP para C1 e C2, respectivamente de: 60,9, 43,8, 77,6, 61,4, 44,5 e 79,1. Dos 94 animais avaliados 73% apresentaram motilidade progressiva superior a 35%. Os parâmetros reprodutivos de garanhões da raça Mangalarga Marchador encontram-se dentro dos parâmetros descritos para espécie, sendo observados alguns efeitos de idade para estes parâmetros. A resistência ao refrigeração e congelamento se mostraram satisfatórias podendo tais ferramentas serem aplicadas na rotina de profissionais que trabalham com esta raça.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Renan Reis de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Relationship between reproductive characteristics and age of Mangalarga Marchador breed stallions**. Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-advisers: José Domingos Guimarães and Ciro Alexandre Alves Torres.

The Breeders Association of Mangalarga Machador race is the largest in Latin America; however, the reproductive characteristics are not complete known for stallions of different ages. The aim was to evaluate the main reproductive characteristics of Mangalarga Marchador stallions as follows: pre-breeding behavior, testicular biometry, characteristics of accessory glands, seminal quality and semen resistance to cooling and freezing. **Experiment 1:** 110 stallions were evaluated to measure the reproductive behavior (time to react, latency time, breeding time, duration of semen collection and number of Flehmen reflex) during two consecutive semen collections (C1 and C2) with one hour-interval. The stallions were grouped according to four age intervals: G1: 2-3 years old, G2: 4-6 years, G3: 7-14 years, and G4: older than 15 years. The averaged time for semen collection was 162 sec for C1 and 171.9 sec for C2. No difference was detected for reproductive behavior characteristics among the four age categories. **Experiment 2:** testicular biometry was evaluated in 101 stallions. The averaged scrotal diameter was reduced in G1 stallions (88.7 mm) compared to G2 (94.5 mm), and was also reduced in G2 stallions compared to G3 (104.1 mm) and G4 (108.6 mm; $P < 0.05$). An age effect was also observed for some accessory glands. During testicular evaluation was detected hydrocele and testicular rotation in 10 and 12 % of stallions, respectively. **Experiment 3:** two consecutive semen collections were done in 107 stallions to evaluate the semen characteristics (volume with and without gel, total motility, progressive motility, vigor, sperm concentration, total number of sperm, morphologic

alterations, and total number of motile and normal sperm (TMNS). The TMNS was affected by the age categories in C1; TMNS was lower in the G1 (2.8 billions) and G2 stallions (3.6 billions) than in the G3 (5.4 billions).

Experiment 4: semen collections of 94 stallions were used for evaluation of semen resistance to cooling in two different temperatures (15°C/12 hours, R12 ; and 5°C/24 hours, R24) and to freezing. Cooled semen was evaluated by a subjective analysis to measure the total (TM) and progressive motility (MP) and vigor of sperm. The plasma membrane integrity (PMI) was also evaluated by the supravital test. Frozen-thawed semen was submitted to a computerized analysis to evaluate motility parameters. No difference was detected among the stallions' age categories ($P > 0.05$). The averaged TM, PM, vigor and PMI were respectively: 64.4%, 56.1%, 3.2 and 70.4% for R12 (n=71), and 59.3%, 52.5%, 2.8 and 67.2% for R24 (n=77). The PM was superior to 35% in 89% after cooling to 15°C/12 hours (R12). For the frozen-thawed semen, the averaged values of TM, PM and VAP were respectively: 60.9%, 43.8% and 77.6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ in C1 (n=89), and 61.4%, 44.5% and 79.1 $\mu\text{m}/\text{sec}$ in C2 (n=78). The PM was superior to 35% in 73% frozen-thawed semen. In conclusion, the reproductive characteristics of stallions of Mangalarga Marchador breed are compatible in the normal breeding behavior and semen quality aspects reported for horses. Stallion's age may affect some characteristics. The high percentage of stallions with high resistance of semen to cooling and freezing procedures indicates that these techniques may be useful in large scale in the routine and among breeders of Mangalarga Marchador breed.

INTRODUÇÃO

Segundo dados da FAO/STAT - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2012) o Brasil possui o quarto maior rebanho equino do mundo. Por muito tempo no Brasil, a equideocultura foi negligenciada como um importante componente dentro da impactante cadeia do agronegócio nacional. No ano de 2010, a Confederação de Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) fez um levantamento de bastante repercussão que vem gerando maiores reflexões a respeito da importância da equideocultura dentro dos mais variados aspectos (sociais, econômicos e culturais) no Brasil.

O setor equino gera aproximadamente 642 mil empregos diretos e 2,6 milhões de empregos indiretos. Boa parte destes empregos interfere no importante aspecto social de manutenção de famílias no ambiente rural. Com uma movimentação financeira de R\$ 7,5 bilhões ao ano, números de exportação de carne (mais de US\$ 34 milhões em 2005) que superam produtos amplamente divulgados, como, a cachaça e o café torrado, a equideocultura nacional vem demonstrando sua importância econômica (CNA, 2010). As exposições, feiras, cavalgadas, competições equestres dentre outros ressaltam o contexto cultural do cavalo no Brasil. Cada região com sua peculiaridade em relação aos eventos equestres, mas de norte a sul do país cavalos são estimados e fazem parte da história e das diferentes manifestações culturais e do lazer dos brasileiros.

Neste contexto se insere o cavalo da raça Mangalarga Marchador. Pertencente a maior associação de criadores de cavalos da América Latina (ABCCMM, 2010) o cavalo Mangalarga Marchador vem se expandindo no Brasil e ao redor do mundo. Segundo dados da Associação Brasileira dos Criadores de Cavalo Mangalarga Marchador (ABCCMM, 2014) a raça conta com mais de 490.000 indivíduos registrados, acima de 8700 sócios ativos que colocam a raça como a

terceira maior do mundo. No exterior existem 105 sócios, presentes nos seguintes países: Estados Unidos, Alemanha, Bélgica, Holanda, Portugal, Canadá, Israel, Peru e Uruguai.

O cavalo da raça Mangalarga Marchador possui sua origem no cruzamento de um garanhão da raça Alter, trazido à Minas Gerais por D. João VI, com égua nativas (provável origem da Península Ibérica). Os animais provenientes deste cruzamento deram origem a indivíduos que apresentavam grande aptidão de sela, com o andamento característico da raça que é a marcha (ABCCMM, 1991). A movimentação característica, boa índole e beleza morfológica são algumas das características que fazem da raça Mangalarga Marchador a raça brasileira de maior impacto.

No universo de criação de cavalos a reprodução é um dos pilares que norteiam o desenvolvimento genético. Dentro da reprodução os garanhões são peça chave. Segundo dados da ABCCMM, na raça Mangalarga Marchador um garanhão chega a produzir mais de 150 descendentes em uma única estação de monta. A fim de alcançar tamanha produtividade é indispensável uma boa saúde reprodutiva.

A avaliação da saúde reprodutiva de garanhões envolve uma série de etapas nas quais são avaliados: o comportamento sexual, os órgãos genitais e alguns aspectos seminais (dentre os vários aspectos, caso haja interesse do criador no transporte de sêmen, deve-se incluir a resistência ao armazenamento espermático - refrigeração e congelamento). Algumas destas características podem ser influenciadas pela raça do garanhão. Conhecer os parâmetros clínicos reprodutivos das diferentes raças se mostra importante na identificação de indivíduos com alto e baixo potencial reprodutivo, assim como, podem nortear decisões importantes como a forma mais adequada de se trabalhar com o garanhão (sêmen fresco e/ou refrigerado e/ou congelado).

Ao longo de décadas uma série de levantamentos (Hendrikse, 1966; Dowsett & Pattie, 1982; Voss *et al.*, 1982; Dowsett & Pattie, 1987; Dowsett & Knott, 1996; Kavac, 2004) foram realizados buscando descrever os parâmetros reprodutivos dos garanhões das mais diferentes raças. Em estudo isolado descrevendo alguns parâmetros seminais de

animais da raça Mangalarga Marchador, Vale (1976) avaliou características seminais de 16 garanhões em 121 ejaculados.

Objetivou-se avaliar alguns aspectos reprodutivos de garanhões da raça Mangalarga Marchador, dentre eles: comportamento sexual pré cópula, biometria testicular e mensurações das glândulas acessórias e ampolas do ducto deferente, parâmetros seminais, resistência ao refrigeração e resistência ao congelamento do sêmen.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Comportamento reprodutivo de garanhões:

Na avaliação do potencial reprodutivo de garanhões uma etapa relevante é a avaliação do comportamento durante a cópula/coleta de sêmen dos animais. Uma série de fatores pode levar a uma variação no comportamento normal de garanhões durante o cortejo e cópula (McDonnell, 1992), podendo tais alterações comprometer o potencial reprodutivo destes indivíduos.

Vários levantamentos foram realizados a respeito do comportamento reprodutivo de garanhões em sistemas extensivos de criação (Bristol, 1982; Feist, 1976; McDonnell, 1986; McDonnell, 2000; Tarouco *et al.*, 2009). No entanto, a maior parte dos garanhões domesticados são mantidos em regime de monta controlada ou colheita de sêmen. Comparado ao comportamento de garanhões mantidos em sistemas extensivos, agrupados em haréns, o comportamento da maior parte dos animais domesticados se restringe às interações pré cópula.

Segundo McDonnell (2009) o comportamento normal de um garanhão domesticado após aproximação de uma égua em estro pode incluir: vocalização, investigação olfatória e tátil, e reflexo de flehmen. A maior parte dos animais apresenta ereção em até 2 minutos e realizam a monta 5-10 segundos após ereção. Desta forma, os garanhões normalmente ejaculam após a primeira monta, tendo uma duração total do cortejo e cópula que varia de 2-5 minutos.

Ao avaliar o comportamento de garanhões da raça Árabe, Najjar *et al.* (2010) relataram maiores valores médios no número de montas (1,6 ; 1,2), tempo de preparação para colheita (107 s.; 89 s.) e tempo de colheita (136 s.; 117 s.) para garanhões com menos de 15 anos de idade, quando comparado com os de mais de 15 anos ($P < 0.05$). Outro relevante aspecto relatado foi o efeito do maior número de montas e maior duração da colheita na redução da fertilidade, maior número de espermatozoides mortos e menor motilidade do sêmen fresco destes garanhões.

Sieme *et al.* (2002) observaram que características como volume de sêmen, concentração espermática e longevidade dos espermatozoides foram influenciadas pelo maior número de montas. Garanhões que necessitavam de 3-6 montas para colher o sêmen, apesar de não apresentarem uma menor motilidade logo após a colheita, apresentaram menor resistência ao refrigeração por 24 horas a 5 °C.

Avaliando 10 garanhões de raças leves, Thomson *et al.* (1977) ao realizar colheitas de sêmen em dois diferentes protocolos (duas colheitas com intervalo de uma hora ou duas colheitas com intervalo de 24 horas) relataram menor tempo médio de reação para segunda colheita quando do intervalo de 1 hora entre as duas colheitas (1 Hr- 131 s ; 24 Hr- 301 s). O número médio de montas para segunda colheita de sêmen também foi reduzido quando as duas colheitas foram realizadas com intervalo de uma hora (1 Hr- 1,2; 24 Hr- 1,7). Segundo os autores tais variações são devidas ao estímulo remanescente em função da maior proximidade entre as colheitas realizadas com intervalo de 1 hora. Tal observação corrobora citações de Pickett *et al.* (1970) que relataram um menor tempo de reação para segunda colheita quando comparada com a primeira realizada em intervalo de uma hora.

Ao avaliar o comportamento de garanhões da raça lusitana ao longo do ano, Robaldo Silva *et al.* (2007), não observaram variações entre as estações do ano nas seguintes características: tempo até ereção, intervalo até ejaculação, número de montas e duração da colheita.

Outra expressão comportamental durante a cópula é o reflexo de flehmen. Acredita-se que tal reflexo facilite o movimento de fluidos pelo órgão vômeronasal (órgão olfatório localizado no septo nasal). Tal fato

parece facilitar a captação dos feromônios secretados na urina da égua em estro (Lindsay & Burton, 1983). Em média, antes de realizar a monta, um garanhão realiza 2 reflexos de flehmen, podendo variar de 0 a 10 (McDonnell, 1986).

2.2- Biometria testicular em equinos

A biometria testicular tem sido ao longo dos anos objeto de estudo de vários autores por representar um bom parâmetro para predição do potencial reprodutivo de machos em diversas espécies domésticas de exploração comercial, como: equinos (Canisso *et al.*, 2008), bovinos (Viu *et al.*, 2006), caprinos (Campos *et al.*, 2003) e ovinos (Souza *et al.*, 2007).

Em machos equinos adultos, além do potencial produtivo, a produção espermática diária também pode ser estimada a partir da avaliação das características testiculares, que compreendem o volume e simetria deste órgão (Gregory, 2012). Contudo, vários são os fatores capazes de interferir na largura escrotal, como: raça, tamanho, idade, estação do ano e estes devem ser levados em consideração ao se realizar o exame.

Em bovinos, dentre os parâmetros testiculares, o perímetro escrotal tem sido utilizado com elevada frequência para predizer fertilidade, pois além de possuir herdabilidade média/alta existem evidências da existência de correlação positiva com o potencial reprodutivo dos machos (Coulter *et al.*, 1976; Pimentel *et al.*, 2010). Contudo, em equinos, devido à disposição horizontal dos testículos no escroto, a avaliação do perímetro escrotal não é realizada. Diante disso, nestes animais as medidas utilizadas são a largura escrotal total e as medidas biométricas de cada testículo (Varner *et al.*, 1991).

2.2.1-Peso testicular:

Especificamente na espécie equina, alguns estudos trazem informações inerentes às medidas e peso testiculares de garanhões adultos (Johnson *et al.*, 1994; Parlevliet *et al.*, 1994; Blanchard *et al.*,

2001). Entretanto, estudos relativos a garranhões jovens ainda são bastante escassos.

Segundo Aurich (2005), respeitando os limites de cada raça e tamanho do garranhão adulto, cada testículo pesa aproximadamente entre 150 a 400 g. No entanto, as variações entre raças são muito pronunciadas podendo variar 70-80 g entre animais de mesma idade (3 anos), porém de raças diferentes (Blanchard *et al.*, 2001). Foi encontrada uma variação de 103 g na raça Quarto de Milha de animais com 2 anos de idade (Naden *et al.*, 1990) e na raça Crioula com idade média de 48 meses o peso testicular médio foi de 162,9 g (Figueró, 2010).

2.2.2- Avaliação testicular:

Previamente a mensuração das medidas escrotais, alguns padrões testiculares devem ser observados indicando a normalidade ou anormalidade deste órgão, que poderão refletir diretamente na fertilidade do garranhão.

Segundo Brinsko *et al.* (2011), padrões de normalidade estão associados a uma pele do escroto fina e elástica e o mesmo deve possuir um prolongamento do funículo espermático bem delimitado. Além disso, o escroto e seu conteúdo devem ser normalmente pendulosos (exceto durante o frio, em razão da contração da túnica dartos) e ocasionalmente podem ser atraídos para próximo ao corpo, devido à contração voluntária do músculo cremaster em resposta ao estímulo da palpação. Ainda segundo este autor, ambos os testículos e epidídimos anexos devem estar simétricos e livremente móveis dentro da bolsa escrotal. Os testículos devem ser ovais, textura consistente e devem ser palpados em sua totalidade, orientados pelo epidídimo. Além disso, deve possuir um eixo posicionado horizontalmente no escroto, podendo assumir um posicionamento mais vertical quando estiverem contraídos. Já o tamanho, a textura e a posição de cada testículo devem ser determinados para elaboração de um exame completo e pode variar de acordo com uma série de fatores apresentados a seguir.

O tamanho testicular é um parâmetro importante na determinação do potencial reprodutivo do garranhão. Assim como ocorre em outros

animais domésticos, dentre eles bovinos e caninos, o valor médio da medida dos testículos para cada raça é variável. Em trabalho pioneiro, realizado por Thompson *et al.* (1979), definiu-se alguns valores médios para largura escrotal de equinos sumarizados na tabela abaixo (Tabela 01):

Tabela 01 – Médias \pm desvio padrão da largura escrotal total de cada testículo de garanhões de idade entre 2 a 16 anos. Adaptado de Thompson *et al.* (1979).

Idade	LTT	LTD	LTE
2 a 3 anos	9,6 \pm 0,8 cm	5,5 \pm 0,5 cm	5,3 \pm 0,5 cm
4 a 6 anos	10,0 \pm 0,7 cm	5,7 \pm 0,4 cm	5,5 \pm 0,5 cm
> 7 anos	10,9 \pm 0,7 cm	6,1 \pm 0,4 cm	6,0 \pm 0,5 cm

LTT: Largura testículo total; LTD: Largura testículo direito; LTE: Largura testículo esquerdo.

Em animais férteis que atingiram a puberdade com aproximadamente 4 anos, relatou-se que estes possuíam testículos com 4,5 a 6 cm de largura, 5 a 6,5 cm de altura e 8,5 a 11 cm de comprimento, enquanto a largura escrotal total permanecia entre 9,5 a 11,5 cm (Thompson *et al.* 1979).

A consistência dos testículos é outra característica que pode ser analisada. Tal característica passa informações a respeito da funcionalidade dos testículos, desta forma, consistência anormal (flácido, rígido ou irregular) pode estar associada à produção insuficiente de espermatozoides (Pickett *et al.*, 1987; Pickett, 1993).

O exame ultrassonográfico dos testículos pode ser realizado sempre que se observem alterações na consistência testicular ou nos parâmetros normais do ejaculado. Através deste exame podem ser evidenciadas anormalidades relacionadas a uma série de fatores, como: criptorquidismo, epididimite, granuloma espermático, torsões no cordão espermático, varicocele, neoplasia testicular, hidrocele e hérnias inguinais (Rantanen & Mckinnon, 1998). Mais recentemente a técnica de ultrassonografia associada ao *Doppler* colorido vem sendo trabalhada em garanhões para aprimoramento do diagnóstico de alterações vasculares nos testículos (Pozor & McDonnell, 2003).

Assim, se por um lado o ato de aferir as medidas testiculares pode ser considerado um procedimento laborioso, por outro, implica na

avaliação criteriosa de lesões e padrões testiculares que por ora poderiam não ser observados se não fosse realizado tal teste.

A medida biométrica mais utilizada e discutida na avaliação dos testículos e escroto de garanhões tem sido a largura escrotal total (LET). Em função das características anatômicas de garanhões (posicionamento dos testículos), a capacidade de contração testicular e ao temperamento nem sempre passível de um contato mais próximo, têm levado a avaliação da largura escrotal total em equinos ser mais difundida na rotina de veterinários que outras avaliações biométricas. Thompson *et al.* (1979) encontraram coeficiente de correlação entre a largura escrotal total e peso do parênquima testicular ($r=0,83$) e entre a largura escrotal total e produção espermática diária ($r=0,75$) que reforçam a ampla utilização desta medida, principalmente naqueles casos onde não são observadas grande assimetria testicular.

Ao se trabalhar com a largura escrotal total foi verificado que garanhões em idade adulta apresentando LET inferior a 8 cm não possuíam espermograma dentro dos padrões considerados satisfatórios, devido ao baixo potencial para produção espermática diária (Love *et al.* 1990; Pickett *et al.*, 1993). Além disso, a largura dos testículos foi moderadamente correlacionada com parâmetros de qualidade seminal (Blanchard *et al.* 2001). Existem evidências que as medidas consideradas normais do volume testicular para garanhões de grande porte são ligeiramente superiores às de pôneis (Metcalf *et al.* 1997).

Apesar da possibilidade de serem mensurados por ultrassonografia, os testículos geralmente são mensurados por paquímetros específicos, similares a compassos, tornando a técnica mais rápida e prática. Assim, a partir da obtenção dos valores da largura (L), altura (H) e comprimento (C) é possível estimar o valor do volume cada testículo, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Volume Testicular (VT cm}^3\text{)} = 0,523 (L \times H \times C)$$

A partir da soma do volume dos dois testículos é possível obter o valor do volume testicular total. O volume testicular é um parâmetro que

pode ser utilizado com intuito de comparação com médias estabelecidas para cavalos da mesma idade e raça.

O volume testicular total também serve para determinação de um índice, denominado de liberação diária esperada de espermatozoides (*Daily Sperm Output* - DSO), na qual é capaz de prever a eficiência espermatogênica do animal, importante indicador para detecção de algum tipo de disfunção que leve a um baixo número de espermatozoides viáveis (Brinsko *et al.*, 2011). Este índice elaborado por Love *et al.* (1990) é calculado através da fórmula:

$$\text{Produção DSO } (\times 10^9) = (\text{Volume testicular total (VT)} \times 0.024) - 0.76$$

Assim podemos definir que a produção espermática diária, resultante do número total de espermatozoides produzidos pelos testículos diariamente é altamente dependente da quantidade de túbulos seminíferos funcionais. Tal quantidade sofre reflexo direto do tamanho dos testículos. Deste modo, medidas testiculares de ganhões podem ser utilizadas para estimar a produção espermática e identificar ganhões de maior ou menor potencial reprodutivo (Squires & Pickett, 2011).

Tal parâmetro pode ser facilmente utilizado na rotina e acompanhamento de ganhões nos diferentes criatórios.

2.2.3- Fatores que influenciam no tamanho dos testículos:

O tamanho testicular varia entre ganhões dependendo, sobretudo da raça a qual pertencem, tamanho, idade, estação do ano e estado reprodutivo. Sabe-se que o tamanho testicular está altamente correlacionado ao peso do parênquima deste órgão que por sua vez estão intimamente associados com a produção de espermatozoides/dia (Chenier, 2007).

Dentre os fatores relacionados ao desenvolvimento testicular podemos citar o fator nutricional. A ineficiência nutricional pode afetar significativamente o desenvolvimento dos testículos. Aurich *et al.* (2005)

demonstraram que potros alimentados com aproximadamente 50% das exigências nutricionais acabaram apresentando testículos menores quando adultos, e por conseguinte estes garanhões apresentaram uma produção espermática menor e de pior qualidade que os garanhões alimentados adequadamente.

A sazonalidade é um fator que parece interferir diretamente no volume testicular, sobretudo em equinos. Em estudo utilizando cavalos lusitanos, realizado durante a primavera, verão, outono e inverno, demonstrou-se que existem diferenças sazonais significativas no volume testicular e na produção de espermatozoides ao longo destes meses (Silva *et al.*, 2007). Neste estudo foi demonstrado que o volume testicular médio foi máximo na primavera ($234,0 \pm 15,8 \text{ cm}^3$) reduzindo até o outono ($168,6 \pm 10,0 \text{ cm}^3$) e voltando a aumentar novamente no inverno ($190,8 \pm 8,8 \text{ cm}^3$). A partir disso foi estabelecida uma correlação positiva entre o volume testicular e a produção total de espermatozoides. Embora os menores volumes tenham sido registrados no outono, a produção mínima de espermatozoides ocorreu durante o inverno. A partir disso, o autor definiu que a dimensão dos testículos e a produção de espermatozoides são diretamente influenciadas pelas estações do ano. Estes achados estão de acordo com as descrições de Clay *et al.* (1987), na qual foi notado uma sincronia perfeita entre o aumento de duração no fotoperíodo diário e na largura escrotal total, associada diretamente na produção espermática destes animais.

O tamanho testicular parece estar associado não somente ao tamanho do animal, mas também à atividade sexual do garanhão, como demonstrado por Manso Filho *et al.* (2000) em garanhões da raça Campolina. Segundo este autor a intensidade do uso dos animais deve ser levada em conta para determinação real do tamanho testicular dos animais. Esta associação está ligada fundamentalmente à elevação da produção dos níveis de prolactina e GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) que parecem interferir no tamanho dos testículos de equinos.

Outro fator que parece interferir no tamanho dos testículos dos garanhões são aplicações de esteroide anabólicos (Squires *et al.* 1982;

Pickett *et al.* 1989). Tal fato pode ser ilustrado pelo trabalho deste último, que ao administrar injeções diárias e consecutivas de propionato de testosterona (200µg/kg) detectou que ao longo dos 88 dias houve uma redução do tamanho testicular, determinado pela redução da largura escrotal total. Além disso, foi possível notar uma diminuição de 50% nos níveis de LH do grupo dos animais tratados em relação ao grupo controle, além do que as características seminais foram agudamente afetadas em animais tratados (Pickett *et al.* 1989). Diante disso, apesar de demonstrado no mesmo estudo que a supressão do uso da testosterona poder levar a recuperação nos índices normais de espermatogênese, tratamentos por longos intervalos de tempo e altas doses pode afetar irreversivelmente a espermatogênese de garanhões.

Em relação à variação individual, notou-se que existe uma assimetria no desenvolvimento testicular de garanhões. Tal fato é comprovado pela constatação do desenvolvimento mais precoce do testículo do lado esquerdo, que além de apresentar maior volume e maior peso permanecerá maior por toda vida reprodutiva do garanhão, na qual apresentará o testículo direito com 95% do tamanho do testículo esquerdo já na idade adulta (Klug, 1982). Contrariando estes achados, estudos posteriores não verificaram diferenças significativas entre os testículos direito e esquerdo, para medidas de biometria testicular entre garanhões com idade média de 34 meses (Parlevliet *et al.* 1994). Corroborando tal fato, em estudo na raça Quarto de Milha não foi encontrado diferenças entre medidas e pesos entre os testículos direito e esquerdo (Naden *et al.* 1990).

Apesar de existirem poucos trabalhos disponíveis na literatura ressaltando o efeito da raça, sabe-se que existe um efeito considerável deste fator no tamanho do testículo de garanhões. Avaliando a média da largura do escroto de animais das raças Quarto de Milha, Puro Sangue Inglês, Árábica, Apaaloosa e Paint Horse foram encontrados valores médios de 106, 111, 107, 103 e 102 mm, respectivamente (Pickett *et al.* 1987).

2.2.4- Relação entre idade do animal e tamanho testicular:

Dentre os inúmeros fatores citados e explicados anteriormente, a puberdade e idade do animal são um dos fatores mais importantes e determinantes para alteração do tamanho testicular. Baseando-se na fisiologia da espermatogênese de garanhões, Blanchard *et al.* (2001) estabeleceram que o início da puberdade de equinos tem se mostrado mais relacionado com o tamanho dos testículo dos animais do que com a própria idade dos mesmos.

Em um estudo desenvolvido por Tompson *et al.* (1979), utilizando 48 garanhões com idade entre dois e 16 anos demonstraram que o tamanho testicular é altamente afetado pela idade do animal, sendo o testículos dos garanhões com idade igual ou superior a sete anos maiores que dos animais mais jovens, como demonstrado anteriormente na Tabela 01. No trabalho destes autores, a partir de um coeficiente de correlação para tal análise foi possível concluir que aproximadamente 40% da variação de tamanho do testículo podem ser explicadas pela idade. Apesar de a largura escrotal ter sido correlacionada significativamente com o peso corporal, quando o peso e a idade foram considerados em conjunto, apenas a idade representou um fator significativo de variação. Diante disso ele concluiu que para uma mesma idade, a largura escrotal foi independente do peso corporal.

Fazendo uma análise cronológica do desenvolvimento dos testículos de garanhões pode-se observar um aumento acentuado desde ao nascimento até o 10º mês de vida, seguido de um discreto aumento do 11º ao 16º mês de idade e após o 17º mês o crescimento passa ser bastante acelerado (Nishikawa, 1959). Segundo Roser (2000) o crescimento e desenvolvimento testicular não ocorrem apenas até o animal atingir a puberdade (12-18 meses). Tal crescimento geralmente se arrastar ao longo dos anos e cessa apenas quando o animal atinge 4 a 5 anos de idade. Embora existam variações entre diferentes autores, estima-se que o valor aproximado da largura escrotal em garanhões na puberdade seja de 7,7 cm (Naden *et al.*, 1990). Mesmo assim, pode existir uma grande variação no peso e tamanho dos testículos dos

animais após a puberdade, que pode ser influenciada pelos diversos fatores supracitados (Amann, 2011).

Portanto, considera-se que a avaliação da biometria testicular serve como ferramenta eficiente para estimativa do potencial reprodutivo dos animais não só por refletir a capacidade produtiva como indiretamente a qualidade seminal. Para uma avaliação adequada das características testiculares deve ser considerado o treinamento do técnico para identificar anormalidades e aferir de forma precisa os parâmetros a serem analisados.

2.3- Mensurações das glândulas acessórias e ampolas do ducto deferente em equinos

Um garanhão normal possui um par de ampolas, um par de glândulas vesiculares, uma próstata bilobulada e um par de glândulas bulbo uretrais. Estas estruturas funcionam aumentando o volume de fluidos, enzimas, aminoácidos e tampões no ejaculado (Mann, 1975; Roberts, 1986). Anteriormente chamada de vesículas seminais, as glândulas vesiculares tiveram a terminologia modificada em equinos por não serem sítio de armazenamento espermático nesta espécie (Amann, 2011). O sêmen de garanhões é ejaculado em 5-10 frações físico-químicas distintas durante 8-10 segundos. Aproximadamente 80% dos espermatozoides e das secreções das ampolas são ejaculados nas três primeiras frações do ejaculado (Tischner et al., 1974). A glândula vesicular secreta um gel viscoso (Pickett & Voss, 1974) que é liberado nas últimas frações do ejaculado.

Os primeiros estudos avaliando as glândulas acessórias em garanhões pelo método de ultrassonografia foram realizados por Little & Woods em 1987, neste estudo foram avaliadas as características das glândulas acessórias de animais em repouso.

Ao longo dos anos alguns estudos vieram descrevendo as características ultrassonográficas das glândulas acessórias em garanhões. Modificações ao longo do tempo no tamanho e no aspecto (antes, durante e após colheita de sêmen) destas estruturas (Little &

Woods, 1987; Weber *et al.*, 1990; Werber & Woods, 1991; Weber & Woods, 1992; Weber & Woods, 1993; Schnobrich *et al.*, 2013).

Com a proposta de estabelecer valores clínicos de referência para mensuração das glândulas acessórias em garanhões, Pozor & McDonnel (2002) avaliaram 102 garanhões de 2-29 anos de diferentes raças. Neste estudo demonstraram que raças maiores apresentam maior tamanho de glândulas. Não observaram diferença entre as glândulas contralaterais. Alguns valores encontrados neste estudo encontram-se sumariados na tabela abaixo (Tabela 02):

Tabela 02: Médias e variação nas dimensões das glândulas acessórias e ampola de 102 garanhões de diferentes raças.

	Cavalos miniatura (n=7)	Ponei (n=27)	Raças leves (n=53)	Raças pesadas (n=15)
Bulbo uretral				
Comprimento	21 (16-27)	28 (21-39)	38 (17-59)	35 (30-44)
Altura	14 (11-19)	17 (10-24)	24 (12-39)	22 (16-33)
Próstata				
Largura	18 (11-29)	20 (14-27)	25 (10-40)	27 (18-39)
Vesicular				
Diâmetro total	9 (5-15)	12 (3-30)	12 (4-20)	16 (8-43)
Diâmetro da parede	3 (1-6)	4 (1-10)	4 (1-8)	3 (1-4)
Diâmetro do Lúmen	4 (2-11)	6 (1-26)	5 (0-11)	11 (2-39)
Ampola				
Diâmetro total	10 (5-20)	8 (4-12)	11 (4-18)	13 (6-17)
Diâmetro da parede	4 (2-10)	3 (1-5)	5 (2-8)	5 (3-7)
Diâmetro do Lúmen	1 (0-3)	1 (0-2)	2 (0-6)	2 (0-4)

Adaptado: Pozor & McDonnel, 2002.

2.4- Parâmetros seminais em garanhões

Ao longo das últimas décadas o uso das biotecnologias reprodutivas tem se tornado cada vez mais comum na criação de equinos. Dentre estas a inseminação artificial é considerada uma realidade nos principais criatórios e centros reprodutivos equestres do Brasil. Tal fato vem despertando o interesse em uma maior produtividade de garanhões consagrados dentro de cada característica selecionada para as diferentes raças.

Um importante ponto a ser considerado neste incremento de produtividade é que este se dê de forma sustentável. Ou seja, de tal maneira que não prejudique a saúde dos animais e que sejam mantidos

adequados índices de fertilidade para cada garanhão. Segundo Amann (1981), o melhor método de predizer a fertilidade de garanhões seria através de um exame clínico dos órgãos reprodutivos e de análises laboratoriais do sêmen.

Estudo envolvendo as características reprodutivas em garanhões sugerem que o efeito da raça é importante para os diferentes aspectos reprodutivos, dentre eles, aspectos seminais (Tabela 03) (Hendrikse, 1966; Skinner and Bowen, 1968; Dowset & Pattie, 1982; Voss *et al.*, 1982; Dowsett and Pattie, 1987). O objetivo geral na avaliação do sêmen seria analisar as perspectivas de fertilidade de um garanhão e/ou de amostras de sêmen (refrigerado, congelado) (Colenbrander *et al.*, 1992).

Requerimentos mínimos para utilização de garanhões em programas de inseminação artificial foram publicados pela *World Breeding Federation for Sport Horses* (WBFSH, 2014). Para IA com sêmen fresco: seriam necessário ao menos 300 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva (MP); para o sêmen refrigerado: ao menos 600 milhões de espermatozoides com MP (amostras com ao menos 35% de MP no momento da inseminação); para o sêmen congelado: ao menos 250 milhões de espermatozoides com MP (ao menos 35% de MP após o descongelamento).

Um importante aspecto seminal na classificação do potencial reprodutivo de garanhões é o percentual de defeitos encontrados na avaliação da morfologia espermática (Kenney *et al.*, 1983). Tentativas de correlacionar o percentual de defeitos morfológicos com a fertilidade têm apresentado resultados conflitantes. Enquanto alguns autores reportam diferentes graus de efeito da morfologia na fertilidade (Jasko *et al.*, 1990; Hellander *et al.*, 1991) outros falham em encontrar tal relação (Voss *et al.*, 1981; Dowsett & Pattie, 1982). Segundo Varner *et al.* (2013), se os espermatozoides morfológicamente anormais não exercem efeito direto negativo nos espermatozoides normais, é possível que o número total de espermatozóides normais no ejaculado seja mais importante para fertilidade que o percentual de defeitos morfológicos.

Segundo Card (2005) garanhões possuem aproximadamente 50% de espermatozóides normais. Este relata uma lacuna de conhecimento no

que tange aos níveis toleráveis dos diferentes defeitos para fertilidade. No entanto, os seguintes valores devem ser considerados na identificação de animais com problemas reprodutivos: >10% de células germinativas prematuras, mais de 30% de defeitos de cabeça e/ou peça intermediária, >25% de gotas proximais e um percentual de células normais menor que 30%. Apesar do manual norte americano (*Society For Theriogenology BSE Stallion Guidelines*) não trazer limites de restrição para os diferentes defeitos, defende que para um índice satisfatório de prenhes garantidas devem produzir ao menos 2 bilhões de espermatozoides com motilidade progressiva e morfologicamente normais em dois ejaculados colhidos com uma hora de intervalo. Animais que apresentem tais características morfológicas estariam aptos a reproduzir com ao menos 75% de fertilidade (quando da cobertura de até 40 éguas ao longo da estação ou 120 éguas quando do uso da inseminação artificial). Card (2005) resalta ainda que animais com menos de 40% de espermatozoides normais podem alcançar satisfatórios índices de fertilidade se o número de éguas para estes ganhão for baixo ou o número de espermatozoides normais por dose for aumentado no mínimo no dobro de uma dose convencional. O espermatozoide normal poderia compensar os anormais. Ganhões com $\geq 60\%$ de espermatozoides normais geralmente requerem um número menor de espermatozoides por dose inseminante.

Tabela 03: Médias de parâmetros seminais de garanhões para diferentes raças de equinos.

Raça	Volume sem gel (mL)	Volume de gel (mL)	Motilidade (0-100%)	Concentração ($\times 10^6$/mL)	Número total sptz ($\times 10^9$)	Autor
Thoroughbred (n=141)	28,3	2,7	70,7	114,29	5,0	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Standardbreed (n=111)	30,2	3,1	84,6	97,2	4,7	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Árabe (n=73)	36,2	0,95	85,0	286,8	12,7	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Australina Stock Horse (n=73)	33,2	5,5	77,8	116,1	4,8	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Quarto de milha (n=30)	23,8	4,0	73,9	171,7	5,4	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Palomino (n=44)	23,8	1,1	72,9	138,5	4,0	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Ponei (n=38)	20,8	2,5	69,7	104,0	1,12	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Shetland (n=8)	44,4	13,1	70,1	101,2	1,7	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Apalosa (n=18)	23,3	2,0	73,2	90,4	3,3	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Ponei (n=216)	24,2	*	63,8	233,6	4,9	Adaptado: Paccamonti et al., 1999.
Dutch Warmblood – riding type (n=318)	64,3	*	70,0	214,3	11,7	Adaptado: Parlevliet et al., 1994.
Dutch Warmblood – carriagetype (n=80)	67,4	*	66,4	174,2	9,9	Adaptado: Parlevliet et al., 1994.

* Dados não disponíveis.

Tabela 04: Médias do percentual de defeitos morfológicos e percentual de espermatozoides normais para diferentes raças de equinos.

Raça	Gota Proximal	Gota Distal	Cabeça isolada	Defeitos de acrossoma	Defeitos de peça intermediária	Cauda anormal	Cabeça anormal	Normais	Autor
Swedish Warmblood (n=8)	6,4	3,6	1,6	1,9	5,0	3,7	10,2	72,7	Adaptado: Einarsson et al., 2009.
Tori breed (n=6)	17,3	*	2,3	0,6	5,1	6,6	12,6	57,5	Adaptado: Kavak et al., 2004.
Estonian breed (n=7)	2,9	*	2,3	1,6	2,4	6,4	13,9	74,4	Adaptado: Kavak et al., 2004.
TB (n=142)	12,3	8,0	1,4	*	13,0	6,4	4,7	54,2	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Standardbred (n=110)	4,4	2,7	1,6	*	11,9	8,9	6,4	64,1	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Árabe (n=72)	3,5	6,2	0,9	*	11,0	8,9	4,3	65,2	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Australian Stock Horse (n=73)	7,6	4,5	1,4	*	20,5	5,4	4,6	56,0	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Quarto de milha (n=30)	4,4	3,8	0,9	*	11,3	7,1	4,4	68,1	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Palomino (n=43)	2,4	2,1	16,8	*	13,8	16,0	7,8	41,1	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Ponei (n=36)	5,5	1,9	0,9	*	9,4	11,9	8,2	62,2	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Shetland (n=7)	8,3	2,6	1,3	*	19,6	20,1	8,3	39,8	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.
Apalosa (n=18)	6,5	4,4	1,7	*	9,8	5,5	6,5	65,6	Adaptado: Dowsett & Knott, 1996.

* Dado não disponível.

Buscando descrever as características físicas e morfológicas do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, Vale (1976) avaliou 16 garanhões, com idade entre 4,5 e 12 anos. Foram realizadas 121 colheitas com intervalo entre colheitas de dois a cinco dias. Os resultados encontrados apresentam-se sumariados na tabela abaixo:

Tabela 05: Médias \pm desvio padrão e amplitude de variação das características seminais de garanhões de raça Mangalarga Marchador.

Característica analisada	Média \pm Desvio Padrão	Amplitude
Volume total ejaculado (mL)	75,2 \pm 23,10	30 – 166
Volume sem gel ejaculado (mL)	46,9 \pm 22,1	33 – 117
Volume de gel ejaculado (mL)	28,3 \pm 22,0	10 – 102
Concentração ($\times 10^6$ /mL)	184,0 \pm 89,4	54 – 424
Motilidade (%)	63,5 \pm 12,8	40 – 90
Defeito de cabeça (%)	7,9 \pm 2,9	2 – 16
Defeito de peça intermediária (%)	1,0 \pm 1,2	0 – 6,5
Defeitos de cauda (%)	7,6 \pm 3,0	2 – 15
Defeitos de acrossoma (%)	0,4 \pm 0,7	0 – 3,5
Gota citoplasmática proximal (%)	7,4 \pm 2,9	2,5 – 14
Inserção de cauda abaxial (%)	60,0 \pm 1,7	40 – 70
Gota citoplasmática distal (%)	16,4 \pm 1,3	5,5 – 28,5

Adaptado: Vale, 1976.

É importante resaltar que as relações entre as características seminais rotineiramente avaliadas, como motilidade e alterações morfológicas, e o índice de prenhes em éguas são relativamente baixas (menor que 50%) em programas comerciais de reprodução (Jasko *et al.*, 1992; Jasko *et al.*, 2000; Love, 2011). Na verdade existe uma série de fatores envolvidos no índice de fertilidade de garanhões (inerente às éguas, ao manejo reprodutivo dos animais, aos garanhões e às interações celulares e moleculares envolvidas no processo de fertilização). Desta forma, apesar de uma bateria de testes na avaliação do potencial reprodutivo de garanhões serem atualmente disponíveis, não existe uma fórmula mágica que irá retratar o real índice de fertilidade em todo garanhão avaliado (Varner *et al.*, 2013).

2.5- Refrigeração e congelamento do sêmen de garanhões:

O uso da inseminação artificial possibilitou aumentar de forma satisfatória o número de éguas prenhes ao final da estação de monta por garanhão. No entanto, com o desenvolver da técnica novos problemas

foram surgindo, como a necessidade de manter o sêmen viável por um período maior, para realizar inseminações em diferentes propriedades sem a necessidade do transporte de garanhões. Baseado neste problema no começo do século XIX iniciaram-se os estudos sobre refrigeração de sêmen para transporte, o qual ao longo dos últimos anos vem sendo utilizado, em diferentes espécies.

O sêmen refrigerado vem fazendo parte da rotina dos profissionais que trabalham com reprodução de equinos ao longo das últimas décadas. Este cenário de ampla utilização do sêmen refrigerado é bastante diferente quando comparado, por exemplo, com a espécie bovina. Tal fato se deve aos resultados obtidos com o sêmen equino congelado. A variação de resposta entre garanhões ao congelamento, o baixo rendimento de doses por ejaculado, o intenso manejo de controle folicular das éguas durante as inseminações, além da grande variação nas taxas de prenhes em relação às obtidas por monta natural, uso do sêmen fresco ou refrigerado, têm limitado maior difusão do sêmen congelado em equinos (Ball, 1998, Backman *et al.*, 2004).

2.5.1- Refrigeração do sêmen de garanhões

Para aumentar a duração da viabilidade dos espermatozoides, o refrigeração visa reduzir a taxa metabólica destas células, com isso, tem-se uma redução no consumo do substrato disponível e uma redução nos produtos do metabolismo espermático, muitas vezes tóxicos para célula. A temperatura corporal o metabolismo espermático é alto, continuando elevado a temperatura ambiente. Porém, com a queda de temperatura há uma redução neste metabolismo, sendo que a cada 10°C de queda, o metabolismo reduz em cerca de 50%. Quando os espermatozoides são mantidos a 5°C, apenas 10% de seu metabolismo são necessários para sua sobrevivência quando comparado à preservação a 38°C (Squires *et al.*, 1999).

As principais vantagens da utilização do sêmen refrigerado são: redução dos gastos com transporte de garanhões e éguas, prevenção de doenças transmissíveis pelo coito, movimentação o mercado de venda de sêmen, permite direcionar melhor o acasalamento através da utilização de

garanhões geneticamente superiores. Como desvantagens têm-se: custos com serviço veterinário (colheita e processamento do sêmen, acompanhamento da fêmea, hormônio para sincronizar ovulações), custos com materiais (meios diluidores, contêineres de refrigeração), variação de resposta ao refrigeração entre garanhões e custo com transporte do sêmen.

Diversos fatores irão influenciar no sucesso do refrigeração do sêmen de garanhões, dentre eles estão: tipos de contêiner utilizados para refrigeração e transporte, o meio diluidor utilizado no refrigeração, a concentração espermática e o volume da dose inseminante, e o efeito do garanhão.

2.5.1.1- Tipos de contêineres:

Sob o aspecto de equipamentos, existem sistemas passivos e ativos de refrigeração de sêmen. Os sistemas passivos possuem a vantagem de serem mais baratos, embora apresentem a desvantagem de proporcionarem taxas de refrigeração dependentes de alguns fatores, como: temperatura ambiente, temperatura inicial da amostra, temperatura do produto refrigerante e volume da amostra. Já os sistemas ativos são caros, mas permitem taxas de refrigeração pré-determinadas pelo técnico, possibilitando combinar mais de uma taxa durante o processo, proporcionam, ainda, taxas de refrigeração lineares. Diante disso, sistemas ativos de refrigeração, apesar de muito eficientes, são de pouca utilidade prática em condições de campo.

Ao se resfriar o sêmen de 37°C a 5°C, a taxa de queda de temperatura deve ser controlada, principalmente entre 19°C e 8°C, intervalo este em que o espermatozóide está mais susceptível ao choque térmico (Moran *et al.*, 1992). Parece haver consenso entre os pesquisadores sobre a necessidade de se utilizar taxas de refrigeração lentas, não superiores a -0,05°C/min, nesta faixa de temperatura, pois esta é a fase crítica de ocorrência das lesões nas membranas espermáticas (Kayser, 1992, Amann & Graham, 1993, Squires *et al.*, 1999).

Alguns fatores devem ser levados em conta na escolha do contêiner para transporte de sêmen: capacidade de isolamento térmico do meio exterior, taxa de refrigeração adequada, manutenção da temperatura final pelo maior tempo possível, proteção do sêmen, estrutura forte, serem simples, leves e de baixo custo (Silva Filho *et al.*, 1994).

Desde a introdução do primeiro contêiner (Equitainer) no mercado (Douglas-Hamilton *et al.*, 1984), vários outros vêm sendo desenvolvidos. Dentre eles: Max Sêmen Express[®], Equitainer I[®], Equitainer II[®], Clipper[®], Botutainer[®], Botubox[®], Botuflex[®], etc. Estes contêineres são produzidos visando atender ao máximo às características de refrigeração adequadas para espermatozóides equinos, como queda de temperatura e manutenção da temperatura final (Silva Filho *et al.*, 1994).

Na rotina de campo alguns veterinários têm realizado transporte em sistemas improvisados com caixa de isopor e alguma fonte de gelo. O grande problema com o uso dos contêineres improvisados está na grande variação de resultados. Estes contêineres não possuem uma taxa de refrigeração padronizada e falta controle na temperatura final de armazenamento, além disso, de uma forma geral são mais susceptíveis a variações na temperatura do ambiente externo. Tais fatos têm influenciado os resultados obtidos com alguns garanhões com ejaculados submetidos a este improvisado.

Para melhor informar os consumidores é importante que as empresas produtoras dos contêineres disponibilizem especificações técnicas como a taxa de refrigeração, temperatura final e o tempo máximo de estocagem. Através destas informações é possível adequar cada contêiner às diferentes durações de transporte, às diferentes respostas de cada garanhão, bem como avaliar o custo benefício de cada fabricante/produto.

2.5.1.2- Meios diluidores:

Os diluidores de sêmen são soluções destinadas a proteger os espermatozóides e prolongar sua sobrevivência durante a refrigeração e o transporte, além de apresentarem a vantagem de aumentar o volume da

dose inseminante e auxiliarem na avaliação do sêmen (Kenney *et al.*, 1975). Em geral, o plasma seminal não é um bom extensor para os espermatozoides, justificando o efeito benéfico dos diluidores inclusive para inseminações com sêmen fresco (Morrell *et al.*, 2014).

A maior parte dos diluidores comerciais disponíveis no Brasil para refrigeração de sêmen equino são produzidos a base de leite em pó. Geralmente estes diluidores contêm: açúcares (substrato energético), antibióticos (prevenir crescimento microbiana durante armazenamento), eletrólitos e tampões (controle da osmolaridade e pH) (Bedford-Guaus, 2007).

Existem uma série de diluidores a base de gema de ovo que vêm sendo testados para refrigeração de sêmen equino. No entanto, a variabilidade dos resultados na utilização destes diluidores, associado aos excelentes resultados obtidos com os meios a base de leite em pó disponíveis no Brasil, têm limitado a utilização destes diluidores em nosso país.

Embora não se conheça os exatos mecanismos de proteção de leite contra o choque térmico, provavelmente as proteínas do leite agem de modo similar às lipoproteínas da gema de ovo, estabilizando as membranas (Amann & Graham, 1993).

Para melhores resultados na adição do meio diluidor ao ejaculado é importante que este esteja a uma temperatura próxima a do sêmen e seja adicionado de forma lenta. Logo após diluição o movimento circular dos espermatozoides aumenta, mas com cerca de 10 minutos retornam ao padrão de normalidade do garanhão (Varner *et al.*, 2013).

2.5.1.3- Concentração espermática e o volume da dose inseminante:

Conhecer a concentração do sêmen a ser enviado e calcular o volume correto pode evitar insucessos na inseminação de éguas, devido ao uso de baixas doses, e maximizar o número de éguas inseminadas por evitar o envio de uma dose maior que a necessária.

Muito se discute sobre a proporção correta entre diluidor e sêmen que antecede o refrigeração. Para inseminações realizadas com sêmen fresco tem-se trabalhado principalmente com a proporção de 1:1 (sêmen :

diluidor). No caso do sêmen refrigerado a diluição de 1:2, 1:3 ou superior têm sido mais recomendada (Varner et al., 1987; Loomis, 2012). Maior atenção que na proporção sêmen diluidor deve ser dada a concentração espermática do sêmen a ser refrigerado. O ideal é que esta concentração esteja entre de $25-50 \times 10^6$ espermatozóides por mL (Varner et al., 1987; Jasko et al., 1992).

Apesar do relato de prenheses com doses de sêmen refrigerado de 100×10^6 espermatozóides com motilidade progressiva, tem sido amplamente aceito como dose recomendada ao menos 500×10^6 espermatozóides apresentando motilidade progressiva para otimização das taxas de gestação (Pickett et al., 1976; Householder et al., 1981). Desta foram, para boa parte dos garanhões, ao menos 1 bilhão de espermatozoides com motilidade progressiva devem ser enviados com intuito de que ao final do armazenamento tenha-se a dose adequada para inseminações (Bedford-Guaus, 2007). Tem-se recomendado para o sêmen refrigerado volumes que não ultrapassem 60 mL (Loomis, 2011).

2.5.1.4- Efeito do garanhão no sucesso do refrigeração:

Antes do envio de sêmen de garanhões é de extrema importância o conhecimento das características seminais e da resistência aos diferentes sistemas de refrigeração do animal a ser trabalhado.

Darenius (1998) sugere que os garanhões a serem utilizados nos programas de IA com sêmen refrigerado devam possuir: órgãos genitais internos e externos sem alterações, produção semanal de espermatozóides em torno de $30-35 \times 10^9$, 70% de células morfolologicamente normais, motilidade superior a 50% e, após 12 horas de refrigeração, uma redução da motilidade inicial não superior a 30%, considerando como motilidade mínima ao final desse período de 40%.

A qualidade e composição do sêmen podem influenciar de forma direta os resultados de fertilidade obtidos. Devido a variação de resposta ao refrigeração existente entre garanhões, recomenda-se a realização de testes com diferentes meios diluidores e containeres de refrigeração. Desta forma, é possível definir se determinado animal deve ou não ser utilizado em programas de IA com sêmen refrigerado,

assim como a forma mais adequada de fazer esta utilização (Brisko et al., 2000; Bedford-Guaus, 2007).

2.5.1.4.1- Ferramentas para melhorar os resultados de ganhões de baixa resistência ao refrigeração:

Colheita de sêmen: atenção à contaminação do sêmen é imprescindível. Higienização do pênis durante a estação e cuidados higiênicos com o material que vai entrar em contato com o sêmen são de extrema importância (Aurich & Sperser, 2007; Price et al., 2008). Além disso, a colheita pode ser otimizada obtendo ejaculados com menor volume e maior concentração. Para isso, a colheita deve ser realizada com mínimo estímulo sexual possível do ganhão, ou seja, menor número de montas (Aurich, 2008; Kalmar et al., 2014).

Diluidor de sêmen: em animais com baixa motilidade espermática podem ser testados diluidores alternativos (Aurich, 2008). No Brasil existem diluidores como Max Sêmen Plus[®] e Botu-Turbo[®] que possuem constituintes que visam “incrementar a motilidade” dos espermatozoides refrigerados a 5°C. Recentemente foi lançado no mercado nacional um diluidor (Botusemen Special[®]) que incrementa a fertilidade de ganhões *bad coolers* (refrigeram mal o sêmen), podendo também ser uma ferramenta a ser testada para determinados ganhões (dados não publicados).

Centrifugação: é uma boa alternativa para alguns animais que não respondem bem ao processo de refrigeração, apesar de não afetar aqueles animais que refrigeram bem o sêmen (Jasko et al., 2001; Brisko, 2000; Barrier-Battut et al., 2010; Morrell et al., 2014). A centrifugação pode ser realizada a 600 x g por 10 minutos após a diluição de sêmen com diluidor a base de leite na proporção de 1:1 (sêmen : diluidor) (Barrier-Battut et al., 2010). Como inconveniente tem-se que cerca de 25% das células são perdidas no sobrenadante (Loomis, 2006).

Além da centrifugação com meios diluidores convencionais a base de leite desnatado, ao longo dos últimos anos têm sido desenvolvidos

gradientes de centrifugação para selecionar a população de espermatozoides a serem preservados. Atualmente existem comercialmente os gradientes de centrifugação de uma camada (Androcoll-E[®]) e de múltiplas camadas (Equipure[®]) para selecionar espermatozoides de garanhões (Morrell *et al.*, 2009; Stoll *et al.*, 2008)

Apesar dos grandes benefícios do uso do sêmen refrigerado, esta técnica apresenta como limitação para preservação de material genético o tempo que o sêmen permanece viável. Grande parte dos garanhões apresentam queda na fertilidade após armazenamento por um período superior a 24 horas, podendo o sêmen de alguns animais não resistir inclusive à um tempo inferior (Brisko *et al.*, 2000). Esta resistência não depende apenas da qualidade do sêmen fresco, mas também da composição do plasma seminal e a composição da membrana plasmática de cada garanhão (Aurich, 2005). É importante enfatizar que a motilidade nem sempre é um bom indicador da fertilidade no sêmen refrigerado e que as inseminações devem ser realizadas em um período de tempo máximo de 24 horas antes da ovulação (Brisko *et al.*, 2000).

Portanto, apesar de amplamente utilizado, o sucesso no processo de refrigeração do sêmen de garanhões apresenta uma série de fatores a serem levados em conta para obtenção de resultado satisfatório. Alguns destes fatores podem ser controlados (meio diluidor, concentração espermática, volume e dose inseminante, tipo de container, conhecimento de técnicas para melhorar o resultado de garanhões com sêmen de qualidade inferior), outros não (qualidade espermática do garanhão, resistência ao processo de refrigeração). Cabe aos técnicos responsáveis determinarem a melhor forma de se trabalhar com o sêmen refrigerado de cada garanhão e em alguns casos não indicar a utilização desta técnica.

2.5.2- Congelamento de sêmen de garanhões

O processo de criopreservação de sêmen inclui todas as etapas – desde a colheita de sêmen, diluição, centrifugação, refrigeração e congelamento – até a manutenção da capacidade funcional do espermatozóide por determinado período após o descongelamento

(Watson, 1995). O sucesso no resultado final do processo de criopreservação depende de interações entre meios diluidores, crioprotetores, curva de refrigeração e descongelamento. Agindo em conjunto, estas etapas, são responsáveis por reduzir os danos causados pelo choque térmico, reduzir a formação de cristais de gelo intercelulares e propiciando uma adequada desidratação celular (Holt, 2000).

Durante o processo de criopreservação existem ao menos dois pontos de estresse pelos quais as células espermáticas passam. O primeiro está relacionado aos efeitos das mudanças na temperatura e o segundo em função da formação e dissolução de cristais de gelo (Watson, 1995).

Desta forma, o processo de congelamento deve respeitar uma taxa de queda de temperatura. Taxas de congelamento excessivamente rápidas culminam na formação de cristais de gelo no interior das células espermáticas que causam danos às estruturas dos espermatozoides (Senger, 1986). Por outro lado, taxas lentas expõem o sêmen ao efeito de solução superconcentrada que é tóxico para os espermatozoides (Duncan & Watson, 1992; Watson, 1995).

À medida que se tem a queda de temperatura (durante o congelamento) as moléculas de água vão se cristalizando, tal fato resulta em uma maior concentração de solutos na fração não congelada. Estes formarão os “canais não congelados” onde os espermatozoides irão se manter após completo o processo de criopreservação (Squires *et al.* 1999). Amann & Pickett (1987) afirmam que somente as células localizadas neste local sobreviverão ao processo da criopreservação.

Diferentes teorias da crioinjúria divergem em apontar se a injúria ocorre durante a queda de temperatura ou o aquecimento do espermatozoide. Há alguma evidência para sugerir que células congeladas sejam danificadas pelo reaquecimento, o que tem sido considerado devido ao fenômeno chamado de recristalização de cristais. Este fenômeno consiste na transformação de vários cristais microscópicos de gelo em cristais de gelo maiores, que são reconhecidos como prejudiciais (Watson, 1995). Lesões de membrana causadas por transições da fase lipídica talvez possam também ser responsáveis por

este efeito negativo do aquecimento, uma vez que passar pelo processo de refrigeração e reaquecimento significa atravessar pontos de transição de fase por duas vezes (Holt *et al.*, 1992).

Para que a criopreservação tenha sucesso, é necessário que o espermatozóide seja colocado em um ambiente apropriado (diluidor), que minimize os danos às membranas, e não acione prematuramente os mecanismos de capacitação espermática e reação acrossômica (Loomis, 2005). Com esse intuito têm se produzido meios diluidores adicionados de uma série de crioprotetores.

Segundo Keith (1998), um bom crioprotetor deve possuir baixo peso molecular, com alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular. Observando a literatura é possível encontrar uma divisão básica que agrega os crioprotetores em penetrantes e não penetrantes.

Ashwood-smith (1987) subdividiu uma série de compostos penetrantes, da família dos álcoois (etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol, polietilenoglicol, e propilenoglicol), das amidas (acetamida, formamida, lactamida entre outras) e o dimetil sulfóxido (DMSO) com características crioprotetoras. O glicerol é atualmente o principal crioprotetor penetrante utilizado apesar de seus efeitos deletérios, como: estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez e permeabilidade da membrana, e na sua composição lipídica (Watson, 1995). Ainda hoje, o mecanismo de ação dos crioprotetores penetrantes não está bem compreendido, sugere-se (Watson, 1981) que estas substâncias atuem por meio de propriedade coligativa com a água reduzindo o ponto de congelação da solução. Estes compostos modificam as características da molécula de água, reduzindo a formação de cristais de gelo, atuando como solvente e diminuindo a concentração de solutos no meio externo. A presença do glicerol em uma solução irá propiciar uma maior quantidade de água não congelada do que outra sem o glicerol, aumentando o volume dos canais de solventes não congelados e reduzindo a concentração de sais das porções não congeladas (Mazur, 1980; Dalimata *et al.*, 1997). Além disto, estas substâncias atuam na membrana celular estabilizando o complexo: água, lipídeo e proteína (Rowe, 1966).

Entre os crioprotectores não penetrantes estão os açúcares (lactose, frutose, rafinose e threalose), os polímeros sintéticos (metil celulose), a gema de ovo, o leite e alguns aminoácidos (glutamina, treonina, glicina, dentre outros). Esta categoria protege as células basicamente por meio de efeitos osmóticos. As células em suspensão em um meio hipertônico perdem seu conteúdo de água. Desta forma, diminuem a possibilidade de formação de cristais dentro da célula. Estes componentes agem como solutos ou colóides, não servindo como solventes (Graham, 1998).

2.5.2.1- Etapas do processo de criopreservação:

2.5.2.1.1- Centrifugação:

A centrifugação realizada durante a criopreservação do sêmen de garanhões tem como objetivo reduzir a quantidade de plasma seminal e aumentar a concentração espermática. Tem se demonstrado que a presença do plasma seminal em grande quantidade durante processo de criopreservação tem efeitos nocivos aos espermatozóides, como a redução da motilidade espermática (Love *et al.*, 2002; Aurich, 2008).

No entanto, a centrifugação pode agir em via de mão dupla, com efeitos positivos e negativos a motilidade dos espermatozóides (Martin *et al.*, 1979). Respeitar a relação força e tempo de rotação são fundamentais para reduzir estes prejuízos. O protocolo de centrifugação mais usado para garanhões é a rotações a 600 g por 10 minutos (Vidament *et al.*, 2000; Ecot *et al.*, 2005, Knop *et al.*, 2005). Dados na literatura relacionados à perda de espermatozoides no sobrenadante por este procedimento são contraditórios, mas tal perda tem se mantido de 1,9 (Weiss *et al.*, 2004) a 25% (Ecot *et al.*, 2005; Knop *et al.*, 2005).

2.5.2.1.2- Refrigeração

O refrigeração do sêmen inicia-se logo após a colheita, quando o sêmen é refrigerado da temperatura corporal (37°C) a temperatura do ambiente de manipulação. Poucos danos são observados aos espermatozóides nesta fase, quando estes se encontram diluídos em

meio adequado (Keith, 1998). Tal fato foi ilustrado por Kayser *et al.* (1992) que demonstraram que o sêmen poderia ser refrigerado inclusive em taxas rápidas sem prejuízos para motilidade entre as temperaturas de 37°C e 20°C. Contudo, na faixa entre 19°C e 8°C, as células se apresentaram mais susceptíveis aos danos induzidos pelo refrigeração devendo-se respeitar uma queda de temperatura adequada (Moran, 1992; Watson, 1995; Graham, 1996; Fürst, 2005).

Estudos têm demonstrado o efeito benéfico do refrigeração, até 4-5 °C, antes do congelamento de sêmen equino (Vidament *et al.*, 1997; Fürst *et al.*, 2005).

2.5.2.1.3- Congelamento:

Com a redução da temperatura, inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular, com isso, começa a acumular soluto neste compartimento que por osmose atrai mais água intracelular, desidratando o espermatozóide (Mazur, 1984). No congelamento lento (-25 a -40°C/min.), o espermatozóide se desidrata devido à alta concentração de solutos no meio extracelular. Conseqüentemente, não se formam grandes cristais de gelo intracelulares (Amann & Pickett, 1987). Devido a maior concentração de soluto, as células espermáticas podem sofrer o efeito solução que é prejudicial à célula (Watson, 1995). Por outro lado, numa curva de congelamento muito rápida (> -60°C/min.), a água não tem tempo de sair da célula e, em algum ponto abaixo de -10°C, esta congelará com a formação de grandes cristais de gelo. Cristais maiores podem causar danos mecânicos à célula, sendo uma das principais causas de morte celular durante o congelamento (Graham, 1998).

A curva ideal de congelamento vai depender do tipo e da concentração do crioprotetor utilizado. Dado a grande variação de constituição dos meios de congelamento, não foi ainda definida uma taxa de congelamento padrão (Heitland *et al.*, 1995).

2.5.2.1.4- Descongelamento:

Dentre os principais métodos propostos para ganhões no descongelamento de palhetas de 0,5 mL estão: o descongelamento

rápido (75°C / 7") e o lento (37°C / 30"). Vidament *et al.* (2002), ao estudarem a motilidade espermática do sêmen descongelado de garanhões a diversas temperaturas e tempos de descongelamento (37°C/30", 50°C/10", 50°C/20", 60°C/10", 75°C/5", 75°C/10", 75°C/15"), não observaram diferenças entre os tratamentos, exceto para o descongelamento a 75°C/15", cuja motilidade foi zero. O método de descongelamento lento apresenta como vantagens a facilidade e menor probabilidade de erros ao descongelamento, além de maior agilidade no descongelamento de múltiplas palhetas (Samper, 2007).

3- EXPERIMENTO I: CARACTERÍSTICAS COMPORTAMENTAIS PRÉ CÓPULA DE GARANHÕES DA RACA MANGALARGA MARCHADOR

3.1- Objetivos:

- descrever as características comportamentais pré cópula de garanhões da raça Mangalarga Marchador submetidos a colheita de sêmen. Verificar efeito de quatro diferentes faixas etárias nestas características.

3.2- Material e métodos:

3.2.1- Localização:

As avaliações foram realizadas durante colheitas de sêmen entre os meses de Janeiro de 2012 e Julho de 2013 nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, Brasil. Latitudes variando entre 21.24°S e 19.91°S.

3.2.2- Animais:

Foram avaliadas 195 colheitas de sêmen (número máximo de 2 colheitas por garanhão) de 107 garanhões registrados ou controlados da raça Margalarga Marchador com idade entre 2 e 21 anos. Os animais foram agrupados em quatro diferentes faixas etárias: 2-3 anos, 4-6 anos, 7-15 anos e mais de 15 anos.

3.2.3- Colheita de sêmen:

Para avaliar o comportamento durante a colheita de sêmen foram utilizadas éguas em estro devidamente contidas com peia. Utilizou-se vagina artificial modelo Botucatú[®] preenchida com água aquecida a 45°C. O local utilizado para colheita de sêmen foi o mesmo utilizado pelos haras neste tipo de atividade. Antes de iniciar as avaliações os garanhões passavam por um regime de 6 colheitas em 3 dias (duas por dia), respeitando-se um intervalo de 48-72 horas para iniciar as avaliações.

3.2.4- Avaliação do comportamento:

A partir da visualização da égua em cio pelo garanhão na área de colheita de sêmen, os seguintes tempos foram cronometrados e as seguintes variáveis foram quantificadas:

- Tempo de reação (segundos): duração entre a visualização da égua pelo garanhão até ereção completa do pênis.
- Tempo de latência (segundos): duração entre a ereção e realização da primeira monta do garanhão.
- Tempo de monta (segundos): duração entre o início da monta do garanhão na égua até a descida após ejaculação.
- Número de montas (n): número de montas com garanhão em ereção necessárias para colheita do sêmen. Foram quantificadas apenas as montas onde houve introdução do pênis do garanhão na vagina artificial.
- Número de reflexos de flehmen (n): foram quantificados do momento de visualização da égua em cio pelo garanhão até finalização da colheita de sêmen.
- Duração da coheita (s): duração entre a visualização da égua pelo garanhão e a descida do garanhão desta após concretizada ejaculação.

3.2.5- Análise estatística:

Para as variáveis quantitativas, efetuaram-se os testes de Lilliefors com intuito de verificar normalidade de distribuição dos dados, e Cochran (números iguais de repetições dentro de cada nível) e Bartlett (números desiguais de repetições) para verificar a homogeneidade das variâncias dos grupos. Aqueles dados que não atenderam a premissa da ANOVA foram submetidos à análise não paramétrica e as médias comparadas pelos testes de Kruskal-Wallis com probabilidade de erro de 5%. As variáveis que atenderam às premissas foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro.

Foi utilizado o programa estatístico SAEG-UFV 9.1 (UFV, 2007).

3.3- Resultados e discussão:

As médias e desvios padrões das médias para as diferentes características comportamentais analisadas ao longo de duas colheitas de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador encontram-se sumariadas na tabela 6.

Tabela 06: Médias \pm desvio padrão das características de comportamento de garanhões da raça Mangalarga Marchador para diferentes faixas etárias.

Parâmetro	Colheita	Faixa etária				Média
		2-3 anos	4-6 anos	7-15 anos	Mais 15 anos	
Tempo de reação (s)	1	130,7 \pm 142,4A (n=24)	98,9 \pm 148,0A (n=44)	94,6 \pm 304,2A (n=33)	36,5 \pm 18,6A (n=6)	101,1 (n=107)
	2	63,3 \pm 38,0A (n=17)	66,5 \pm 55,7A (n=33)	48,5 \pm 54,1A (n=31)	85,50 \pm 77,0A (n=6)	61,4 (n=87)
Tempo de latência (s)	1	24,5 \pm 26,4A (n=24)	25,7 \pm 29,2A (n=44)	28,2 \pm 27,6A (n=33)	58,8 \pm 102,9A (n=6)	28,1 (n=107)
	2	20,3 \pm 16,7A (n=17)	24,6 \pm 27,4A (n=33)	38,1 \pm 85,5A (n=31)	82,5 \pm 152,2A (n=6)	32,2 (n=87)
Tempo de monta (s)	1	31,1 \pm 8,0A (n=24)	33,3 \pm 8,6A (n=44)	34,1 \pm 8,1A (n=33)	30,8 \pm 8,3A (n=6)	32,8 (n=107)
	2	34,2 \pm 7,7A (n=17)	33,0 \pm 8,6A (n=33)	34,2 \pm 10,2A (n=31)	30,5 \pm 9,2A (n=6)	33,6 (n=87)
Número de reflexos de Flehmen	1	2,4 \pm 5,4A (n=24)	0,6 \pm 1,0A (n=44)	0,3 \pm 0,8A (n=33)	0,5 \pm 0,8A (n=6)	0,9 (n=107)
	2	0,3 \pm 0,8A (n=17)	0,7 \pm 1,2A (n=33)	0,5 \pm 1,2A (n=31)	0,8 \pm 1,6A (n=6)	0,6 (n=87)
Número de montas	1	1,7 \pm 0,9A (n=24)	1,7 \pm 1,0A (n=44)	1,4 \pm 0,7A (n=33)	1,3 \pm 0,8A (n=6)	1,6 (n=107)
	2	1,2 \pm 0,5A (n=17)	1,5 \pm 0,7A (n=33)	1,5 \pm 0,7A (n=31)	1,5 \pm 0,8A (n=6)	1,4 (n=87)
Duração colheita (s)	1	271,5 \pm 295,8A (n=24)	218,4 \pm 234,6A (n=44)	197,3 \pm 334,8A (n=33)	138,3 \pm 118,2A (n=6)	220,2 (n=107)
	2	134,6 \pm 62,7A (n=17)	173,4 \pm 184,9A (n=33)	177,3 \pm 164,5A (n=31)	242,5 \pm 212,8A (n=6)	171,9 (n=87)

Tempo de reação: entre o garanhão ver a égua e ter completa ereção do pênis; **Tempo de latência:** da ereção completa a realização da monta na égua; **Tempo de monta:** do momento em que o garanhão monta na égua até descer.

- Valores seguidos de letras diferentes (A, B) sobescritos na mesma linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste de SNK.

Não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$) entre as diferentes faixas etárias para as variáveis comportamentais analisadas. As principais características nas quais foram observados valores médios com maior variação na média (tempo de reação, tempo de latência) são características com elevado coeficiente de variação.

Segundo parâmetros descritos por McDonnell (2009) para garanhões domesticados, após exposição a éguas em cio os machos apresentam ereção em até 2 minutos, realizam a monta 5-10 segundos

depois possuindo duração total da cópula de 2-5 minutos vemos algumas diferenças em relação ao presente estudo. O tempo médio de latência encontrado no presente estudo foi superior ao indicado pela autora em todas as faixas etárias avaliadas. Tal variável pode sofrer influência das características adotadas para colheita de sêmen dos garanhões da raça Mangalarga Marchador. Foram seguidos a rotina de colheita de sêmen nos criatórios onde a maior parte dos funcionários que conduziam o garanhão não permitiam a monta até que o garanhão estivesse em ereção. Tal fato pode levar os animais a temer a contenção pelo cabresto e demorar mais para realizar a monta. A duração da colheita esteve dentro do intervalo considerado normal pela mesma autora.

Foram observadas algumas variações interessantes no comportamento dos animais no presente estudo. O garanhão G53 não se mostrou estimulado quando da presença de uma égua de pelagem tordilha para colheita de sêmen, atingindo a ereção somente após a troca da égua por uma da pelagem alazã. Dois animais jovens com idade próxima a 2 anos e que ainda não haviam sido submetidos a colheita de sêmen, não atingiam a ereção quando contidos por cabresto. Após a retirada do cabresto no ambiente de colheita de sêmen atingiam a ereção e realizavam a monta possibilitando a colheita do sêmen. Características como tempo de reação e tempo de latência variaram de 29m39s a 1s e 7m53s a 1s, respectivamente.

Tais exemplos de variações individuais justificam o elevado CV das características comportamentais e ressaltam a importância em se avaliar e compreender o comportamento pré copula em garanhões. Uma vez identificados animais que apresentem comportamento fora dos parâmetros médios de normalidade, medidas durante o manejo da colheita de sêmen podem ser adotadas para busca agilizar/viabilizar o trabalho com estes animais.

A escassa literatura referente ao tema, e o baixo número de indivíduos avaliados na maior parte dos estudos limita o desenvolvimento de parâmetros para classificar e comparar indivíduos de diferentes raças.

3.4- Conclusões:

- Os parâmetros médios de comportamento de garanhões da raça Mangalarga Marchador encontram-se dentro dos parâmetros descritos para a espécie.

- Não foi observado diferença nas características de comportamento pré copula nas diferentes faixas etárias avaliadas para garanhões adaptados ao regime de colheita de sêmen.

4- EXPERIMENTO II: BIOMETRIA TESTICULAR E MENSURAÇÕES DAS GLÂNDULAS ACESSÓRIAS E AMPOLAS DO DUCTO DEFERENTE DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

4.1- Objetivos:

- Descrever as principais medidas biométricas dos testículos e verificar um efeito de quatro faixas etárias nestas medidas em garanhões da raça Mangalarga Marchador.

- Descrever algumas mensurações das glândulas acessórias e ampolas do ducto deferente e verificar um efeito de quatro faixas etárias nestas avaliações de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

- Identificar alterações de posição e ao exame de ultrassom nos testículos de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

4.2 Material e Métodos:

4.2.1- Localização:

As avaliações foram realizadas após colheitas de sêmen entre os meses de Janeiro de 2012 e Julho de 2013 nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, Brasil. Latitudes variando entre 21.24°S e 19.91°S.

4.2.2- Animais:

Foram utilizados 101 garanhões registrados ou controlados da raça Margalarga Marchador com idade entre 2 e 21 anos. Os animais foram

agrupados em quatro diferentes faixas etárias: 2-3 anos, 4-6 anos, 7-15 anos e mais de 15 anos.

4.2.3- Biometria testicular:

Para realização das mensurações testiculares os garanhões foram contidos em troncos após realização de colheita de sêmen, com auxílio de paquímetro tinham as seguintes medidas avaliadas:

- Comprimento testicular: avaliação realizada entre a inserção da cabeça e a inserção da cauda do epidídimo no testículo (avaliação craniocaudal).
- Largura testicular: maior diâmetro lateral de cada testículo (avaliação latero-medial).
- Altura testicular: avaliação entre o corpo do epidídimo e sua extremidade contra lateral na região de maior diâmetro (avaliação dorso-ventral).
- Largura escrotal total: avaliação do maior diâmetro escrotal latero-lateral, abrangendo os dois testículos posicionados ventralmente no escroto.
- Consistência: classificou-se a consistência testicular de 1-5 (1- flácido, 2- ligeiramente flácido, 3- normal, 4- ligeiramente rígido, 5- rígido).

4.2.4- Avaliação ultrassonográfica das glândulas acessórias, ampolas do ducto deferente e parênquima testicular:

Para realização das avaliações os garanhões foram contidos em troncos, após realização da colheita de sêmen foram submetidos à avaliação ultrassonográfica por via transretal e externamente ao escroto (parênquima testicular). Utilizou-se aparelho DP-2200 (Mindray®) na frequência de 5 MHz.

Nas mensurações das glândulas acessórias foram utilizadas as regiões de maior diâmetro ao longo das secções realizadas. As estruturas avaliadas encontram-se representadas na figura abaixo:

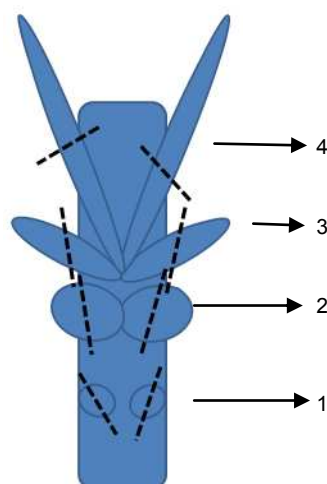


Figura 1: Desenho esquemático das glândulas acessórias e vesículas seminais de garanhões. Em pontilhado estão os cortes ultrassonográficos que foram utilizados para mensurações. 1- Glândula Bulbo Uretral; 2- Lobo prostático direito; 3- Glândula vesicular; 4- Ampola do ducto deferente.

4.2.5- Análise estatística:

Para as variáveis quantitativas, efetuaram-se os testes de Lilliefors com intuito de verificar normalidade de distribuição dos dados, e Cochran (números iguais de repetições dentro de cada nível) e Bartlett (números desiguais de repetições) para verificar a homogeneidade das variâncias dos grupos. Aqueles dados que não atenderam a premissa da ANOVA foram submetidos à análise não paramétrica e as médias comparadas pelos testes de Kruskal-Wallis com probabilidade de erro de 5%. As variáveis que atenderam às premissas foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro.

Foi utilizado o programa estatístico SAEG-UFV 9.1 (UFV, 2007).

4.3- Resultados e discussão:

Os dados referentes às características biométricas dos testículos de garanhões da raça Mangalarga Marchador encontram-se sumariados na tabela 07, abaixo.

Tabela 07: Médias \pm desvio padrão das medidas testiculares (testículos direito e esquerdo) para as diferentes faixas etárias de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

		Faixa etária			
		2-3 anos (n=22)	4-6 anos (n=42)	7-15 anos (n=32)	Mais de 15 anos (n=5)
Comprimento (mm)	TD	80,4 \pm 10,9 ^a	86,3 \pm 7,9 ^a	92,2 \pm 9,7 ^b	91,2 \pm 9,1 ^b
	TE	83,7 \pm 9,2 ^{ab}	86,1 \pm 8,5 ^{bc}	90,7 \pm 10,2 ^c	90,6 \pm 5,8 ^{abc}
Largura (mm)	TD	49,8 \pm 6,1 ^a	53,6 \pm 5,3 ^{ab}	56,9 \pm 7,5 ^b	58,8 \pm 4,3 ^b
	TE	52,0 \pm 5,8 ^a	53,2 \pm 6,0 ^{abc}	57,4 \pm 7,5 ^c	61,2 \pm 8,2 ^{ac}
Altura (mm)	TD	55,4 \pm 7,5 ^A	61,2 \pm 4,4 ^B	62,4 \pm 6,1 ^B	66,6 \pm 4,6 ^B
	TE	58,1 \pm 4,3 ^a	60,1 \pm 5,6 ^{ab}	63,6 \pm 6,0 ^b	66,6 \pm 3,6 ^b
Volume testicular (mm ³)	TD	120,7 \pm 41,6 ^a	149,6 \pm 33,0 ^b	174,6 \pm 47,9 ^b	187,9 \pm 34,4 ^b
	TE	134,6 \pm 34,1 ^a	146,2 \pm 35,6 ^a	177,0 \pm 47,3 ^b	194,2 \pm 37,6 ^b
Consistência* (1-5)	TD	2,6 \pm 0,7 ^A	3,0 \pm 0,5 ^A	3,1 \pm 0,5 ^A	2,8 \pm 0,4 ^A
	TE	2,7 \pm 0,2 ^A	3,0 \pm 0,2 ^A	2,9 \pm 0,3 ^A	3,2 \pm 0,2 ^A
Diâmetro Escrotal Total (mm)		88,7 \pm 10,9 ^A	94,5 \pm 8,3 ^B	104,1 \pm 11,9 ^C	108,6 \pm 3,6 ^C

Valores seguidos de letras diferentes (a, b, c) sobescritos na mesma linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Valores seguidos de letras diferentes (A, B) sobescritos na mesma linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste de SNK.

* Consistência: 1- Flácido, 2- Ligeiramente flácido, 3- Normal, 4- Ligeiramente rígido, 5- Rígido

Conforme apresentado foi observado o efeito de idade para boa parte das mensurações realizadas no testículo de garanhões. Nas quais, animais mais jovens apresentam mensurações testiculares muitas vezes menores que animais com idade superior a 7 anos ($P < 0,05$).

O diâmetro escrotal total (DET) tem sido muitas vezes utilizado para representar a avaliação e discussões sobre as medidas testiculares. De acordo com esta avaliação, garanhões de 2-3 anos apresentam menor DET médio que animais de 4-6. Este segundo grupo apresenta ainda médias de DET menor que animais com mais de 7 anos (7-15 anos e mais de 15 anos) ($P < 0,05$). Tais dados corroboram os expressos por Thompson *et al.* (1979) que relatou efeito de idade para o tamanho dos testículos e observou que garanhões com idade igual ou superior a sete anos apresentam testículos maiores que animais mais jovens.

Os valores médios relatados por Thompson *et al.* (1979) para LET foram superiores aos observados no presente estudo para raça Mangalarga Marchador. Este autor, relatou médias 9,6 cm, 10,0 cm e 10,9 cm respectivamente para os grupos 2-3 anos, 4-6 anos e mais de 7 anos.

Ao avaliar medidas biométricas dos testículos de animais da raça campolina, Manso Filho *et al.* (2000) relatou maiores valores médios de comprimento x largura dos testículos (TE e TD- <5 anos: 9,7 x 6,2 e 8,6 x 6,9; entre 5 e 10 anos: 10,0 x 5,5 e 9,8 x 7,2; mais de 10 anos: 9,9 x 6,8 e 9,9 x 7,3) que as observadas no presente estudo.

Ao avaliar a LET de garanhões de raças pequenas (Pôneis) Paccamonti *et al.* (1998), encontrou valores médios inferiores (7,56 cm) aos observados no presente estudo.

As variações existentes na média das medidas testiculares entre raças se devem provavelmente ao diferente porte destas raças (Dowsett & Knott, 1996; Paccamonti *et al.*, 1998) e às características expressadas pela seleção e criação dos diferentes animais (Aurich *et al.*, 2005). Tais resultados ressaltam a importância de se conhecer às características reprodutivas de garanhões dentro das diferentes raças.

Não foi observado ($P < 0,05$) variação no volume dos testículos direitos e esquerdo. Foi observada uma alta correlação entre os volumes dos testículos ($r = 0,80$).

As médias e os desvios padrão de medida das glândulas acessórias e ampolas seminais para diferentes faixas etárias de garanhões da raça Mangalarga Marchador encontram-se sumariadas na tabela 8.

Tabela 8: Médias \pm desvio padrão de medidas das glândulas acessórias e ampolas seminais (direita e esquerda) para as diferentes faixas etárias de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

		Faixa etária			
		2-3 anos (n=22)	4-6 anos (n=40)	7-15 anos (n=32)	Mais de 15 anos (n=5)
Largura Bulbo uretral (mm)	D	30,6 \pm 3,7 ^A	30,6 \pm 4,1 ^A	35,7 \pm 7,0 ^B	40,4 \pm 4,3 ^B
	E	30,4 \pm 3,9 ^a	29,8 \pm 4,2 ^a	35,0 \pm 6,1 ^b	38,0 \pm 4,7 ^b
Altura Bulbo Uretral (mm)	D	16,1 \pm 2,8 ^A	18,3 \pm 2,7 ^A	21,4 \pm 3,7 ^B	23,0 \pm 2,7 ^{AB}
	E	15,8 \pm 2,1 ^A	18,4 \pm 2,6 ^A	21,5 \pm 4,1 ^B	23,7 \pm 4,3 ^{AB}
Largura Lobo Prostático (mm)	D	17,6 \pm 3,3 ^a	19,8 \pm 3,0 ^a	23,1 \pm 4,0 ^b	21,6 \pm 3,2 ^{ab}
	E	16,9 \pm 3,5 ^a	19,5 \pm 3,2 ^a	23,3 \pm 4,1 ^b	21,3 \pm 3,7 ^{ab}
Diâmetro total da Vesicular (mm)	D	7,7 \pm 2,0 ^A	8,1 \pm 3,2 ^A	11,7 \pm 4,7 ^A	12,2 \pm 2,1 ^A
	E	8,0 \pm 2,5 ^{AB}	7,6 \pm 3,3 ^B	11,2 \pm 3,7 ^A	9,5 \pm 2,8 ^{AB}
Diâmetro do Lúmen da Vesicular (mm)	D	2,0 \pm 2,2 ^A	2,5 \pm 3,4 ^A	5,4 \pm 5,6 ^A	6,6 \pm 4,2 ^A
	E	2,6 \pm 2,8 ^A	2,1 \pm 3,7 ^A	4,3 \pm 4,4 ^A	3,8 \pm 3,5 ^A
Altura Ampola (mm)	D	10,3 \pm 1,6 ^A	11,5 \pm 1,8 ^{AB}	13,0 \pm 2,6 ^B	17,4 \pm 3,1 ^C
	E	10,0 \pm 2,2 ^A	11,2 \pm 1,9 ^A	13,2 \pm 3,3 ^A	15,9 \pm 3,4 ^A
Lúmen Ampola (mm)	D	0,4 \pm 0,9 ^A	0,8 \pm 1,1 ^A	1,0 \pm 1,0 ^A	2,2 \pm 0,8 ^B
	E	0,3 \pm 0,8 ^A	0,6 \pm 0,9 ^A	0,8 \pm 0,7 ^A	1,7 \pm 1,0 ^A

Valores seguidos de letras diferentes (a, b, c) sobescritos na mesma linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Valores seguidos de letras diferentes (A, B) sobescritos na mesma linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste de SNK.

Animais de 2-6 anos apresentam menores tamanhos das glândulas bulbo uretrais que animais com mais de 7 anos ($P < 0,05$). A ampola do ducto deferente e o lobo prostático são outras estruturas nas quais a mensuração foi influenciada pela idade ($P < 0,05$). Poucos estudos descreveram às mensurações das glândulas acessórias em garanhões. O efeito da idade tem sido pouco discutido, mas aparentemente o desenvolvimento das glândulas acessórias seguem o desenvolvimento dos demais órgãos reprodutivos de garanhões que atingem máxima capacidade após os 5 anos (Johnson & Neaves, 1981; Berndtson & Jones, 1989).

Os valores médios de mensurações de glândulas acessórias encontrados no presente estudo encontram-se dentro das variações observados para outras raças (Pozor & McDonnell, 2002). Uma série de fatores pode influenciar nas medidas das glândulas acessórias, como: estímulo sexual (Weber et al., 1990), tamanho do animal (Pozor & McDonnell, 2002), *status* do garanhão em um sistema extensivo de harém (McDoneell & Pozor, 1995), dentre outros.

O pequeno número de estudos desperta para necessidade de maior conhecimento a respeito da mensuração das glândulas acessórias em garanhões. Mesmo sendo local de raras alterações (Little & Holyeak,

1992) a compreensão a respeito do assunto pode auxiliar clínicos na identificação e diagnósticos de problemas nestas estruturas.

O número de alterações como hidrocele testicular e torção testicular encontram-se sumariados na tabela abaixo (tabela 9).

Tabela 9: Número de casos de hidrocele e torção testicular em garanhões da raça Mangalarga Marchador nas diferentes faixas etárias.

Faixa etária	Local de alteração	Hidrocele testicular	Torção testicular
2-3 anos (n=22)	Testículo direito	0	1
	Testículo esquerdo	1	1
	Bilateral	2	1
4-6 anos (n=42)	Testículo direito	2	3
	Testículo esquerdo	0	1
	Bilateral	1	1
7-14 anos (n=32)	Testículo direito	2	0
	Testículo esquerdo	0	2
	Bilateral	0	1
+ 15 anos (n=5)	Testículo direito	0	1
	Testículo esquerdo	0	0
	Bilateral	2	0
Geral (n=101)	Testículo direito	4	5 (5%)
	Testículo esquerdo	1	4 (4%)
	Bilateral	5	3 (3%)
	TOTAL	10 (10%)	12 (12%)

Ao avaliar 27 garanhões da raça Campolina, Manso Filho *et al.* (2000), reportaram 36% de torções unilaterais e 3,7% de torções bilaterais. Tais valores de torção unilateral foram superiores ao reportado pelo presente estudo. O fato de trabalhar com uma raça diferente e de avaliar um menor número de indivíduos pode ter influenciado neste resultado.

Segundo Papa *et al.* (2011), intervenções em casos de torção testicular são recomendado apenas naqueles em que são observados comprometimento vascular e queda na qualidade seminal.

Ao avaliar 100 garanhões de 9 diferentes raças pelo exame de ultrassonografia, Pozor (2005) reportou a incidência de 5 casos de hidrocele. No presente estudo foram identificados 10 casos, no entanto

não foi observado nenhum caso de hidrocele grave, com grande acúmulo de líquido, sensibilidade dolorosa e redução no tamanho dos testículos. Todos animais diagnosticados apresentavam ao menos 60% de motilidade total e no máximo 50% de alterações morfológicas. Diversos relatos de casos de hidrocele vêm sendo reportados (Bartholomew et al., 2003; Schmitt et al., 2009), como pôde ser observado no presente estudo não são raros em garanhões. A intervenção mais adequada nos casos de hidrocele vai depender da influência desta alteração na saúde reprodutiva do animal. Medidas como: manter o animal em ambiente aberto e/ou em exercício, aplicação de gelo associada à hidroterapia, castração unilateral, uso de antiinflamatórios, diuréticos, drenagem do líquido acumulado podem ser indicadas em função do quadro do animal. O mais importante nos casos de hidrocele é buscar identificar a causa uma vez que muito dos tratamentos sugeridos são apenas paliativos (Brinsko et al., 2011). Garanhões afetados por hidrocele ou torção testicular devem ser periodicamente avaliados para verificar efeitos destas alterações nas características reprodutivas.

4.4- Conclusões:

- Os valores de biometria testicular de garanhões da raça Mangalarga Marchador se encontram dentro dos parâmetros descritos para outras raças de mesmo porte.
- Existe influência da idade na avaliação das medidas biométricas dos testículos e das glândulas acessórias de garanhões da raça Mangalarga Marchador.
- A torção e hidrocele testiculares acontecem em torno de 10 e 12% dos animais da raça Mangalarga Marchador.

5- EXPERIMENTO III: PARÂMETROS SEMINAIS DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

5.1- Objetivos:

- Descrever os seguintes parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador: aspecto, volume sem gel, volume de gel, concentração, motilidade total, motilidade progressiva, integridade de membrana plasmática, vigor, número total de espermatozoides no ejaculado, número total de espermatozoides móveis e normais, e alterações morfológicas nos espermatozoides para diferentes faixas etárias.

5.2 Material e Métodos:

5.2.1- Localização:

As avaliações foram realizadas após colheitas de sêmen entre os meses de Janeiro de 2012 e Julho de 2013 nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, Brasil. Latitudes variando entre 21.24°S e 19.91°S.

5.2.2- Animais:

Foram utilizados 107 garanhões registrados ou controlados da raça Margalarga Marchador com idade entre 2 e 21 anos. Os animais foram agrupados em quatro diferentes faixas etárias: 2-3 anos, 4-6 anos, 7-15 anos e mais de 15 anos.

5.2.3- Colheita de sêmen:

Antes do início das avaliações os garanhões que não estavam em regime de colheita de sêmen passaram por um período de três dias com duas colheitas diárias. As colheitas para avaliações eram realizadas de 48-72 horas após a última colheita do garanhão. Para colheita de sêmen utilizou-se éguas em estro devidamente contidas com peias, vagina artificial modelo Botucatú® preenchida com água aquecida a 45°C.

Devido ao fato do estudo ser realizado em propriedades particulares buscou-se em função da disponibilidade realizar duas

colheitas de cada ganhão com intervalo de uma hora para realização das avaliações.

5.2.4- Avaliação do sêmen:

Após as colheitas o sêmen foi levado ao laboratório equipado com placa aquecedora e microscópio óptico para realização das avaliações;

- Aspecto: foi avaliado após visualização da coloração do ejaculado. Foi utilizada classificação de 1-3, para os seguintes aspectos: 1- aquoso, 2- opalescente, 3- leitoso.

- Volume sem gel do ejaculado: foi avaliado em provetas de 250 mL graduadas de 2 em 2 mL, previamente aquecidas.

- Volume de gel do ejaculado: a fração gelatinosa foi separada do restante do ejaculado por meio de filtros de colheita de sêmen. Este gel retido no filtro foi então avaliado em provetas de 250 mL graduadas de 2 em 2 mL.

- Motilidade total, progressiva e vigor do sêmen fresco e diluído: as avaliações foram realizadas por técnicos experientes, pelo método de duplo cego. As lâminas eram analisadas em objetiva de 10x e 40x para estimar os parâmetros em questão. O sêmen diluído foi avaliado após diluição de 1:1 em meio comercial Botusemen[®]. Os parâmetros registrados para os ganhões foram os maiores valores médios destas variáveis dentro das análises do sêmen fresco ou logo após a diluição.

- Concentração: foi realizada pelo método de câmara de Neubauer. Para tal, dilui-se o sêmen em água destilada (taxa de diluição 1:20, quando do aspecto aquoso e 1:100 quando do aspecto opalescente ou leitoso). A contagem foi realizada sobre objetiva de 40x sendo o valor da concentração ajustado em função do número de espermatozoides e da taxa de diluição.

- Teste de integridade da membrana plasmática (supravital): foi realizada utilizando o corante eosina-nigrosina a 0,5%. Amostras de 10 µL do sêmen foram incubados com 10 µL do corante em placa aquecedora a 37°C por 3 min. Após incubação confeccionou-se um esfregaço para realização da leitura. Foram classificados como membrana íntegra os espermatozóides que não se coraram e membrana lesada àqueles que apresentaram o núcleo corado em vermelho.

- Avaliação da morfologia espermática: Uma amostra de 100 µL do sêmen foi acondicionada em tubos plásticos de 1,5 mL contendo 1,0 mL de solução de formol salino (Hancock, 1957) pré aquecido a 37°C. A análise da morfologia foi realizada por preparo de câmara úmida em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1000 x, seguindo classificação descrita por Blom (1973), onde as anormalidades foram divididas em defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais.

- Número total de espermatozoides no ejaculado (NTE): foi calculado pela multiplicação entre o volume sem gel e a concentração do ejaculado.

- Número total de espermatozoides móveis e normais no ejaculado (NTEMN): foi calculado pela multiplicação do número total de espermatozoides no ejaculado pela motilidade total e pelo percentual de espermatozoides normais no ejaculado.

5.2.5- Análise estatística:

Para as variáveis quantitativas, efetuaram-se os testes de Lilliefors com intuito de verificar normalidade de distribuição dos dados, e Cochran (números iguais de repetições dentro de cada nível) e Bartlett (números desiguais de repetições) para verificar a homogeneidade das variâncias dos grupos. Aqueles dados que não atenderam a premissa da ANOVA foram submetidos à análise não paramétrica e as médias comparadas pelos testes de Kruskal-Wallis com probabilidade de erro de 5%. As variáveis que atenderam às premissas foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro.

Foi utilizado o programa estatístico SAEG-UFV 9.1 (UFV, 2007).

4.3- Resultados e discussão:

Os resultados relativos aos parâmetros seminais (aspecto, motilidade total, motilidade progressiva, vigor, volume sem gel, volume de gel, volume total, concentração, integridade da membrana plasmática e número total de espermatozoides) de garanhões da raça Mangalarga Marchado, submetidos a duas colheitas de sêmen intervaladas de uma

hora, para as diferentes faixas etárias encontram-se sumariados na tabela 10.

Tabela 10: Média \pm desvio padrão de parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador submetidos a duas colheitas de sêmen intervaladas de uma hora e agrupados em diferentes faixas etárias.

Parâmetro	Colheita	Faixa etária				Média geral
		2-3 anos	4-6 anos	7-15 anos	+ 15 anos	
Aspecto (1-3*)	1	2,2 \pm 0,7 ^A (n=23)	2,4 \pm 0,6 ^A (n=44)	2,3 \pm 0,6 ^A (n=34)	1,8 \pm 0,8 ^A (n=6)	2,3 (n=107)
	2	1,7 \pm 0,6 ^A (n=15)	1,6 \pm 0,5 ^A (n=37)	1,7 \pm 0,6 ^A (n=30)	1,4 \pm 0,5 ^A (n=5)	1,6 (n=87)
Motilidade Total (0-100%)	1	70,4 \pm 14,8 ^A (n=23)	72,1 \pm 15,4 ^A (n=44)	76,8 \pm 7,2 ^A (n=34)	73,3 \pm 11,2 ^A (n=6)	73,3 (n=107)
	2	77,3 \pm 3,7 ^A (n=15)	75,2 \pm 6,8 ^A (n=37)	76,8 \pm 8,7 ^A (n=30)	77,0 \pm 7,6 ^A (n=5)	76,3 (n=87)
Motilidade Progressiva (0-100%)	1	61,1 \pm 17,1 ^A (n=23)	65,0 \pm 16,1 ^{AB} (n=44)	71,2 \pm 9,0 ^B (n=34)	66,7 \pm 11,7 ^{AB} (n=6)	66,2 (n=107)
	2	68,3 \pm 8,2 ^A (n=15)	68,6 \pm 9,2 ^A (n=37)	71,0 \pm 10,1 ^A (n=30)	66,0 \pm 14,7 ^A (n=5)	69,2 (n=87)
Vigor (0-5)	1	3,2 \pm 0,6 ^A (n=23)	3,4 \pm 0,6 ^{AB} (n=44)	3,6 \pm 0,5 ^B (n=34)	3,4 \pm 0,4 ^{AB} (n=6)	3,4 (n=107)
	2	3,2 \pm 0,6 ^A (n=15)	3,4 \pm 0,4 ^{AB} (n=37)	3,6 \pm 0,5 ^B (n=30)	3,6 \pm 0,4 ^{AB} (n=5)	3,4 (n=87)
Volume sem gel (mL)	1	36,9 \pm 26,1 ^A (n=23)	45,9 \pm 24,1 ^A (n=44)	61,2 \pm 30,5 ^A (n=34)	64,5 \pm 19,1 ^A (n=6)	49,9 (n=107)
	2	31,6 \pm 23,4 ^A (n=15)	30,6 \pm 14,3 ^A (n=37)	45,5 \pm 28,0 ^A (n=30)	80,0 \pm 89,8 ^B (n=5)	38,7 (n=87)
Volume de gel (mL)	1	1,1 \pm 2,4 ^A (n=23)	7,6 \pm 12,9 ^A (n=44)	21,2 \pm 45,1 ^A (n=34)	23,7 \pm 30,8 ^A (n=6)	11,4 (n=107)
	2	3,1 \pm 5,7 ^A (n=15)	2,9 \pm 5,9 ^A (n=37)	7,2 \pm 19,9 ^A (n=30)	4,4 \pm 4,3 ^A (n=5)	4,5 (n=87)
Volume total (mL)	1	37,9 \pm 26,2 ^A (n=23)	53,5 \pm 29,9 ^{AB} (n=44)	82,5 \pm 50,3 ^B (n=34)	88,2 \pm 40,1 ^B (n=6)	61,3 (n=107)
	2	34,7 \pm 23,3 ^A (n=15)	33,5 \pm 18,2 ^A (n=37)	52,7 \pm 34,4 ^A (n=30)	84,4 \pm 87,5 ^B (n=5)	43,2 (n=87)
Concentração (x 10 ⁶ spztz./mL)	1	153,3 \pm 106,6 ^A (n=23)	177,3 \pm 117,5 ^A (n=44)	152,0 \pm 97,9 ^A (n=34)	93,7 \pm 70,4 ^A (n=6)	159,4 (n=107)
	2	81,9 \pm 50,2 ^A (n=15)	75,7 \pm 51,9 ^A (n=37)	76,8 \pm 52,5 ^A (n=30)	38,4 \pm 28,6 ^A (n=5)	75,0 (n=87)
Membrana íntegra (0-100%)	1	71,3 \pm 14,3 ^a (n=23)	74,0 \pm 11,0 ^a (n=44)	73,2 \pm 12,0 ^a (n=34)	67,3 \pm 13,0 ^a (n=6)	72,8 (n=107)
	2	70,7 \pm 7,7 ^A (n=15)	75,7 \pm 7,2 ^A (n=37)	73,9 \pm 10,8 ^A (n=30)	70,8 \pm 14,9 ^A (n=5)	73,9 (n=87)
Número total de espermatozoides (x10 ⁹)	1	5,0 \pm 4,0 ^A (n=23)	6,9 \pm 4,9 ^{AB} (n=44)	8,2 \pm 4,4 ^B (n=34)	5,0 \pm 2,0 ^{AB} (n=6)	6,8 (n=107)
	2	2,3 \pm 2,0 ^{AB} (n=15)	2,0 \pm 1,3 ^A (n=37)	3,0 \pm 1,7 ^B (n=30)	1,5 \pm 0,5 ^{AB} (n=5)	2,4 (n=87)

* Aspectos: 1- Aquoso, 2- Opalescente, 3- Leitoso.

Valores seguidos de letras diferentes (a, b, c) sobescritos na mesma linha diferem (P<0,05) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Valores seguidos de letras diferentes (A, B) sobescritos na mesma linha diferem (P<0,05) pelo teste de SNK.

Não foram observadas diferenças (P>0.05) entre as médias dos parâmetros: aspecto, motilidade total, volume de gel, concentração e membrana íntegra em função das diferentes faixas etárias.

Os valores médios de motilidade total foram semelhantes aos descritos para raças como Thoroughbred, Shetland, Appaloosa, Ponei, Palomino e Quarto de Milha que foram respectivamente, 71, 70, 73, 70,

74%. Foram inferiores aos valores médios descritos para as raças Árabe e Standardbred, respectivamente, 85 e 79% (Dowsett & Knott, 1996).

Os valores de motilidade progressiva observados no presente estudo encontram-se dentro das médias descritas por Parlevliet *et al.* (1994) para garanhões da raça Dutch Warmblood (68%).

A variável volume total apresentou médias maiores ($P < 0,05$) para animais acima de 7 anos quando comparado com animais de 2-3 anos na primeira colheita. O número total de espermatozoides foi maior para animais com idade entre 7-15 anos que animais de 2-3 anos. Dowsett & Knott (1996) relataram maior produção espermática para animais com idade entre 4-6 anos. Estes mesmos autores encontraram volume total médio inferior para animais com idade acima de 14 anos (35,3 mL).

A variável volume de gel no ejaculado mostrou grande variação para animais da raça Mangalarga Marchador (0-200 mL). Das 194 colheitas realizadas, 60% não houve liberação da fração gelatinosa no ejaculado. Animais que produzem grande volume de gel no ejaculado apresentam dificuldade na manipulação do sêmen. O filtro acoplado ao copo coletor que possui a função de separar a fração gelatinosa não se mostrou eficiente em manter sua funcionalidade com grande volume de fração gelatinosa. Nos animais com grande volume de gel (acima de 100 mL) a fração não gelatinosa pode se misturar com o volume de gel, pendendo-se boa parte de espermatozoides ou toda fração não gelatinosa na tentativa de separar estas frações com auxílio de seringa. Para estes animais se mostra interessante a realização de colheita fracionada, desta forma, a fração gelatinosa pode ser separada ao selecionar apenas as primeiras frações do ejaculado. Esta colheita fracionada pode ser realizada utilizando vagina artificial modelo fechado, após as três primeiras contrações ejaculatórias as demais frações do ejaculado podem ser retidas posicionando uma das mãos entre o copo coletor e o tubo rígido da vagina artificial (na porção externa da mucosa plástica). Tal metodologia viabilizou o processamento de sêmen de alguns garanhões que apresentavam tais características.

O número total de espermatozoides produzidos por garanhões da raça Mangalarga Marchador apresentou-se diferente ($P < 0,05$) para as

classes de idade avaliadas. Animais de 7-15 anos apresentam maior produção de espermatozoides que animais de 2-3 anos. Segundo Hess & Roser (2005), a puberdade em garanhões ocorre entre 10 e 24 meses e a fase que se segue que é a de maturação sexual ocorre de 2-5 anos. Animais de 2-3 anos encontram-se em fase de desenvolvimento dos aspectos reprodutivos, fato que resulta em uma menor produção de espermatozoides por animais nesta faixa etária.

O número total de espermatozoides produzidos pelos animais no presente estudo (6,8 bilhões) encontram-se acima dos valores descritos para outras raças de mesmo porte, como: Thoroughbred, Standardbred, Quarto de milha e Appaloosa (5,0; 4,7; 5,4; 3,3). Encontra-se abaixo dos valores descritos para raça Árabe (12,7) (Dowsett & Knott, 1996).

Tabela 11: Média \pm desvio padrão dos defeitos morfológicos e número total de espermatozoides móveis e normais no ejaculado (TSMN) de garanhões da raça Mangalarga Marchador para diferentes faixas etárias.

Parâmetro	Colheita	Faixa etária				Média geral
		2-3 anos	4-6 anos	7-15 anos	+ 15 anos	
Defeitos maiores (%)	1	24,9 \pm 12,1 ^A (n=23)	21,4 \pm 14,0 ^A (n=44)	16,4 \pm 8,0 ^A (n=34)	22,0 \pm 8,3 ^A (n=6)	20,6 (n=107)
	2	19,9 \pm 8,1 ^A (n=15)	17,7 \pm 10,7 ^A (n=37)	15,4 \pm 9,2 ^A (n=29)	21,6 \pm 8,6 ^A (n=5)	17,6 (n=86)
Defeitos menores (%)	1	5,2 \pm 4,2 ^A (n=23)	7,3 \pm 5,6 ^A (n=44)	5,4 \pm 3,6 ^A (n=34)	5,7 \pm 3,3 ^A (n=6)	6,2 (n=107)
	2	5,5 \pm 3,7 ^A (n=15)	5,9 \pm 4,1 ^A (n=37)	5,6 \pm 4,3 ^A (n=29)	5,2 \pm 1,6 ^A (n=5)	5,7 (n=86)
Defeitos totais (%)	1	30,1 \pm 14,6 ^A (n=23)	28,7 \pm 17,5 ^A (n=37)	21,5 \pm 9,9 ^A (n=34)	27,7 \pm 8,9 ^A (n=6)	26,8 (n=107)
	2	25,4 \pm 8,9 ^A (n=15)	23,6 \pm 12,9 ^A (n=37)	20,8 \pm 9,9 ^A (n=29)	26,8 \pm 9,2 ^A (n=5)	23,2 (n=86)
TSMN* (x10 ⁹)	1	2,8 \pm 2,4 ^A (n=23)	3,6 \pm 2,1 ^A (n=44)	5,4 \pm 3,6 ^B (n=33)	2,7 \pm 1,6 ^{AB} (n=6)	4,0 (n=107)
	2	1,3 \pm 1,1 ^{AB} (n=15)	1,2 \pm 0,8 ^B (n=37)	2,0 \pm 1,3 ^A (n=29)	0,9 \pm 0,3 ^{AB} (n=5)	1,4 (n=86)

Valores seguidos de letras diferentes (A, B) sobscritos na mesma linha diferem (P<0,05) pelo teste de SNK.

Não foi observado diferença (P>0,05) entre defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais para as diferentes faixas etárias de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

Os valores médios de espermatozoides normais encontrados no presente estudo (73,2%) corroboram o apresentado para outras raças, como: Swedish Warmblood (72,7%) (Einarsson et al., 2009) e Estonian

breed (74,4%) (Kavak et al., 2004). Tais valores encontram-se acima dos valores descritos para outras raças: Quarto de milha (68,1%), Apalosa (65,6%), Palomino (41,1%) (Dowsett & Knott, 1996).

A quantidade de espermatozoides móveis e normais encontram-se abaixo dos valores descritos para raça Dutch Warmblood que obteve valores próximos a 5,0 bilhões de espermatozoides (Parlevliet et al., 1994). Paccamonti *et al.* (1998) relatavam valores médios de 1,7 bilhões de espermatozoides móveis e normais para animais da raça Ponei, valores médios abaixo dos encontrados no presente estudo. Os valores médios observados para animais da raça Mangalarga Marchador (4,7 bilhões) encontram-se dentro dos padrões exigidos pela Society For Theriogenology que seria de dois bilhões de espermatozoides com motilidade progressiva e normais obtidos em duas colheitas de sêmen intervaladas de uma hora (citado por: Sieme, 2009).

Os parâmetros seminais vão sofrer influência de uma série de fatores, como: idade, frequência de colheitas, volume testicular, condições patológicas, nutrição, método e estímulos durante a colheita, estação do ano e raça (Bielanski & Kaczmariski, 1979; Voss *et al.*, 1981; Dowsett & Pattie, 1987; Jannet *et al.*, 2003; Sieme *et al.*, 2004; Turner, 2005; Sieme, 2009). A falta de padrão nas metodologias adotadas para avaliar os parâmetros seminais das diferentes raças limitam a precisão na comparação de resultados. No presente estudo buscou-se determinar tais padrões para animais em regime de colheita de sêmen possuindo intervalo entre última colheita máximo de 72 horas. Este modelo foi adotado em função de se tratar da forma como garanhões são manejados na maior parte dos programas de reprodução no Brasil que é de três colheitas semanais.

Desta forma, como apresentado, o efeito da raça em algumas das características seminais é evidente. O desenvolvimento de estudos amplos que avaliem as características seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador podem contribuir, somado ao estudo de Vale (1976), para maior compreensão e avaliação dos animais desta importante raça.

5.4- Conclusões:

- Características seminais como: motilidade progressiva, vigor, volume total do ejaculado e número total de espermatozoides viáveis de garanhões da raça Mangalarga Marchador possuem efeito de idade em suas quantidades.
- Garanhões que produzem volume de gel acima de 100 mL devem passar por método de colheita fracionado para viabilizar a manipulação do sêmen e reduzir a perda de espermatozoides.
- Em média garanhões da raça Mangalarga Marchador ejaculam quatro bilhões de espermatozoides móveis e normais.

6- EXPERIMENTO IV: RESISTÊNCIA AO REFRIGERAMENTO E CONGELAMENTO DE SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

6.1- Objetivos:

- Descrever a resistência do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador ao armazenamento por 12 horas a 15°C.
- Descrever a resistência do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador ao armazenamento por 24 horas a 5°C.
- Descrever os parâmetros físicos do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador após congelamento e descongelamento.

6.2 Material e Métodos:

6.2.1- Localização:

As avaliações foram realizadas após colheitas de sêmen entre os meses de Janeiro de 2012 e Julho de 2013 nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, Brasil. Latitudes variando entre 21.24°S e 19.91°S.

6.2.2- Animais:

Foram utilizados 94 garanhões registrados ou controlados da raça Mangalarga Marchador com idade entre 2 e 21 anos. Os animais foram agrupados em quatro diferentes faixas etárias: 2-3 anos, 4-6 anos, 7-15 anos e mais de 15 anos.

6.2.3- Colheita de sêmen:

Antes do início das avaliações os garanhões que não estavam em regime de colheita de sêmen passaram por um período de três dias com duas colheitas diárias. As colheitas para avaliações eram realizadas de 48-72 horas após a última colheita do garanhão. Para colheita de sêmen utilizou-se éguas em estro devidamente contidas com peias, vagina artificial modelo Botucatú® preenchida com água aquecida a 45°C.

Devido ao fato do estudo ser realizado em propriedades particulares buscou-se em função da disponibilidade realizar duas

colheitas de cada garanhão com intervalo de uma hora para realização das avaliações.

6.2.4- Processamento do sêmen refrigerado:

Após a colheita o ejaculado foi diluído na proporção de 1:1 com diluidor a base de leite em pó (Botusemen[®]) até que fosse determinada a concentração. A concentração foi determinada pelo método de câmara de Neubauer. Para ejaculados com concentração acima de 70×10^6 spz/mL, foi retirado volume suficiente para uma dose de 1 bilhão de espermatozoides totais. Este volume teve a concentração reajustada entre $25-50 \times 10^6$ espermatozóides por mL na menor proporção de diluidor:sêmen (2:1 a 9:1) para trabalhar neste intervalo de concentração (tabela 12). Amostras que possuíam concentração abaixo de 70×10^6 spz/mL foram centrifugada (600 g/10 min.), tinham o sobrenadante descartado, o *pellet* era resuspendido com Botusêmen[®], retirava-se a dose de 1 bilhão de espermatozoides totais e a concentração era determinada e reajustada entre 25-50 milhões de espermatozoides por mL.

Tabela 12: Concentração espermática e taxa de diluição proporcional para ajuste da concentração do sêmen a ser refrigerado.

Concentração ($\times 10^6$ espermatozoides por mL)	Proporção diluidor:sêmen
<7 0	Centrifugação
70-150	2:1
151-200	3:1
201-250	4:1
251-300	5:1
301-350	6:1

O sêmen foi então acondicionado em bisnagas plásticas estéreis, teve o ar retirado e o volume ajustado em outro frasco com água a temperatura ambiente para 150 a 200 mL. Uma dose preparada foi refrigerada a 15°C/12 horas e outra dose a 5°C/24horas em container comercial (Botuflex[®]) para posteriores análises.

6.2.4.1- Análise do sêmen refrigerado:

Antes das análises o sêmen refrigerado foi reaquecido em banho maria a 37°C por 5 minutos. Foram realizadas as seguintes análises deste sêmen:

- Motilidade total, progressiva e vigor: as avaliações foram realizadas por técnicos experientes, pelo método de duplo cego. As lâminas eram analisadas em microscópio óptico nas objetivas de 10x e 40x para estimar os parâmetros em questão. As lâminas, lamínulas e ponteiras foram pré aquecidas em placa aquecedora.

- Teste de integridade da membrana plasmática (supravital): foi realizada utilizando o corante eosina-nigrosina a 0,5%. Amostras de 10 µL do sêmen foram incubados com 10 µL do corante em placa aquecedora a 37°C por 3 minutos. Após incubação confeccionou-se um esfregaço para realização da leitura. Foram classificados como vivos os espermatozóides que não se coraram e como mortos àqueles que apresentaram o núcleo corado em vermelho.

6.2.5- Processamento do sêmen para congelamento:

Após diluição do sêmen fresco na proporção de 1:1 com diluidor comercial (Botusemen[®]) o sêmen era avaliado. Apenas ejaculados com motilidade total acima de 40% foram submetidos ao processamento para congelamento.

O sêmen diluído foi então acondicionado em tubos cônicos de 15 mL sendo submetidos ao processo de centrifugação (600 g/10min.). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de espermatozoides resuspendido com diluidor de congelamento comercial (Botucrio[®]). A concentração foi determinada pelo método de câmara de Neubauer e reajustada para 200 x 10⁶ espermatozóides/mL. As amostras foram envazadas em palhetas de 0,5 mL, colocadas na rampa de congelamento e submetidos ao processo de refrigeração em geladeira comercial (conservadora Minitube[®]) por 20 minutos. Após este período a rampa contendo as palhetas foram então transferidas para caixa de isopor que continha 5 cm de nitrogênio líquido. A rampa de congelamento possuía uma base de isopor que mantinha as palhetas a 6 cm do nível do nitrogênio, neste recipiente as amostras eram mantidas por mais 20 minutos. Posteriormente as palhetas foram

mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão de nitrogênio para posteriores análises.

6.2.5.1- *Análise do sêmen congelado:*

Cada amostra foi descongelada em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Diluiu-se 100 µL de sêmen em 200 µL de Botucrio® (pré-aquecido a 37°C) em *tubos plásticos*. As leituras foram realizadas em aparelho IVOS-Ultimate® da Hamilton-Thorn Bioscience, sendo utilizado o programa *Animal Motility* para análise dos dados. O aparelho foi previamente ajustado para análise do sêmen equino, nas configurações que se seguem no anexo 1. As características de movimento espermático analisadas foram: motilidade total (MOT, %) motilidade progressiva (PROG, %), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimentos flagelares (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). Os exames foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus Pirassununga-SP.

6.2.6- *Análise estatística:*

Para as variáveis quantitativas, efetuaram-se os testes de Lilliefors com intuito de verificar normalidade de distribuição dos dados, e Cochran (números iguais de repetições dentro de cada nível) e Bartlett (números desiguais de repetições) para verificar a homogeneidade das variâncias dos grupos. Aqueles dados que não atenderam a premissa da ANOVA foram submetidos à análise não paramétrica e as médias comparadas pelos testes de Kruskal-Wallis com probabilidade de erro de 5%. As variáveis que atenderam às premissas foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro.

Foi utilizado o programa estatístico SAEG-UFV 9.1 (UFV, 2007).

6.3- Resultados e discussão:

As médias relativas à resistência aos diferentes protocolos de refrigeração encontram-se sumariadas na tabela 13 abaixo:

Tabela 13: Médias \pm desvios padrão das médias para os parâmetros seminais analisados do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador submetidos ao refrigeração (15°C/12 horas e 5°C/24 horas) divididos em diferentes faixas etárias.

Parâmetro	Colheita	Faixa etária				Média
		2-3 anos	4-6 anos	7-15 anos	+ 15 anos	
Motilidade Total (%)	R12	65,6 \pm 12,0 ^A (n=17)	63,6 \pm 16,1 ^A (n=25)	66,0 \pm 11,5 ^A (n=25)	58,7 \pm 14,4 ^A (n=4)	64,4
	R24	57,2 \pm 18,5 ^A (n=18)	60,3 \pm 13,8 ^A (n=29)	60,8 \pm 15,4 ^A (n=25)	54,0 \pm 20,1 ^A (n=5)	59,3
Motilidade Progressiva (%)	R12	57,4 \pm 15,0 ^A (n=17)	54,6 \pm 19,3 ^A (n=25)	57,4 \pm 14,4 ^A (n=25)	51,2 \pm 15,5 ^A (n=4)	56,1
	R24	50,3 \pm 19,6 ^A (n=18)	53,4 \pm 14,4 ^A (n=29)	54,2 \pm 16,6 ^A (n=25)	47,0 \pm 23,9 ^A (n=5)	52,5
Vigor (0-5)	R12	3,2 \pm 0,5 ^A (n=17)	3,1 \pm 0,7 ^A (n=25)	3,2 \pm 0,5 ^A (n=25)	3,0 \pm 0,7 ^A (n=4)	3,2
	R24	2,7 \pm 0,6 ^A (n=18)	2,8 \pm 0,5 ^A (n=29)	3,0 \pm 0,5 ^A (n=25)	2,4 \pm 0,7 ^A (n=5)	2,8
SV (%)	R12	69,2 \pm 13,9 (n=17)	71,0 \pm 12,7 (n=25)	70,2 \pm 12,1 (n=25)	73,2 \pm 10,8 (n=4)	70,4
	R24	67,5 \pm 9,8 ^a (n=18)	66,9 \pm 10,6 ^a (n=29)	67,5 \pm 11,3 ^a (n=25)	65,8 \pm 12,2 ^a (n=5)	67,2
QMT (%)	R12	12,9 \pm 9,7 ^A (n=17)	11,2 \pm 12,8 ^A (n=25)	11,4 \pm 10,9 ^A (n=25)	15,0 \pm 15,8 ^A (n=4)	11,9
	R24	18,9 \pm 16,4 ^A (n=18)	14,5 \pm 11,1 ^A (n=29)	16,2 \pm 12,9 ^A (n=25)	24,0 \pm 16,4 ^A (n=5)	16,7
QMP (%)	R12	14,1 \pm 11,5 ^A (n=17)	13,6 \pm 14,7 ^A (n=25)	13,2 \pm 13,2 ^A (n=25)	13,7 \pm 17,0 ^A (n=4)	13,6
	R24	17,2 \pm 18,1 ^A (n=18)	15,3 \pm 12,2 ^A (n=29)	17,2 \pm 15,1 ^A (n=25)	24,0 \pm 21,0 ^A (n=5)	16,9
Queda vigor (0-5)	R12	0,4 \pm 0,3 ^A (n=17)	0,5 \pm 0,6 ^A (n=25)	0,6 \pm 0,5 ^A (n=25)	0,1 \pm 0,2 ^A (n=4)	0,5
	R24	0,7 \pm 0,5 ^A (n=18)	0,7 \pm 0,6 ^A (n=29)	0,8 \pm 0,5 ^A (n=25)	1,4 \pm 0,7 ^A (n=5)	0,8

SV: Integridade da membrana plasmática, QMT: queda na motilidade total, QMP: queda na motilidade progressiva.

Valores seguidos de letras diferentes (a, b, c) sobescritos na mesma linha diferem (P<0,05) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Valores seguidos de letras diferentes (A, B) sobescritos na mesma linha diferem (P<0,05) pelo teste de SNK.

Não foram observadas diferenças (P>0,05) entre os parâmetros de sêmen refrigerado avaliados frente às diferentes faixas etárias.

Os parâmetros médios observados encontram-se dentro do recomendado pela *World Breeding Federation for Sport Horses* (WBFSH, 2014), todos os grupos apresentaram valores médios de motilidade progressiva acima de 35%. Dos animais avaliados no presente estudo, 11% (8/71) e 13% (10/77) apresentavam parâmetros inferiores ao

recomendado pela WBFSH para o sêmen refrigerado por 12 e 24 horas, respectivamente.

Darenius (1998) sugere que para gananhões serem utilizados em programa de IA com sêmen refrigerado, após submetidos ao refrigeração por 12 horas, deveriam apresentar uma redução na motilidade inicial não superior a 30% e uma motilidade final mínima de 40%. Valores médios que se adequam a estes foram obtidos para gananhões da raça Mangalarga Marchador (QMT média: 11,9%, MP final: 56,1%).

Brisko *et al.* (2000) ao classificar gananhões quanto a resistência ao procedimento de refrigeração de sêmen por 24 horas, cita dois grupos: alta e baixa qualidade. Animais de baixa qualidade são aqueles que apresentam redução superior a 40% na motilidade progressiva. Apesar do valor médio de queda no parâmetro MP para gananhões da raça Mangalarga Marchador ser de 16,7% a variação de queda neste parâmetro foi de 0-65%. Ou seja, apesar da média de queda na MT apresentar dentro do intervalo de animais tidos como refrigeradores de sêmen de boa qualidade, existem indivíduos que não apresentaram resultados satisfatórios através da metodologia adotada no presente estudo.

Ao avaliar oito ejaculados de quatro gananhões (raça västerbo steri) submetidos ao processamento para refrigeração por 24 horas, Morrell *et al.* (2009) observaram valores médios inferiores à motilidade observadas no presente estudo para avaliações subjetiva (MT:31%) e para avaliação no CASA (MT:33,3; MP:9,7). Após processamento em gradiente de centrifugação para seleção espermática (Androcoll-E[®]) os parâmetros avaliados no CASA aumentaram para MT:61,7 e MP:49,8.

Ao avaliar parâmetros físicos do sêmen refrigerado a 5 C°/24 horas (container: Botutainer[®]) de oito gananhões de diferentes raças pelo sistema CASA, Monteiro *et al.* (2013) encontraram os seguintes parâmetros para sêmen colhido por vagina artificial: MT:60,2% e MP:30,8%. Os valores de motilidade total encontram-se próximo dos observados no presente estudo. Estes mesmos autores relataram percentual de integridade de membrana plasmática abaixo dos valores

médios do presente estudo (43,1%). Para esta análise os autores trabalharam com metodologia de sondas fluorescentes.

Em levantamento de dados de programa comercial realizados por Heckenbichler *et al.* (2011) foram avaliadas 211 amostras de sêmen refrigerado de 67 garanhões. A temperatura média do sêmen relatada foi de 9,8 graus. Após avaliação computadorizada do movimento espermático relatou-se MT média de 83% e MP média de 58,6%. Estes valores encontram-se acima do relatado no presente estudo, no entanto, a não informação do tempo de armazenamento limita comparações entre os resultados.

Papa *et al.* (2014) relataram valores médios de MT e MP respectivamente, 60,5% e 33,8% para amostras de 8 garanhões refrigeradas a 5°C por 24 horas. Tais valores encontram-se abaixo do encontrado no presente estudo para garanhões da raça Mangalarga Marchador. A metodologia foi semelhante a do presente estudo, no entanto, não foi citada a raça dos animais avaliados.

Os valores médios e desvio padrão das características físicas do sêmen congelado de garanhões da raça Mangalarga Marchador encontrados no presente estudo encontram-se sumariadas na tabela abaixo (tabela 14):

Tabela 14: Médias \pm desvio padrão da média para características físicas do sêmen congelado de garanhões da raça Mangalarga Marchador para diferentes faixas etárias.

Parâmetro	Colheita	Faixa etária				Média
		2-3 anos	4-6 anos	7-15 anos	+ 15 anos	
Motilidade total (%)	1	58,0 \pm 21,2 ^a (n=17)	62,5 \pm 13,6 ^a (n=38)	63,1 \pm 17,4 ^a (n=29)	45,6 \pm 13,6 ^a (n=5)	60,9
	2	67,2 \pm 14,3 ^A (n=12)	62,9 \pm 14,1 ^A (n=32)	59,5 \pm 21,4 ^A (n=31)	42,0 \pm 21,3 ^A (n=3)	61,4
Motilidade progressiva (%)	1	41,7 \pm 17,2 ^a (n=17)	45,3 \pm 13,0 ^a (n=38)	45,3 \pm 15,1 ^a (n=29)	30,4 \pm 10,4 ^a (n=5)	43,8
	2	50,2 \pm 12,1 ^a (n=12)	45,2 \pm 12,8 ^a (n=32)	43,1 \pm 17,1 ^a (n=31)	29,3 \pm 17,6 ^a (n=3)	44,5
VAP (μ /s)	1	77,6 \pm 12,5 ^a (n=17)	77,1 \pm 9,2 ^a (n=38)	80,0 \pm 10,8 ^a (n=29)	71,9 \pm 10,5 ^a (n=5)	77,6
	2	79,5 \pm 11,4 ^a (n=12)	77,7 \pm 10,3 ^a (n=32)	80,1 \pm 11,8 ^a (n=31)	76,6 \pm 14,8 ^a (n=3)	79,1
VSL (μ /s)	1	66,2 \pm 16,9 ^A (n=17)	65,3 \pm 8,8 ^A (n=38)	67,1 \pm 8,8 ^A (n=29)	59,9 \pm 8,1 ^A (n=5)	66,2
	2	67,6 \pm 8,4 ^A (n=12)	65,7 \pm 9,1 ^A (n=35)	68,0 \pm 9,8 ^A (n=31)	65,2 \pm 12,0 ^A (n=3)	66,9
VCL (μ /s)	1	144,8 \pm 39,0 ^A (n=17)	143,4 \pm 14,3 ^A (n=38)	149,9 \pm 17,3 ^A (n=29)	142,5 \pm 13,6 ^A (n=5)	144,9
	2	146,4 \pm 18,9 ^A (n=12)	143,5 \pm 15,8 ^A (n=32)	150,8 \pm 18,2 ^A (n=31)	150,8 \pm 28,9 ^A (n=3)	147,1
ALH (μ m)	1	8,2 \pm 7,9 ^A (n=17)	6,1 \pm 0,7 ^A (n=38)	6,3 \pm 0,8 ^A (n=29)	6,4 \pm 0,5 ^A (n=5)	6,6
	2	6,1 \pm 0,7 ^A (n=12)	6,0 \pm 0,6 ^A (n=32)	6,3 \pm 0,8 ^A (n=31)	6,5 \pm 1,0 ^A (n=3)	6,1
BCF (Hz)	1	35,9 \pm 12,8 ^A (n=17)	32,0 \pm 4,1 ^A (n=38)	32,3 \pm 4,3 ^A (n=29)	35,6 \pm 1,8 ^A (n=5)	33,1
	2	34,5 \pm 2,9 ^A (n=12)	32,3 \pm 4,8 ^A (n=32)	32,8 \pm 5,0 ^A (n=31)	34,8 \pm 1,7 ^A (n=3)	33,0
STR (%)	1	80,3 \pm 10,3 ^A (n=17)	83,9 \pm 3,2 ^A (n=38)	83,7 \pm 3,1 ^A (n=29)	82,8 \pm 2,8 ^A (n=5)	83,1
	2	84,6 \pm 2,9 ^A (n=12)	83,7 \pm 2,9 ^A (n=32)	83,7 \pm 2,9 ^A (n=31)	84,0 \pm 1,0 ^A (n=3)	83,9
LIN (%)	1	44,8 \pm 3,4 ^A (n=17)	46,8 \pm 5,7 ^A (n=38)	45,9 \pm 4,6 ^A (n=29)	43,4 \pm 2,3 ^A (n=5)	45,9
	2	47,4 \pm 3,7 ^A (n=12)	46,9 \pm 4,6 ^A (n=32)	46,1 \pm 4,6 ^A (n=31)	43,7 \pm 0,6 ^A (n=3)	46,6

Valores seguidos de letras diferentes (a, b, c) sobescritos na mesma linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Valores seguidos de letras diferentes (A, B) sobescritos na mesma linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste de SNK.

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os parâmetros analisados para o sêmen congelado frente às diferentes faixas etárias.

Foram observadas correlações positivas para os dois congelamentos (duas colheitas) do mesmo garanhão ($n=73$) da forma como se segue: MT ($r=0,70$), MP ($r=0,75$), LIN ($r=0,78$), VAP ($r=0,73$). Não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$) entre congelamentos de um mesmo garanhão. Tais resultados ilustram a baixa variação entre congelamentos de um mesmo animal através da metodologia utilizada.

Os parâmetros médios observados encontram-se dentro do recomendado pela *World Breeding Federation for Sport Horses* (WBFSH, 2014), todos os grupos apresentaram valores médios de motilidade progressiva acima de 35%. Dos 94 garanhões submetidos ao congelamento 73% encontram-se dentro dos parâmetros recomendados pela entidade supracitada.

Os parâmetros médios encontram-se dentro dos parâmetros recomendados por Papa *et al.* (2011) para que uma dose de sêmen congelado esteja apta para (motilidade total $\geq 50\%$). Dos animais avaliados no presente estudo 77% encontram-se aptos ao trabalho com sêmen congelado segundo aos parâmetros recomendados por estes autores.

Em amplo levantamento realizado para raça Pura Sangue Vidament (2005) relatou motilidade total e progressiva média de 50% e 38,7% (5606 ejaculados), valor ligeiramente inferior aos valores médios observado no presente estudo. Ao selecionar garanhões para uso em programa de inseminação artificial com sêmen congelado o autor definiu como limiar 35% de espermatozoides com motilidade rápida (maior que 30 $\mu\text{m/s}$). Por este método de seleção dos garanhões 5, 4, 5, 21 e 64% possuíram congelabilidade entre 0-10, 10-33, 33-60, 60-90 e acima de 90%, respectivamente.

Ao avaliar a congelabilidade do sêmen de cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador Fagundes *et al.* (2010) reportaram os seguintes parâmetros médios: MT:31,6%, MP:19,8%, VAP: 55,9, VSL: 44,3, VCL:92,0, ALH:5,2, BCF:22,3, STR:78,3 e LIN:45,2. Tais parâmetros se apresentam abaixo do relatado no presente estudo. Diferenças na metodologia, dos animais e no meio de congelamento utilizado podem explicar tais resultados.

Ao avaliar diferentes diluidores de congelamento para 8 garanhões de raças leves, Salazar Jr. *et al.* (2011) obteve os seguintes resultados para o melhor diluidor avaliado: MT:40, MP:14%, VAP: 69, VSL:55, VCL: 137, LIN:42. Além de trabalhar com raças diferentes o presente autor utilizou metodologia de congelamento diferente da realizada no presente estudo, fatos que podem justificar os resultados inferiores obtidos.

Durante avaliação do efeito de diferentes formas (palhetas de 0,5 e 0,25 mL) de armazenamento do sêmen de 4 gananhões (Árabe, Westfallen, Hanoveriano e Mangalarga Marchador), Maziero *et al.* (2013) relatou os seguintes resultados para amostras congeladas em palhetas de 0,5 mL: MT:71,1, PM:30,9, VAP: 96,5, VSL: 75,7, VCL:178. Tais resultados se aproximaram das médias reladas no presente estudo, sendo observado resultado médio superior de MT e inferior de MP. Estes autores trabalharam com metodologia semelhante de criopreservação à realizada no presente estudo. A única diferença foi a utilização de um sistema automatizado de congelamento. A proximidade dos resultados corrobora os achados de (Vita, 2008) que não observou diferença para congelamentos realizados em sistemas automatizados e métodos manuais como realizado no presente estudo.

Avaliando o uso de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para criopreservar o sêmen de 4 gananhões (árabe, pônei e sela francesa) Rodgers *et al.* (2014) obtiveram os seguintes resultados para o grupo controle: MT: 72%, MP:39%, VAP: 53,6, VSL:45,4, VCL:95,6, ALH:4,8. Os resultados de motilidade foram próximos aos obtidos no presente estudo, os valores de velocidade e ALH foram inferiores aos observados para gananhões da raça Mangalarga Marchador.

No presente estudo, 17, 47, 34 e 3% dos congelamentos realizados apresentavam, respectivamente, 0-30%, 30-50%, 50-75%, acima de 75% valores de motilidade progressiva. Ainda, 5, 19, 55 e 20% apresentavam entre 0-30%, 30-50%, 50-75% e acima de 75% de motilidade total. Tais resultados ilustram que apesar de haver variações na congelabilidade dentro dos indivíduos na raça Mangalarga Marchador, a maior parte dos animais apresentam parâmetros compatíveis com limites definidos por uma série de autores para se trabalhar com o sêmen congelado.

Apesar de não ser observada diferença estatística entre as diferentes faixas etárias avaliadas quanto a resistência à criopreservação, os valores médios de motilidade total e progressiva da faixa etária acima de 15 anos foram ao menos 11,7% inferiores aos das outras faixas etárias. O pequeno número de observações neste grupo podem ter influenciado na não observação de diferença entre este grupo e os

demais avaliados. Novos estudos devem ser conduzidos buscando verificar o efeito da idade acima de 15 anos na resistência ao processo de criopreservação.

A escassa literatura com estudos amplos a respeito dos parâmetros seminais de ejaculados de diferentes raças submetidos ao refrigeração e congelamento, associado a grande variação nas metodologias de congelamento, limitam maiores discussões a respeito do efeito da raça na resistência às diferentes modalidades de armazenamento espermático.

6.4- Conclusões:

- Não existe efeito de idade na resistência ao refrigeração de sêmen para garanhões da raça Mangalarga Marchador.
- A maior parte dos garanhões da raça Mangalarga Marchador resistem de forma satisfatória ao refrigeração do sêmen por 12 horas a 15°C (89%) e 24 horas a 5°C (87%).
- Não existe efeito de idade na resistência ao congelamento de sêmen para garanhões da raça Mangalarga Marchador.
- A maior parte dos garanhões da raça Mangalarga Marchador (73%) resistem de forma satisfatória ao congelamento de sêmen.

FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL:

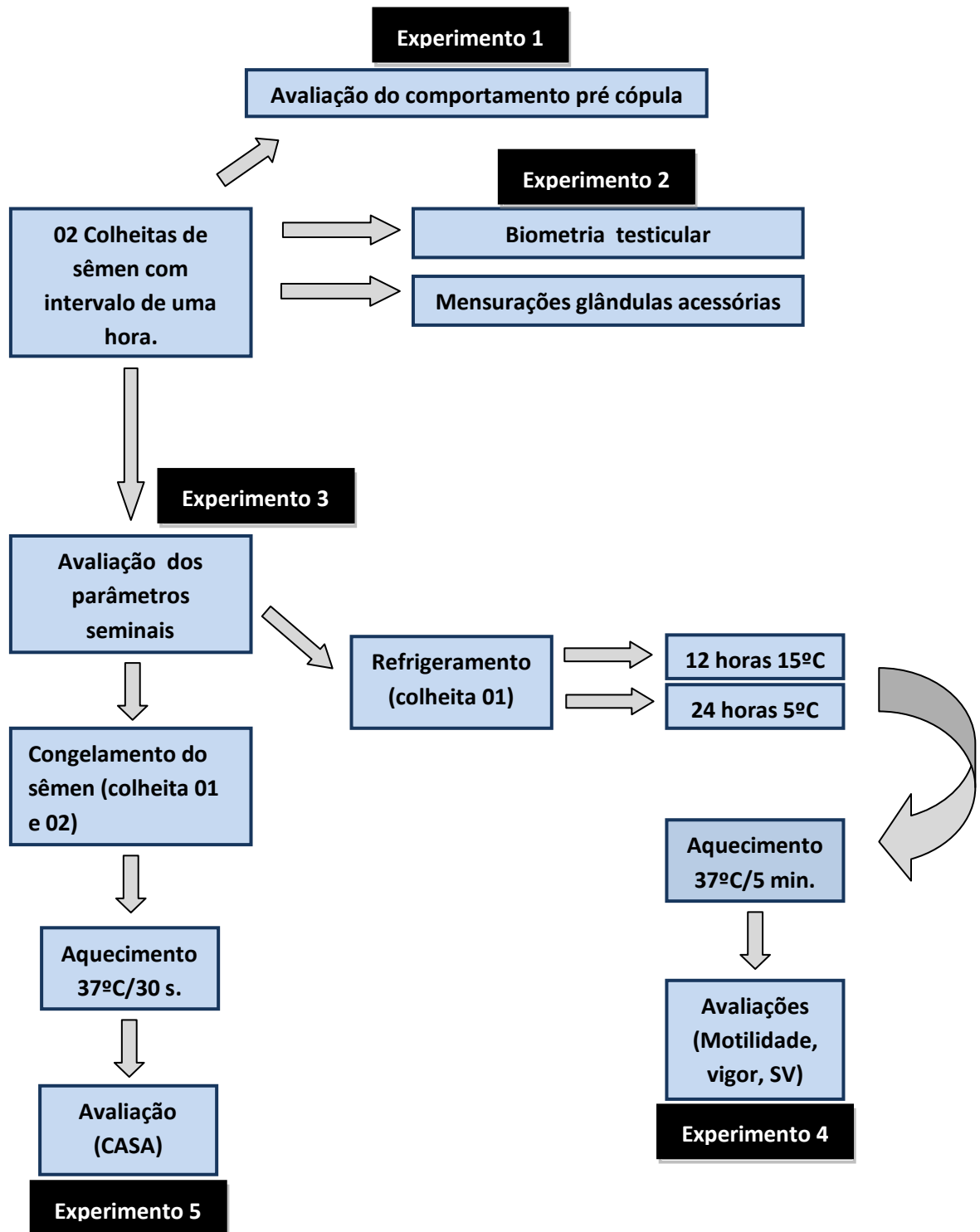


Figura 2: Fluxograma experimental.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DO CAVALO MANGALARGA MARCHADOR – ABCCMM. A história do cavalo Mangalarga Marchador. Belo Horizonte: Nova Fronteira, 1991. 89p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DO CAVALO MANGALARGA MARCHADOR – ABCCMM. Arquivos. Belo Horizonte: ABCCMM, 2010.

Amann RP. 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics *Journal of Andrology* 2 37—58.

Amann RP, Graham JK. Spermatozoal function. *In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.715-745.

Amann RP, Pickett BW. 1987. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.7, p.145-173.

Amann RP, Thompson DL, Squires EL, Pickett BW. 1979. Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 27, p.1-6.

Ashwood-smith MJ.1987. Mechanisms of cryoprotectant action. *In: Bowler K, Fuller B.J., eds. Temperature and cells*. Cambridge: The Co. of Biologists Ltd.: 395-406.

Aurich C, 2005. Reproduktions medizin beim Pferd; Physiologie der Fortpflanzungsfunktionen beim Hengst. Stuttgart: Editora Parey Verlag, Kapitel 13; pag. 243-245.

Aurich C. 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *An Reprod Sci*, 107:268-75.

Aurich C, Spargser, J. 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology* 67, 912–918.

Backman T, Bruemmer JE, Graham JK, Squires EL. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *J Anim Sci*, v.82, p.690-694, 2004.

Ball BA. An introduction to the use and application of cryopreserved equine semen. *In: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, 1998, Davis. Proceedings...Davis: [s.n.], 1998. p.25-41.*

Barrier-Battut I, Bonnet C, Giraudo A, et al., 2010. Removal of seminal plasma by centrifugation before cooled storage, enhance membrane stability of stallion spermatozoa. *An. Reprod. Sci, Abstract. 121S:S188-190.*

Bartholomew AB, Caudle AB, Peroni JF. 2003. Unusual case presentation of hydrocele in tennessee walking stallion. *Equine Rounds*, august, p. 632-34.

Bedford-Guaus SJ. 2007. Transported Stallion Semen and Breeding Mares with Cooled or Frozen-Thawed Semen. *Clin Tech Equine Pract* 6:239-248.

Bielanski W, Kaczmarek F. 1979. Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. *J Reprod Fertil Suppl* 27:39.

Blanchard TL, Brinsko SP, Varner DD, Hurtgen JP. 2001. Evaluation of testicular size and Function In 1-3-year-old Stallions. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP; V.47; p.232-235.*

Bristol F. 1982. Breeding behavior of a stallion at pasture with 20 mares in synchronized estrus. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 32, p. 71–77.

Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman DL. 2011. Examination of the Stallion for Breeding Soundness, cap 13. Pages 176-206, IN: *Manual of Equine Reproduction*, Brinsko, S.P. et al.; 3ª Edição.

Brinsko, SP, Crockett, EC, Squires, EL, 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. *Theriogenology* 54, 129–136.

Brisko S, Varner DD, Blanchard TL. 2000. Transport equine semen. (www.ivis.com.br – acesso 25/04/2012).

Campos ACN. Nunes JF, Silva Filho AHS, Monteiro AWU. 2003. Parâmetros biométricos do trato genital masculino de caprinos sem raça definida (SRD) criados no semi-árido nordestino durante o período seco e chuvoso. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, vol. 40, p.185-189.

Canisso IF. 2008. Alguns aspectos fundamentais do exame clínico andrológico de jumentos (*Equus asinus*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, V.32, n.4, p.233-239, out/dez.

Chenier TS. 2007. Anatomy and Examination of the normal testicle. In: Samper, J.C. Pycock, J.F.; Mckinnon, A.O. *Current Therapy in Equine Reproduction*, p.167-168; cap.26.

Colenbrander B, Puyk H, Zandee AR, Parlevliet J. 1992. Evaluation of the stallion for breeding. *Acta Vet Scand Suppl* 88:29–37.

Coulter GH, Rounsaville TR, Foote RH. 1976. Heritability of testicular size and consistency in Holstein bulls. *J Anim Sci*; vol.43, p.9–12.

Dalimata AM, Graham JK. 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*. V. 49, p. 831-41.

Darenius A. Experiences with chilled, transported equine semen. *In: Stallion Reproduction Symposium, 1998. Proceedings...* Montgomery, AL: Society for Theriogenology, American Association of Equine Practitioners, 1998. p.60-70.

Douglas-Hamilton DH, Osol R, Osol G, Driscoll D, Noble H. A field study of fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, v.22, p.291-304, 1984.

Dowsett KF, Pattie WA. 1982. Characteristics and fertility of stallion semen *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 32 1—8.

Dowsett KF, Pattie WA. 1987. Variation in characteristics of stallion semen caused by breed, age, season of year and service frequency *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 35 645—647.

Duncan AE, Watson PF. 1992. Predictive water loss curves for ram spermatozoa during cryopreservation: comparison with experimental observation. *Cryobiology*, v. 29, p. 95-105.

Ecot P, Decuadro-Hansen G, Delhomme G, Vidament M. 2005. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. *Anim Reprod Sci*; 89:245—8.

Fagundes B, Silva JFS, Shimoya A., et al. 2010. Adição de alanina, glicina e glutamina ao meio crioprotetor seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador. *R Bras Zootec*. V39, n.2:279-84.

Feist J. 1976. Behavior patterns and communication in feral horses. *Zeitschrift fur Tierpsychology* 41, p. 337—371.

Figueiró GM. 2010. Análise morfofuncional da espermatogênese do cavalo da raça Crioula. Tese de Doutorado. Santa Maria – RS, Universidade Federal de Santa Maria.

Fürst R, Carvalho GR, Fürst MCO. 2005. Efeito do resfriamento do sêmen sobre sua congelabilidade. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.57, n.5, p.599-607.

Graham JK. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. Veterinary Clinics of North America - Equine practice, v.12, p.131-147.

Graham JK. 1998. Sperm physiology: response to freezing & analysis of sperm function. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1996, Proceedings.... Society for Theriogenology, p.54-9.

Heitland AV, Jasko DJ, Graham JK, et al. 1995. Motility and fertility of stallion sperm cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. Biology of Reproduction Monograph, v. 1, p. 753-759.

Hendrikse J. 1966. Spermatav an normaalb evruchtenddee khengsten. Tijdschr Dierg; 1, 300-311.

Hess MF, Roser JF. 2005. A comparison of the effects of equine luteinizing hormone (eLH), equine growth hormone (eGH) and human recombinant insulin-like growth factor (hr-IGF-I) on steroid production in culture equine Leydig cells during sexual maturation. Anim Reprod Sci. 89, p.7-19.

Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science, v. 62, p.3–22.

Holt WV, Head MF, North RD. 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biology of Reproduction*, v. 46, p. 1089-1094.

Householder DD, Pickett BW, Voss JL, et al. 1981. Effect of extender, number of spermatozoa and hCG on equine fertility. *Equine Vet Sci* 9-13.

Janett F, Thun R, Niederer K, et al. 2003. Seasonal changes of semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 60:453.

Jasko DJ. 1992. Evaluation of stallion semen. In Blanchard TL, Varner DD, eds: *Vet Clin North Am Eq Pract* 8:129.

Jasko, DJ, Hathaway, JA, Schaltenbrand, VL, Simper, WD, Squires, EL, 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37, 1241–1252.

Jasko DJ, Little TV, Lein DH, Foote RH. 1992. Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987–1988). *J Am Vet Med Assoc*;200:979–85.

Johnson L, Carter GK, Varner DD, Taylor TS, Blanchard TL, Rembert MS. 1994. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.100, p. 315-321.

Kalmar JJ, Ball BA, Troedsson MHT, et al., 2014. Effect of number of mounts and pre-freezing concentration on stallion seminal parameters. *Journ Eq Vet Sci*, 34: 30.

Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL. Minimal contamination techniques and preliminary findings. *Proc Am Assoc Equine Practit*, v.21, p.327-336, 1975.

Kenney RM, Hurtgen J, Pierson R, Witherspoon D, Simons J. 1983. Manual for Clinical Fertility Evaluation of the Stallion. Hastings NE: Society for Theriogenology.

Kayser JP, Amann RP, Shideler RK. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.601-614, 1992.

Keith SL. 1998. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Fort Collins, Colorado, USA: Colorado State University, 1998. 104p. Thesis (Master of Science), CSU.

Klug E. 1982. Untersuchung zur klinischen Andrologie des Pferdes. 260f. Tese de Habilitação à Docência– Tieraerztliche Hochschule Hannover.

Knop K, Hoffmann N, Rath D, Sieme H. 2005. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Anim Reprod Sci*;89:294–7.

Lindsay FEF, Burton FL. 1983. Observational study of 'urine testing' in the horse and donkey stallion. *Equine Vet J*. v. 15 p. 330–336.

Looms SPR. 2011. Processing semen for cooled transport. In: Proc 17th Cong of Italian Ass of Eq Vet. Montesilvano, Italy, 23-26.

Loomis SPR, Squires EL. 2005. Frozen semen management in equine breeding programs, *Theriogenology*, v. 64, p. 480-491.

Love CC, Garcia MC, Riera FR, Kenney RM. 1990. Use of testicular volume to predict daily sperm output in the stallion. In: Proceedings of Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, pp. 15–20.

Love CC, Thompson JA, Brinsko SL, Rigby RS et al. 2002. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, v. 58, p. 221-224, 2002.

Love CC. 2011. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*;76:547-557.

Manso Filho HC, Costa HEC, Santos FL, Abage MG, Ferreira LMC, Marques SR. 2000. Testicular Measurements in Campolina Stallions; *Journal of equine veterinary science*, p. 277-278.

Martin JC, Klug E, Günzel AR. 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fert Suppl*; 27:47–51.

Maziero RRD, Guasti PN, Monteiro GA, et al. 2013. Evaluation of sperm kinetics and plasma membrane integrity of frozen equine semen in different storage volume and freezing conditions. *Journal of Eq Vet Sci*. 33:165-68.

Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, v. 247, n.16, p.125-142.

Mazur P. 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. *Proc qth Int. Congr. Anim, Reprod. And I.2*, p. 99-114.

McDonnel, SM. 1986. Reproductive behavior of the stallion. *Vet. Clin. of North Am.: Eq practice – v. 2, n.3*.

McDonnell SM. 1992. Normal and abnormal sexual behavior. *Vet Clin North Am Equine Pract v. 8, p. 71- 79*.

McDonnell SM. Stallion sexual behavior. 2009. IN. Equine breeding management and artificial insemination. Ed. By Juan C. Samper, 2 ed., p. 41-46.

McDonnell SM. 2000. Reproductive behavior of stallions and mares: comparison of free-running and domestic in-hand breeding. An. Reprod. Sci., v. 60-61, p. 211-219.

Metcalf ES, Ley WB, Love CC. 1997. Semen parameters of the American Miniature Horse stallion. In: Proceedings of the 43^o Annual Convention of American Association of Equine Practitioners, p. 202-203.

Monteiro GA, Guasti PN, Hartwig FP et al. 2013. Cooling of ejaculated and epididymal of stallion sperm. Arq Bras Med Vet Zootec. V 65,n 3:681-86.

Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, Amann RP. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.999-1012, 1992.

Moreno D, Bencharif D, Amirat-Briand L, et al. 2013. Preliminary results: The advantage of low-density lipoproteins for cryopreservation of equine semen. *Journal Eq Vet Sci*. 33:1068-75.

Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, Rodrigues-Martinez H. 2009. Single layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology*, 72: 879-84.

Morrell JM, Georgakas A, Lundeheim N, Nash D, et al. 2014. Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. *Theriogenology*, 82: 176-83.

Naden J, Amann RP, Squires EL. 1990. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 88, p. 167-176.

Najjar A, Benaoun B, Ezzaouia A, et al., 2010. Determination of sêmen sexual behavior parameters of Arabian stallions to be selected for an artificial insemination program under Tunisian conditions. *Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci.*, 8 (2), p. 173-177.

Nishikawa, Y. 1959. *Studies on reproduction in horses*. Tokyo: Japan Racing Association, 340 pp.

Parlevliet JM, Kemp B, Colenbrande B. 1994. Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*. V.101, n. 1, p. 183-187.

Papa FO, Alvarenga MA, Dell'aqua Jr JA, Monteiro GA. 2011. Manual de andrologia e manipulação de sêmen. In: www.botupharma.com.br (Acessado dia 12/06/2013). 46p.

Papa PM, Ramirez-Neto C, Moteiro GA, et al. 2014. Sperm parameters and fertility of stallion semen cooled with different extenders. *Journal of Eq Vet Sci*. 34:79.

Pickett BW, Amann RP, McKinnon AO, Squires EL, Voss JL. 1989. *Management of the Stallion for Maximum Reproductive Efficiency*, II. Animal Reproduction Laboratory Bulletin No. 05. Fort Collins: Colorado State University.

Pickett BW, Voss JL, Nelson LD. 1976. Factors influencing the fertility of stallion spermatozoa in an A.I. program, in *Proceedings of VIIIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Cracow, pp 1049-1051.

Pickett BW, Voss JL, Bowen RA, Squires EL, McKinnon AO. 1987. Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. *Proceedings of the 33rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, pp. 487–518.

Pickett BW. 1993. Reproductive evaluation of the stallion. In: MCKINNON A.O., VOSS J. L. (Eds.). Philadelphia: Lea & Febiger, p. 755-768.

Pickett, B. W., L. C. Faulkner and T. M. Sutherland. 1970. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. J. Anita. Sci. v. 31. p. 713.

Pimentel SM, Silva EA. 2010. Correlação entre perímetro escrotal e características reprodutivas da progênie, FAZU em Revista, Uberaba, n.7, p. 177-185.

Pozor MA, McDonnell SM. 2003. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. Theriogenology, 61: 799-810.

Pozor M. 2005. Diagnostic applications of ultrasonography to stallion's reproductive tract. Theriogenology. 65:505-509.

Price S, Aurich J, Davies-Morel M, Aurich C. 2008. Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 °C and 15 °C. Reprod. Domest. Anim. 43, 261–266.

Roser JF. 2000. Testicular function and fertility. Journal of Equine Veterinary Science. v.20, n.2, p.90-93.

Samper JC. 2007. Reproductive system: evaluate of the breeding stallion. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE MEDICINA EQUINA, 1, São Paulo. Anais... São Paulo: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Eqüídeos, p.1-18.

Salazar Jr JL, Teague SR, Love CC, et al., 2011. Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. Theriogenology, 76:409-18.

Rowe AW. 1966. Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing. *Cryobiology*, v. 3, p. 12-18.

Schmitt FL, Arruda NS, Laurent T. 2009. Hydrocelle in stallions: case report. In: Proc 11th Congress of World Eq Vet Ass. Grarujá, SP.

Schnobrich MR, Turner RO, Slack J. 2013. Ultrasonographic characterization of accessory sex glands in normal geldings. In Proc of Soc Therio, Louisville, USA , v.5, n.3, p 402.

Senger PL. 1986. Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen. In: MORROW, D. A. (Eds.). *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 116-174.

Sieme H. 2009. Semen evaluation. In. *Equine breeding management and artificial insemination*. Samper JC. Ed. Saunders Elsevier second ed. P. 57-74.

Sieme H A, Echte E, Klug, 2002. Effect of frequency and interval of semen collection on seminal parameters and fertility of stallions. *Theriogenology*, v. 58, p. 313-316.

Sieme H, Katila T, Klug E. 2004. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 61:769.

Silva JR, Agrícola R, Barbosa M, Costa LL. 2007. Variação sazonal do volume testicular, da produção e qualidade do sêmen e do comportamento sexual de cavalos Lusitanos; *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, V.102 (561-562), p. 119-125.

Silva Filho JM, Palhares MS, Fonseca FA. Transporte e inseminação artificial com sêmen de equino. *Cad Téc Esc Vet UFMG*, n.11, p.3-112, 1994.

Skinner EL, Bowen J. 1968. Puberty in the Welsh stallion. *J Reprod Fertil*; 16:133-135.

Souza JAT, Campelo JEG, Macedo NA, Leal TM, Sousa Júnior RM, Medeiros RM, Chaves RM. 2007. Biometria Testicular, Características Seminais, Libido e Concentração de Testosterona em Ovinos da Raça Santa Inês, Criados a Campo, na Microrregião de Campo Maior, Piauí. *Ciência Veterinária dos Trópicos*, v. 10, n. 1, p. 21 – 28, 2007.

Squires EL, Todter GE, Berndtson WE, Pickett BW. 1982. Effect of anabolic steroids on reproductive function of young stallions. *Journal of Animal Science*, vol.54, p.576–582.

Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer, JE. *Cooled and frozen stallion semen*. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999 p.1-38.

Squires EL, Pickett BW. 2011. Factors affecting sperm production and output. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. D. (Eds). *Equine Reproduction*. 2º Ed. Wiley-Blackwell v. 1, 1344-1360.

Stoll A, Stewart BL, Brum AM, Liu IK, Ball BA. 2008. Evaluation of cryopreserved-thawed stallion sperm before and after density gradient centrifugation with silane-coated silica particles. *Abstracts / Theriogenology* 70 590.

Tarouco AK, Freitas CC, Neves AP, Gregory RM, Mattos RC. 2009. Sexual and social behaviors of pony stallions and mares. *Anim. Reprod.*, v. 6, n.4, p. 535-545.

Thomson Jr DL, Pickett BW, Berndtson WE, Voss JL, Nett TM. 1977. Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behavior and

concentrations of LH and testosterone e serum. J. Anim. Sci. v. 44, p. 656-664.

Thompson DJ, Pickett BW, Squires EL, Amann RP. 1979. Testicular measurements and reproductive characteristics in stallion. Journal of Reproduction and Fertility. v. 27, p. 13-17.

Turner RM. 2005. Current techniques for evaluation of stallion fertility. Clin Tech Equine Pract 4:257.

Varner DD, Schumacher J, Blanchard TL, Johnson L. 1991. Disease and management of breeding stallions. Sta Barbara: American Veterinary Publications, p. 349.

Varner DD. 2002. Introduction of the stallion breeding soundness examination form of the Society for Theriogenology. In: Proceedings Society for Theriogenology; p. 113–6.

Varner DD, Blanchard TL, Love CL, et al. 1987. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. Theriogenology 28:709-723.

Varner DD, Blanchard, TL, Love CC, Brinsko SP. 2013. Ancillary semen tests for stallions: which one to use and what do they mean. Proc Soc For Therio, Louisville, USA, August, p- 343-58.

Vidament M. 2005. Frech field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. An Reprod Sci. 89:115-36.

Vidament M, Ecot P, Noue P, Bourgeois C, Magistrini M, Palmer E. 2000. Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. Therio; 54:907–19.

Vidament M, Daire C, Yvon JM, Doligez P, Bruneau B, Magistrini M, Ecot P. 2002. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, v. 58, p. 249–251.

Vidament M, Dupere M, Julienne P, et al. 1997. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, v.48, p.907-917.

Viu MAO, Magnabosco CU, Ferraz HT, Gambarini ML, Oliveira Filho BD, Lopes DT, Viu AMF. 2006. *Archives of Veterinary Science*, v.11, n.3, p. 53-57.

Voss JL, Pickett BW, Looms PR. 1982. The relationship between semen characteristics and fertility in Thoroughbred stallions. *J. Reprod Fert.* 32, 635.

Voss JL, Pickett BW, Squires EL. 1981. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *J Am Vet Med Assoc* 178:287.

Watson PF. 1995. Recent developments e concepts in cryopreservation of spermatozoa e the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* p. 871-891.

Watson PF. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris, G.J., Clarke, A. (eds): *Effects of low temperatures on biological membranes*. London, Academic Press, p.189.

Weiss S, Janett F, Burger D, Ha¨ssig M, Thun R. 2004. The influence of centrifugation on quality and freezability of stallion semen. *Schweiz Arch Tierheilk*, 146:285–93.

ANEXO I

SETUP – HAMILTON THORNE BIOSCIENCES (Ultimate – Sperm Analyzer)

CARACTERÍSTICA	AJUSTE
Número de imagens adquiridas (<i>Image capture:frames</i>)	30
Taxa de aquisição das imagens (<i>Image capture:frames per sec</i>)	60 Hz
Contraste mínimo da célula (<i>Cell detection:minimum contrast</i>)	80
Tamanho mínimo da célula (<i>Cell detection:minimum size</i>)	3 pixels
Tamanho para células imóveis (<i>Defaults:cell size</i>)	6 pixels
Intensidade para células imóveis (<i>Defaults:cell intensity</i>)	60
Referência de VAP para células progressivas (<i>Progressive cells: VAP</i>)	30,0 µm/s
Referência de VAP para células lentas (<i>Slow cells: VAP cut-off</i>)	20,0 µm/s
Referência de VSL para células lentas (<i>Slow cells: VSL cut-off</i>)	0 µm/s
Limite superior de tamanho da célula (<i>Qc plots: Static size gates-Max</i>)	2,48 pixels
Limite inferior de tamanho da célula (<i>Qc plots: Static size gates-Min</i>)	0,29 pixels
Limite superior de intensidade da célula (<i>Qc plots: Static intensity gates-Max</i>)	1,51
Limite inferior de intensidade da célula (<i>Qc plots: Static intensity gates-Min</i>)	0,46
Limite superior de alongamento da célula (<i>Qc plots: Cell elongation-Max</i>)	98%
Limite inferior de alongamento da célula (<i>Qc plots: Cell elongation-Min</i>)	0%
Aumento (<i>Optics: Magnification</i>)	1,89
Temperatura (<i>Stage:Set stage temperature</i>)	37 °C