

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
Campus ROLIM DE MOURA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

VAGNER MIRANDA LOPES

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN EQUINO
RESFRIADO A 5°C POR 36 HORAS DE GARANHÕES ALOJADOS NO
MUNICÍPIO DE ROLIM DE MOURA – RO.**

ROLIM DE MOURA - RO

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
Campus **ROLIM DE MOURA**
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

VAGNER MIRANDA LOPES

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN EQUINO
RESFRIADO A 5°C POR 36 HORAS DE GARANHÕES ALOJADOS NO
MUNICÍPIOR DE ROLIM DE MOURA – RO.**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado
como exigência em graduação no curso de
Bacharel em Medicina Veterinária na
Universidade Federal de Rondônia.
Orientador: Prof. Dr. Fernando do Carmo
Silva

ROLIM DE MOURA - RO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Fundação Universidade Federal de Rondônia
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

L864a Lopes, Vagner Miranda.

Avaliação da viabilidade espermática do sêmen equino resfriado a 5°C por 36 horas de garanhões alojados no município de Rolim de Moura-RO / Vagner Miranda Lopes. -- Rolim de Moura, RO, 2018.

32 f. : il.

Orientador(a): Prof.^a Dra. Fernando do Carmo Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) -
Fundação Universidade Federal de Rondônia

1.Reprodução . 2.Criopreservação. 3.Motilidade. I. Silva, Fernando do Carmo. II. Título.

CDU 591.16:636-082.4

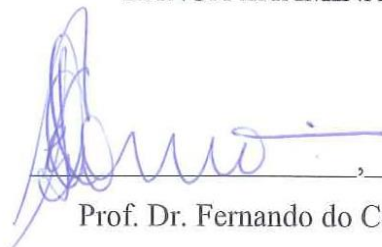
VAGNER MIRANDA LOPES

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN EQUINO
RESFRIADO A 5°C POR 36 HORAS DE GARANHÕES ALOJADOS NO
MUNICÍPIO DE ROLIM DE MOURA – RO.**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como exigência em graduação no curso de Bacharel em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Rondônia.

Rolim de Moura, 22 de Junho de 2018

BANCA EXAMINADORA



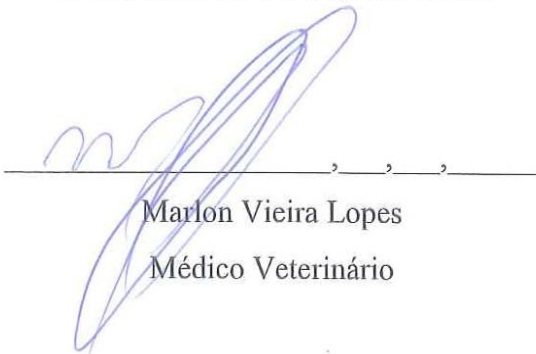
Prof. Dr. Fernando do Carmo Silva

Universidade Federal de Rondônia



Prof. Dr. Evelyn Rabelo Andrade

Universidade Federal de Rondônia



Marlon Vieira Lopes

Médico Veterinário

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família por todo apoio, pela honestidade transmitida na educação, pela formação do caráter pessoal e pela fé transmitida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela saúde, pela perseverança e força nos momentos difíceis e por possibilitar a conclusão de mais uma etapa tão importante em minha vida.

Aos meus pais Gervazio Lopes e Rosangela Miranda Lopes pela educação e apoio durante toda minha trajetória, e por se manterem firmes perante as adversidades encontradas.

Aos meus irmãos Maicon Miranda Lopes e Mônica Miranda Lopes que sempre estiveram dispostos a contribuir no que estivesse ao alcance.

Ao meu orientador Fernando do Carmo por me auxiliar no desenvolvimento deste estudo.

Aos proprietários dos animais que os disponibilizaram para coleta de dados, Marlon, Denis, Ricardo, Donizete e Policarpo.

À Maúcha Fernanda por me auxiliar, apoiar e incentivar na elaboração e conclusão deste trabalho.

A todo corpo docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Rondônia por esclarecer as dúvidas e fornecer alguns dos equipamentos necessários.

Aos amigos de curso que estiveram presentes no decorrer dos anos e que também puderam contribuir para conclusão desta etapa.

“O Senhor firma os passos de um homem, quando a conduta deste o agrada; ainda que tropece, não cairá, pois o Senhor o toma pela mão.”
Salmo 37; 23, 24.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vagina artificial e seus constituintes.....	21
Figura 2. Método de coleta com vaginal artificial, usando égua em estro como manequim. ..	21
Figura 3. Dispositivo <i>container</i> (A); Visão interna do dispositivo (B).....	22
Figura 4. Momento da avaliação após coleta do sêmen fresco diluído.	23

RESUMO

A reprodução equina atualmente dispõe de manobras tecnológicas que otimizam o uso de animais com atributos genéticos selecionados, agregando valor e qualidade, evitar possíveis transmissões de patógenos via coito, aumento no número de éguas inseminadas por garanhão e maior número de descendentes nascidos por estação. Objetivou-se com esse trabalho o emprego de biotécnicas aplicadas à reprodução equina com intenção de avaliar a viabilidade do sêmen resfriado por 36 horas de garanhões da raça quarto de milha alojados no município de Rolim de Moura – RO. Foi coletados sêmen de sete garanhões através do uso de vagina artificial e manequim vivo, posteriormente acondicionado e resfriados a temperatura de 5°C no dispositivo de refrigeração passiva *container*, posteriormente foi avaliado as características físicas, motilidade, vigor e concentração em quatro momentos sendo horas 0, 12, 24 e 36 pós coleta. Admitindo a eficácia do uso da técnica de refrigeração de sêmen, mostrando se eficaz ao manter bons padrões de motilidade e concentração ($P>0,05$). No entanto, não foi capaz em preservar o vigor ($P<0,05$). Conclui-se que o uso da biotecnologia na reprodução equina maximiza o uso de garanhões que se encontram alojados em regiões distante, ou que encontra limitado a transporte entre regiões.

Palavras-chave: reprodução, criopreservação, motilidade.

ABSTRACT

Currently, equine reproduction has reproductive techniques that optimize the use of animals with selected genetic attributes, adding value and quality, avoiding possible transmission of pathogens via coitus, increasing the number of mares inseminated per stallion, and the number of descendants born per season. This study aimed to use biotechniques applied to equine reproduction with the intention of evaluating the viability of semen cooled by 36 hours from stallions of the quarter-thousand breed housed in Rolim de Moura – RO. Semen from seven stallions were collected through the use of artificial vagina and live manikin, subsequently conditioned and cooled to a temperature of 5 ° C in a container refrigeration device. It was evaluated the physical characteristics, motility, vigor and concentration in four moments: 0, 12, 24 and 36 hours post-collection. Admitting the efficacy of the use of the semen cooling technique, showing that it is effective in maintaining motility and concentration patterns ($P > 0.05$). However, it was able to preserve the vigor ($P < 0.05$). It is concluded that the use of biotechnology in equine breeding maximizes the use of stallions that are housed in distant regions or that are limited to transport between regions.

Key-words: reproduction, cryopreservation, motility.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Dispositivo de refrigeração.....	14
3.2 Plasma seminal	15
3.3 Queda de temperatura e armazenamento.....	16
3.4 Diluidores	17
3.5 Concentração espermática	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Procedimento experimental	20
4.2 Análise Estatística	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

A indústria equina mundial vem crescendo a cada e tem exercido importante papel como fonte geradora de renda e empregos. Em um estudo sobre a indústria do cavalo no Brasil, demonstrou-se uma taxa de 8,5 milhões de equinos e 1,2 milhões de muas e jumentos. Esse segmento agropecuário é responsável pela geração de 610 mil empregos diretos e com aproximadamente 2,5 milhões indiretos (MAPA, 2016).

A biotecnologia da reprodução é uma importante ferramenta a serviço da equideocultura mundial, como instrumento direto do melhoramento genético. O sêmen resfriado é largamente utilizado na rotina reprodutiva equina, dadas as vantagens proporcionadas por estes métodos, esta talvez seja a biotecnologia com maior impacto na produção equina, pois um reprodutor pode deixar centenas de descendentes ao longo de sua vida reprodutiva quando essa biotecnologia é usada eficientemente.

Aparentemente, no mundo, os países que mais realizam inseminação artificial com sêmen resfriado transportado são Estados Unidos, seguido pelo Brasil (PAPA et al., 2005).

O desenvolvimento de técnicas adequadas para preservação e armazenamento de sêmen possibilita o melhor aproveitamento de animais com alto valor zootécnico, evita gastos de transportes e riscos como doenças sexualmente transmissíveis, além de permitir a conservação de material genético por determinado período.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a viabilidade espermática do sêmen equino submetidos a uma condição de resfriamento de 5° C, avaliando parâmetros de concentração, motilidade e vigor espermático de garanhões da raça quarto de milha alojados no município de Rolim de Moura - RO.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade espermática do sêmen equino submetidos a condição de resfriamento de 5° C, avaliando parâmetros de concentração, motilidade e vigor espermático de garanhões da raça quarto de milha alojados no município de Rolim de Moura - RO.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade do sêmen resfriado por 36 horas.
- Avaliar parâmetros de concentração, motilidade e vigor de sêmen a cada 12 horas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo Papa et al. (2005) o Brasil tem grande destaque na utilização de sêmen equino refrigerado e está em segundo lugar entre os países que utiliza a biotecnologia. Além disso, a indústria do cavalo tem mantido fundamental importância como fonte geradora de renda e emprego, com 610 mil empregos diretos e com aproximadamente 2,5 milhões indiretos (MAPA, 2016).

As primeiras descobertas sobre a criopreservação deram-se por volta de 1700 quando Spallanzani introduziu sêmen de cão e cavalo na neve e observou a queda de motilidade dos espermatozoides e posteriormente ao aquecimento a recuperação da motilidade (HOPKINS; MEADOWS, 2003).

A inseminação artificial com sêmen refrigerado é utilizada amplamente na reprodução (NUNES et al., 2006). O processo de diluição e resfriamento do sêmen confere maior sobrevivência aos espermatozoides, além de protegê-los de condições adversas, proporciona o aumento significativo de fêmeas a serem inseminadas e reduz o risco de transmissão de doenças tanto pela monta quanto pelo deslocamento (LOOMIS; SQUIRES, 2005).

As técnicas de resfriamento e congelamento permitem melhor acasalamento e aproveitamento de animais geneticamente superiores, muitas vezes alojados em centrais de reprodução (NUNES et al., 2006). O transporte de sêmen refrigerado maximiza o aproveitamento de animais com grande potencial genético (PAPA et al., 2005).

Apesar de simples, a técnica de resfriamento encontra vários fatores que influenciam de forma negativa na viabilidade espermática como, a composição do diluente, método de resfriamento, transporte e especificidade do reprodutor (ROCHA, 2012).

A eficácia no uso do sêmen resfriado resulta na preservação dos espermatozoides durante o tempo de transporte e armazenamento, sem que ocorra comprometimento da sua capacidade fecundante, permite assim o prolongamento da viabilidade espermática por um período maior e chegar até 48 horas para equinos, mantendo a temperatura mínima de 5°C (SILVA FILHO et al., 1997; VALE FILHO; VALLE; NASCIMENTO, 2011).

A célula espermática possui uma membrana plasmática composta por uma dupla camada lipídica, proteínas e carboidratos, e esta é afetada pelo choque térmico (AMANN; GRAHAM, 1993). Em estudo Squires et al. (1999) classificam os danos causados pelo estresse

térmico á célula espermática em diretos, rupturas das membranas ou indiretos, alterações das funções celulares.

Squires et al. (1999) constataram a necessidade de conservação da viabilidade espermática de pelo menos 24 horas, visto que é o tempo necessário para que as amostras de sêmen dos garanhões sejam transportadas e cheguem aos haras para serem utilizadas na inseminação artificial. Tempos superiores de armazenamento podem provocar reações bioquímicas que comprometem a fertilidade dos gametas (POMMER et al., 2002).

3.1 Dispositivo de refrigeração

Machado et al. (2002) constataram a eficácia no sistema de refrigeração passiva para transporte de sêmen equino diluído formado por duas caixas de isopor, uma interna (15 x 11 cm) e outra externa (25 x 16 cm).

A estocagem de sêmen em diferentes *containers*¹ pode ser oferecida com taxas de comparações inconvenientes, por estes apresentarem características distintas (SILVA FILHO et al., 1994). No mesmo sentido Malmgren (1998) relata que alterações de temperatura a qual os *containers* são expostos tem influência direta sobre a temperatura final e estocagem interior da amostra e influenciando nas características seminais.

Valle et al. (1999) classificaram os sistemas de preservação de sêmen em passivos, sendo os que possuem uma taxa de refrigeração dependente de alguns fatores como temperatura inicial da amostra, temperatura do ambiente e volume da amostra e possuem vantagem de ser menos onerosos, o sistema ativo já possui taxa de refrigeração pré-determinada tendo como desvantagem o alto custo e pouco viável em condições de campo.

Avanzi et al. (2006) não observaram diferenças estatísticas sobre sistemas de refrigeração passiva comparado a dispositivos disponíveis no mercado, quando mantidos a temperatura ambiente de 24°C. Douglas-Hamilton et al. (1984) descreve taxas de prenhes de até 91% com sêmen equino transportado e refrigerado em equipamento adequado.

Silva Filho (1994) aborda que para ser eficaz o equipamento de preservação do sêmen equino refrigerado, *containers*¹, precisa atender as necessidades de completo isolamento

¹ caixa construída em aço, alumínio ou fibra, designado para o acondicionamento e transporte.

térmico do meio exterior, obter uma lenta taxa de resfriamento ($0,33^{\circ}\text{C}/\text{min}$), manutenção da temperatura por maior tempo possível após estabilização, serem seguros, baratos e práticos.

3.2 Plasma seminal

O plasma seminal é caracterizado como a porção fluida do ejaculado no qual os espermatozoides estão presentes (GARNER; HAFEZ, 2004). Troedsson (1999) relata que estão presentes no plasma seminal substâncias moduladoras da resposta inflamatória uterina pós cobertura auxiliando na limpeza uterina de éguas susceptíveis a endometrite pós cobertura.

Em trabalho realizado, Squires et al. (1999) constataram que apesar de exercer papel importante no transporte e fisiologia do gameta masculino o plasma seminal não é um meio ideal para preservação de espermatozoides *in vitro*, devido grande proporção de plasma seminal promover uma redução da motilidade espermática durante longos períodos de estocagem e refrigeração; já em pequenas quantidades de plasma tem-se uma melhor sobrevivência.

Segundo Kankofer et al. (2005) enzimas presentes no plasma seminal controlam o balanço e neutralização entre espécies reativas de oxigênio. A adição de antioxidantes em sêmen equino tem a função de melhorar a manutenção da integridade da membrana e a motilidade do espermatozoide (BRUEMMER et al., 2002).

A manipulação do sêmen após ejaculação o expõe a diversos fatores, principalmente ao processo de peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática pelas espécies reativas a oxigênio (BOE-HANSEN et al., 2005; FUNAHASHI E SANO, 2005; KANKOFER et al., 2005).

Características subjetivas de motilidade e vigor avaliadas visualmente fornecem uma estimativa da quantidade de espermatozoides móveis e sua magnitude de deslocamento (DOBRINSK et al., 1993)

A técnica de avaliação de motilidade apesar de apresentar uma correlação de baixa e média intensidade com a fertilidade e não avaliar todas as características que o espermatozoide deve possuir para efetuar a fecundação, ainda tem sido muito utilizada por ser simples e de baixo custo (SQUIRES et al., 1999; GRAHAM, 2001).

3.3 Queda de temperatura e armazenamento

Alguns fatores decorrentes da refrigeração como choque térmico e estresse osmótico podem causar injúrias a célula espermática que leva a perda da fertilidade e da capacidade do espermatozoide fecundar (MAZUR, 1984; ALVAREZ; STOREY, 1992; AMIRANT et al., 2004; LI et al., 2005).

Em consequência ao choque térmico causado por queda de temperatura em taxas superiores as indicadas para a espécie, tem-se alterações em modo anormal de movimento e queda de motilidade espermática, lesões em membranas, redução do metabolismo e perda de alguns componentes intracelulares (AURICH, 2005).

Durante a fase de queda de temperatura os lipídios da membrana plasmática passam de um estado de fluido para estado de gel, esta fase de transição no sêmen equino ocorre por volta dos 20°C onde cada tipo de lipídio passa por esta fase em temperaturas diferentes (AMANN; GRAHAM, 1993).

Segundo Moran et al. (1992) a taxa de refrigeração deve ser controlada principalmente entre 19 e 9°C considerado o ponto mais crítico de queda de temperatura, fase em que mais ocorre lesões nas membranas espermáticas. Temperaturas baixas também alteram proteínas intracelulares, afetando funções enzimáticas e o transporte transmembrana por proteínas (AMANN; GRAHAM, 1993).

Em estudo Farrás et al. (2008) encontraram uma curva de resfriamento de -0,1°C/min nos primeiros trinta minutos e de -0,05°C/min após os trinta minutos, dessa forma evita um possível choque térmico aos espermatozoides.

Um equipamento especialmente desenvolvido para conservar o sêmen e manter bons índices de fertilidade deve obedecer às curvas de refrigeração já adotadas como mais eficientes para espécie, visto que a temperatura ideal é de 5°C no entanto alguns animais alguns ganhões apresentam bom índices com temperatura próximas a 15°C (AURICH, 2005).

Squires et al. (1999) correlacionam a queda de 50% na motilidade o dos espermatozoides com a redução de 10°C, e manutenção de 10% do metabolismo para se manterem viáveis a 5°C.

Province et al. (1985) verificou que o sêmen estocado a 20 e 5°C armazenado por 36 horas apresentou valores maiores de motilidade do que os armazenados a 10 e 5°C. Em

contrapartida Varner et al. (1989) constataram em trabalho realizado que a estocagem a 4 e 5°C por 24 horas obteve maior motilidade espermática que entre 20 e 25°C.

O estresse oxidativo é favorecido devido à alta concentração de ácidos graxos na membrana plasmática desta célula (AURICH, 2005). Ficando assim exposto a desestabilização pelos radicais livres gerado pela própria célula espermática (BALL et al., 2001).

Alguns ganhões respondem melhor a estocagem do sêmen a 15°C por 24 horas do que a 20°C, com maior viabilidade espermática e índices de prenhes (BATELLIER et al., 2001). Já Love et al. (2005) constataram efeito positivo sobre a integridade da cromatina espermática a temperatura de 5°C, de 7 a 46 horas de armazenamento do sêmen quando comparado a temperatura de 20°C.

Para prolongar a sobrevivência da célula espermática durante processo de refrigeração e transporte, soluções diluidoras são adicionadas ao sêmen para com intuito de os proteger de condições desfavoráveis a sua sobrevivência, além de aumentar o volume da dose inseminante e auxiliar nas análises do sêmen (PICKETT; SHINER, 1994; BALL, 1998; DARENIUS, 1998).

3.4 Diluidores

O uso de diluidores de sêmen possui benefício de reduzir a concentração do plasma, controlar o PH e a osmolaridade, esses fatores fora dos padrões normais provocam queda na motilidade progressiva e danos irreversíveis a célula espermática (GRIGGERS et al., 2001).

Nunes et al. (2006) citam que os constituintes de diluidores mais utilizados são a base de leite ou gema de ovo podendo estar os dois associados, também são acrescentados aos meios antibióticos, tampões, açúcares e recentemente vem sendo investigados substâncias indutoras de funcionalidade da célula espermática e melhor preservação do ejaculado de ganhões com qualidade espermática inferior.

Em trabalho realizado, Ferreira (1993) comparou dois diluentes sendo uma base de gema de ovo e outro a base de lite em sêmen de asinino pelo método de refrigeração ativa entre 4 e 6°C, após 24 horas a amostra de sêmen a base de gema de ovo apresentou maior motilidade espermática total, progressivo vigor.

A ação protetora contra o choque térmico conferido pela gema do ovo ao espermatozoide se deve as lipoproteínas de baixa densidade (AMANN; GRAHAM, 1993). Em

contradição Pugliesi (2009) constatou que diluidor seminal citado por Foote (2002) composto por glicina-gema de ovo não foi eficaz em preservar a motilidade e vigor espermático, não possibilita a obtenção de bons índices de fertilidade do sêmen equino quando resfriado por 5°C por 24 horas.

Os componentes do leite conferem proteção à célula espermática devido exercer efeitos antioxidantes (BATELLIER et al, 2001). No entanto grande parte dos pesquisadores tem preferência pela gema de ovo como um dos constituintes do diluidor (PUGLIESI, 2009).

Em estudo Squires et al. (1989) testaram volumes de 10 e 100 ml na concentração de 250 milhões de espermatozoides móveis na inseminação artificial e obtiveram taxa de recuperação embrionária de 70,6% e 13,6% respectivamente. Corroborando com esse estudo, Nunes et al. (2006) que demonstraram bons índices de prenhes na inseminação artificial com volumes de 10 a 70ml.

Xavier (2006) obteve bons índices de fertilidade com doses inseminantes de 100 e 500 milhões de espermatozoides viáveis em doses de 3 e 15 ml respectivamente de sêmen diluído. Varner (2003) constatou que pode haver redução da concentração espermática com sêmen resfriado em até 100 vezes se for depositado perto da junção úterotubária, com pipeta flexível ou por meio de da inseminação histeroscópica.

3.5 Concentração espermática

Ao se trabalhar com sêmen equino refrigerado por mais de 36 horas Douglas-Hamilton et al. (1984) verifica uma queda de 50% da motilidade, utilizando assim uma concentração $1,0 - 1,5 \times 10^9$ espermatozoides totais onde no momento da inseminação acredita-se que a concentração deva ser 500 milhões.

Trabalho realizado por Ball (2005) preconiza uma concentração espermática de 500×10^6 de espermatozoides móveis a ser utilizado na inseminação artificial com sêmen refrigerado. Corroborando com trabalho de Pickett e Shiner (1994) que aconselha que ao se trabalhar com rebanhos desconhecidos a concentração espermática mínima com motilidade progressiva é 500×10^6 utilizada na inseminação artificial.

A possibilidade de uma concentração menor de espermatozoides na inseminação artificial é citada por Brandão et al. (2003) quando os espermatozoides são viáveis por maior

período de tempo no trato reprodutivo da égua. Entretanto Katila (2001) menciona que ainda não está bem esclarecida qual a influência do volume utilizado na inseminação sobre o transporte dos espermatozoides no trato reprodutivo da égua.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Rondônia – UNIR e após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos proprietários, foram utilizados 7 garanhões da raça quarto de milha, puros, com peso médio de 450 kg, com idades entre 3 e 8 anos, hígidos, alojados em ranchos localizados em Rolim de Moura na zona da mata rondoniense.

Os animais participantes do estudo estavam em plena atividade reprodutiva da estação de monta no período de colheita de amostras de sêmen. E também foram submetidos ao mesmo manejo alimentar e sanitário.

Amostras de sêmen foram obtidas em 4 momentos conforme descrito abaixo:

M0

M12

M24

M36

4.1 Procedimento experimental

Foi utilizado um manequim vivo manifestando cio, com intuito de provocar o garanhão a efetuar a monta para que possa ser feito o desvio do pênis para a vagina artificial. Sendo essa composta por um tubo rígido com válvula, mucosa de látex, cone flexível e tubo de colheita, recoberto por capa de térmica (figura 1), preenchida com água morna na temperatura entre 39 – 45° C.



Figura 1. Vagina artificial e seus constituintes.
Fonte: MIRANDA (2018, p.21).

Após observada a ejaculação abre-se a válvula da vagina artificial para a saída de água, dessa forma diminuirá a pressão exercida sobre o pênis para que não seja lesionado (Figura 2), em seguida adicionar um diluente extensor junto ao ejaculado.



Figura 2. Método de coleta com vaginal artificial, usando égua em estro como manequim.
Fonte: MIRANDA (2018, p.21).

Após o sêmen ser diluído foi colocado em uma caixa de transporte e armazenamento, denominado *container* com temperatura controlada e ser submetido a uma baixa gradativa de temperatura até atingir uma estabilidade de 5°C. Divididos e armazenados em recipiente de plástico (figura 3).

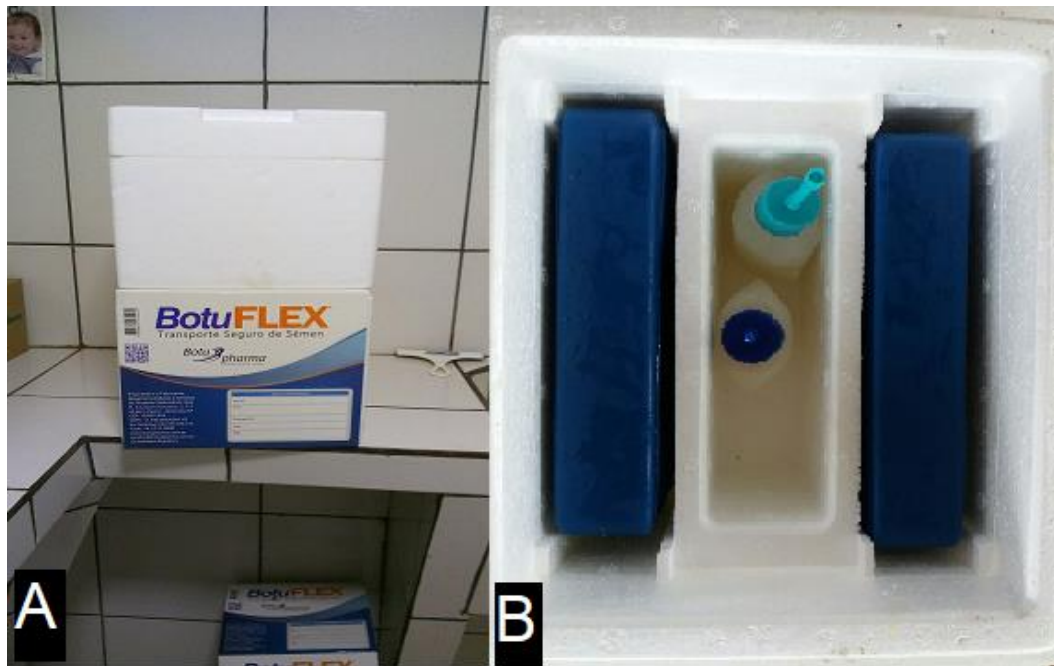


Figura 3. Dispositivo *container* (A); Visão interna do dispositivo (B).
Fonte: MIRANDA (2018, p.22).

As avaliações espermáticas foram feitas retirando pequenas quantidade de sêmen sendo a primeira após a coleta (hora 0) as demais amostras armazenadas, sendo avaliadas a cada 12 horas (0, 12, 24, 36) por 36 horas. No momento da avaliação procedia com aquecimento da amostra a 37°C em seguida adicionando uma gota em uma lamina de vidro aquecida e sobrepondo uma lamínula e com auxílio de um microscópio avaliando parâmetros de motilidade e vigor (figura 4), em seguida faz a diluição de 1 gota de sêmen para 19 de água destilada, preenchendo os retículos da câmara de *neubauer*² e posteriormente a contagem de 5 quadrados de cada reticulo, as médias obtidas em cada reticulo foram calculadas utilizando a equação 1.

$$[] = N \times V \times M \times 106 \quad (1)$$

² lâmina grossa de uso microscópico, com formato retangular e normalmente de vidro, com uma depressão no centro, utilizada para fazer contagem de células por unidade de volume de uma suspensão

Onde:

[]= Concentração

N= Número de espermatozoides

V= Volume

M= Motilidade



Figura 4. Momento da avaliação após coleta do sêmen fresco diluído.
Fonte: MIRANDA (2018, p.23).

4.2 Análise Estatística

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 7 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, através do programa estatístico SAS (2001), em que adotou-se $\alpha = 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios encontrados para características físicas do sêmen dos sete garanhões coletados como concentração, motilidade e vigor foram expressos na tabela 1.

Tabela 1. Análise de variância e regressão para valores médios de características físicas do sêmen.

Horas (H)	Variáveis		
	Concentração	Motilidade	Vigor
0	34120952,3	52,8	3,57
12	28685238,0	45,0	3,00
24	17186772,4	24,6	2,00
36	11844691,3	13,2	1,33
Coefficiente de Variação, %	92,8	80,8	39,7
Probabilidade (linear)	0,2491	0,0639	0,0001
Equação	$Y=23371070$	$Y=34,7$	$Y=3,63379-0,06434*H$
R ²	-	-	0,45

Fonte: MIRANDA (2018, p. 24)

Com relação à concentração, constatou-se que não houve diferença significativa nos quatro momentos avaliados ($P>0,05$), onde houve uma redução média de 23.371.070 espermatozoides/ml do momento da primeira avaliação a última, mantendo bons níveis de concentração coincido com resultados encontrados por Brandão et al. (2003) que, constatou níveis satisfatório de fertilidade com doses inseminastes de 200 a 400 milhões de espermatozoide com movimentos progressivos. Confirmando Varner et al. (1987) constataram superioridade na taxa de concentração de 25 milhões de espermatozoides/ml sendo ideal para sêmen diluído. A concentração espermática tem fundamental importância na utilização de sêmen resfriado possibilitando o fracionamento e aumentando o número de dose inseminante quando necessário e apresentar bons resultados para as outras análises subjetivas de avaliação motilidade e vigor.

Em relação a motilidade não houve diferença significativa nos quatro momentos avaliados ($P>0,05$) constatando decréscimo de 34,7% do momento da primeira avaliação na hora 0 a última hora 36. Equiparando-se com resultados encontrados por Douglas-Hamilton et al. (1984) ao constatarem a redução de 50% de motilidade do sêmen equino refrigerado por mais de 36 horas comparando doses inseminante. Fato que pode estar associado com regulação do influxo de cálcio que é afetado pelo resfriamento, cooperando para o início das reações fusogênicas entre as membranas plasmáticas e acrossomal externa (OLIVEIRA, 2013).

Evidenciou-se diferença significativa na avaliação de vigor espermática ($P < 0,05$) evidenciando redução de 0,06434 por hora decorrida. Fato que também diferenciou em pesquisa realizada por Pugliesi (2009) ao comparar dois diluidores, que juntamente ao sêmen foi resfriado a 5° C por 24 horas.

Vários estudiosos encontraram adequado resultado ao trabalharem com sêmen refrigerado a 5°c por 24 horas (PROVINCE, 1985; VARNER, 1989; FERREIRA, 1993; SQUIRES, 1999 FARRÁS, 2008). Em contrapartida Pugliesi (2009) obteve índices insatisfatórios de motilidade e vigor espermáticos de sêmen equino resfriado por 24 horas ao testar o diluidor seminal citado por Foote (2002).

Outros pesquisadores contataram a eficácia do uso da técnica de resfriamento na preservação do sêmen durante transporte e armazenamento por períodos superiores chegando a 48 horas mantendo a temperatura de 5°C (SILVA FILHO et al., 1997; VALE FILHO; VALLE; NASCIMENTO, 2011).

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que os garanhões avaliados não sofreram alterações significativas nos parâmetros de concentração e motilidade do sêmen após seu resfriamento a 5°C por 36 horas, tendo alterações significativas apenas no vigor espermático, obtendo taxas satisfatórias nos momentos 0, 12 e 24 horas para ambos os parâmetros. Sabendo-se que a motilidade, concentração e vigor são características que não possuem uma correlação única com a fertilidade, sendo necessário como teste confirmatório para capacidade de fecundação da célula espermática a avaliação de taxas de prenhes com esses sêmens.

REFERÊNCIAS

- ALVARES, J. G.; STOREY, B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 232-241, 1992.
- AMANN R.P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. *In*: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.715-745.
- AMIRAT, L. et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender **Theriogenology**. v. 61, p.895-907, 2004.
- AVANZI, B. R. et al. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 152-154, 2006.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.65-75, 2005.
- BALL, B. A. Evaluation and use of transported equine semen. *In*: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, 1998, Davis. **Proceedings...Davis:[s.n.]**, 1998b. p.18-24.
- BALL, B. A. Hysteroscopic and low-dose insemination techniques. *In*: Congresso Nazionale Multisala Sive, 11, 2005, Pisa. **Proceedings... Pisa**, 3p. 2005.
- BALL, B. A, Medina V, Gravance CG, Baumbe J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**, v.56, p.577-89, 2001.
- BATELLIER, F et al. Advances in cooled semen technology. **Anim Reprod Sci**, v.68, p.181-190, 2001.
- BOE-HANSEN, G. B.; ERSBØLL, A. K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. **Theriogenology** v 63:2006-2019, 2005.

BRANDÃO, F. Z. et al. Efeito da concentração espermática e do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.55, p.61-67, 2003.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA. **Estudo do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil.** Brasília: CNA, 2006.

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.

OBRINSKY, I., LULA, I. et al. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.291-296, 1993.

DOUGLAS- HAMILTON, D.H. et al. A field study of the fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, p.291-304, 1984.

FARRÁS, M. C. et al. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.693-699, 2008

FERREIRA M. F. L. **Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e fertilidade do sêmen de jumento.** 1993. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, 1993.

FOOTE, R.H. Within-herd use of boar sêmen at 5 °C, with a note on electronic monitoring of oestrus. **Reproduction Domestic Animal**, v.37, p.62-63, 2002.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. **Theriogenology**, v.63, p.1605-1616, 2005.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E.; Espermatozóide e plasma seminal. *In: Hafez ESE. Reprodução animal.* 7. ed. Barueri: Manole, 2004, p.97-110.

GRAHAM, J. Assessment of sperm quality. *In: International Symposium on Stallion Reproduction*, 3, 2001, Fort Collins. **Proceedings...** Fort Collins: ISSR, 2001, p.23.

GRIGGER, S. et al. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v.56, p.613-622, 2001.

HOPKINS, F. M.; MEADOWS, D. G. Cooled Shippd Horse Sêmen. *In* Equifacts. The University off Tennessee. Disponível em: <<https://extension.tennessee.edu/>>, 2003. Acesso em: 11 de junho de 2018

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.63, p.1354-1365, 2005.

KATILA, T. Sperm-uterine interactions: a review. **Anim Reprod Sci**, v.68, p.267-272, 2001.

LI, Y. H. et al. Crypreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa in a chemically defined extender. **Asian Journal of Andrology**, v.7, p. 139-144, 2005.

LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v.64, p.480-491, 2005.

LOVE, C. C. et al. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v.63, p.1584-1591, 2005.

MACHADO, M. S. et al. Efeitos de diferentes sistemas de transporte sobre a qualidade do sêmen refrigerado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 194 – 196, 2002.

MALMGREN, L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. **Theriogenology**, v. 50, p. 833-839, 1998.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Brasília. 2016.

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

NUNES, D. B. **Container (CP) para refrigeração e preservação do sêmen equino**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande- MS, 68p. 2006

PAPA F. O. et al. Inovações metodológicas na biotecnologia de refrigeração e congelamento de sêmen equino. *In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, 19, 2005, Angra dos Reis. *Anais...* Angra dos Reis; SBTE, p.19-27, 2005.

PICKETT, B. W.; SHINER, K. A. Recent developments in artificial insemination in horses. *Liv Prod Sci*, v.40, p.31-36, 1994.

POMMER, A. C.; RUTLANT, J.; MEYERS, S. A.; The role of osmotic resistance on equine spermatozoa function. *Theriogenology*, v.58, p.1373-1384, 2002.

PROVINCE, C. A. et al. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.23, p.925-934, 1985

PUGLIESI, G. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores**. 2009 103f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viscosa, Viscosa, MG, 2009.

ROCHA, A. S. **Efeito da associação da asolectina e fosfatidilcolina de soja em meio à base de gema de ovo sobre os parâmetros espermáticos e fertilidade de sêmen congelado de garanhões**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2012.

SILVA FILHO, J. M. **Aspectos do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial de éguas**. 1994. 408f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, MG

SILVA FILHO, J. M. et al. Fertilidade do sêmen equino diluído, resfriado e transportado. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 26, n. 6, p. 1134-1141, 1997.

SQUIRES, E. L.; BARNES, C. K.; ROWLEY, H. S. Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. *In: Annual Convention of American Association of Equine Practitioners*, 35, 1989, Boston. *Proceedings...* Boston: American Association of Equine Practitioners, 1989, p.25-30.

SQUIRES, E. L. et al. **Cooled and frozen stallion semen fort collins**: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999 p.1-38. (Bulletin, 9).

TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in mare. *Theriogenology*, v.52, p.461-471, 1999.

VALE FILHO, V. R.; VALLE, G. R.; NASCIMENTO, E. F. Patologia Espermática, p. 129 a 149. *In: Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. Ed. Guanabara Koogan (3^a ed.), Rio de Janeiro (RJ), 153 p. 2011.

VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; MELO, M. A.; MAGNAGO, L. G. P. Utilização de um container modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p.505-514, 1999.

VARNER, D. D.; BLANCHARD T. L.; MEYERS, P. J.; MEYERS, S. A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology*, v.32, n.4, p.515-525, 1989.

VARNER, D. D.; Technical considerations for cool transported equine semen. *In: Congresso Nazionale Multisala Sive*, 9, 2003, Pisa. *Proceedings...* 7p. 2003.

XAVIER, I. L. G. S. **Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen a fresco diluído, no corpo ou ápice do corno uterino, utilizando diferentes números de espermatozóides por dose inseminante.** 158 f. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.