

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

AMANDA RIBEIRO CHAGAS

**ANÁLISE DESCRITIVA DA MATURAÇÃO ESPERMÁTICAS EM POTROS
(*Equus caballus*)**

UBERLÂNDIA – MG

2021

AMANDA RIBEIRO CHAGAS

ANÁLISE DESCRITIVA DA MATURAÇÃO ESPERMÁTICAS EM POTROS
(Equus caballus)

Monografia apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Teresinha Inês de Assumpção

UBERLÂNDIA – MG

2021

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVO	6
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Testículo	6
3.2 Epidídimo	7
3.3 Maturação espermática	8
3.4 Técnicas de coleta de espermatozoides do epidídimo	9
3.5 Classificação dos espermatozoides	9
3.6 Técnicas para avaliação morfológica	10
4 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Animais	11
4.2 Coleta do sêmen	11
4.3 Análise morfológica do sêmen	13
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
6 CONCLUSÕES	16
REFERÊNCIAS	17

RESUMO

A conservação do material genético pode ser feita através da recuperação de espermatozoides do trato genital de equinos *post mortem* ou orquiectomizados. O objetivo desse estudo foi caracterizar os aspectos morfológicos de espermatozoides de potros obtidos dos testículos, cabeça/corpo do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente. Foram coletados tratos reprodutivos de 3 animais. Os testículos receberam um corte transversal e foram lavados com solução de Dulbecco modificado (PBS), a cabeça/ corpo e cauda do epidídimo foram fatiados e também lavados com a mesma solução, já no ducto deferente foi realizado a técnica de fluxo retrógrado também com PBS. A morfologia espermática foi avaliada em lâminas coradas com vermelho congo e o teste supravital com eosina-nigrosina. Na análise morfológica espermática foi identificado um número elevado de células anormais, sendo 37,33% no testículo, 40,33% na cabeça e corpo do epidídimo, 32,66% na cauda do epidídimo e 43,5% no ducto deferente. O teste supravital mostrou um aumento nas células vivas ao longo do trato reprodutivo com 11% no testículo, 30% na cabeça e corpo do epidídimo, 69% na cauda do epidídimo e 75% no ducto deferente. As técnicas utilizadas se mostraram eficientes para obtenção de espermatozoides em equinos e as análises evidenciaram a importância do epidídimo na maturação e seleção espermática na espécie.

ABSTRACT

The conservation of genetic material can be done through the recovery of sperm from the genital tract of *post mortem* or orchiectomized equine. The aim of this study was to characterize the morphological aspects of foal sperm obtained from the testes, head/body of the epididymis, tail of the epididymis and vas deferens. Reproductive tracts from 3 animals were collected. The testicles were cross-sectioned and washed with modified Dulbecco's solution (PBS), the head/body and tail of the epididymis were sliced and also washed with the same solution. . Sperm morphology was evaluated on slides stained with Congo red and the supravital test with eosin-nigrosin. In the morphological analysis of sperm, a high number of abnormal cells was identified, with 37.33% in the testis, 40.33% in the head and body of the epididymis, 32.66% in the tail of the epididymis and 43.5% in the vas deferens. The supravital test showed an increase in live cells along the reproductive tract with 11% in the testis, 30% in the head and body of the epididymis, 69% in the tail of the epididymis and 75% in the vas deferens. The techniques used proved to be efficient for obtaining sperm in horses and the analyzes showed the importance of the epididymis in sperm maturation and selection in the species.

1. INTRODUÇÃO

O cavalo tem mantido, ao longo das eras, uma estreita relação com o homem. O cenário atual da criação de cavalos surpreende pela abrangência das atividades que esta espécie é capaz de gerar, e desta maneira refina a indústria equina e demonstra o importante papel socioeconômico que esta apresenta. O Brasil dispõe atualmente de um rebanho de equinos superior a cinco milhões de animais, que reúne cavalos de lida, de raça, lazer e competição. A atividade movimenta anualmente R\$ 16,15 bilhões e gera 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos, sendo responsável, assim, por mais de três milhões de postos de trabalho (MAPA, 2016).

A gradativa demanda por animais de elevado padrão racial torna iminente a implantação de técnicas que possibilitam intensificar o aproveitamento de bons reprodutores, de modo a impulsionar o aspecto qualitativo do plantel das variadas raças. O conhecimento das características reprodutivas e seminais de um animal é fundamental para se adotar biotécnicas de reprodução objetivando aumentar a eficiência reprodutiva da espécie (PAPA, 2020).

O sistema reprodutor masculino é formado pelos testículos, epidídimos, ductos eferente e deferente e as glândulas anexas. Os epidídimos nos equinos estão acoplados à superfície dorsolateral dos testículos, com sua cabeça localizada na borda cranial e a cauda na borda caudal (CBRA, 2013). Os espermatozoides são produzidos nos testículos, e após sua formação, eles necessitam passar por um processo de maturação para que sejam capazes de fertilizar o oócito. A maturação espermática se inicia na cabeça do epidídimo e continua na região do corpo, envolve intensas alterações morfológicas e bioquímicas, garantindo a formação de espermatozoides aptos a reconhecer e fertilizar o oócito no trato reprodutor feminino (OLIVA et al., 2009).

Durante a passagem pelo epidídimo, ocorre a remoção de espermatozoides com anormalidades por fagocitose nas células epiteliais dos ductos eferentes, assim como a migração da gota citoplasmática do colo espermático para o final da peça intermediária do flagelo (BASKA et al., 2008). Rao et al. (1980) afirmam que a taxa de remoção de células patológicas parece depender principalmente da qualidade dos espermatozoides que saem do testículo.

A recuperação de espermatozoides do epidídimo de animais mortos ou pós orquiectomia é uma técnica extremamente interessante para obter material genético, pois estes gametas são capazes de resistir a diferentes técnicas de criopreservação, podendo ser utilizados na inseminação artificial, produção *in vitro* de embriões, entre outras, além de ser uma boa fonte de material para estudos morfológicos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2006; MOTA-FILHO e SILVA, 2012). Esses espermatozoides recuperados poderão ser utilizados na reprodução de espécies ameaçadas ou em

animais de alto valor zootécnico (THOMASSEN e FARSTAD, 2009). Além disso, o estudo das mudanças ocorridas no espermatozoide durante o trajeto pelo epidídimo permite a melhoria de biotécnicas reprodutivas (MA et al., 2013). Assim, é necessário conhecer as características morfológicas dos espermatozoides nas diversas porções do trato reprodutivo para melhor aproveitamento dos mesmos e para se ter sucesso em técnicas de reprodução assistida nos equinos.

2. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi caracterizar os aspectos morfológicos dos espermatozoides de potros obtidos dos testículos, cabeça/corpo e cauda do epidídimo e ducto deferente, a fim de observar a maturação espermática nestes animais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Testículo

Segundo SAMPER (1997), o testículo é um órgão reprodutivo masculino com formato ovoide e em número de dois, localizados de forma horizontal dentro do escroto. O tamanho do testículo irá variar de acordo com o tamanho do animal e refletirá na produção de espermatozoides diária de cada animal (LOVE et al, 1991). O testículo possui duas grandes funções: produção de hormônios (ação endócrina) e produção de espermatozoides (ação exócrina). Para essas ações serem eficientes, o órgão necessita de um mecanismo de termorregulação que reduzirá de 3 a 5 graus a temperatura do corpo para uma espermatogênese normal, o que é realizada através do plexo pampiniforme que possui um mecanismo de troca de calor contracorrente que faz com que o sangue arterial resfrie antes de chegar nos testículos, pelo músculo cremaster que possibilita contrair e relaxar o órgão dependendo da temperatura no ambiente e pelas glândulas sudoríparas presentes na pele do escroto (BARROS et al., 2011).

A produção de espermatozoides ocorre através das células espermatogênese do túbulo seminífero que irão se dividir e diferenciar para então formar as células espermáticas, esse processo é chamado de espermatogênese. Já a ação endócrina é realizada através das células intersticiais de Leydig localizadas entre os túbulos seminíferos e tem a função de secretar os hormônios masculinos nos vasos linfáticos e veias testiculares, sendo o principal deles a testosterona (HAFEZ e HAFEZ, 2004). A espermatogênese ocorre em três etapas: fase de proliferação ou espermatocitogênese, fase meiótica e a espermiogênese. Na fase proliferativa, ocorre todas as divisões mitóticas das espermatogônias (células diplóides), levando a um grande número de espermatogônias do tipo B. Já

na fase meiótica, ocorre a redução do número de cromossomos tornando a célula haploide, ocorrendo também a replicação do DNA e crossing over nos espermatócitos primários e secundários, o que é muito importante para a diversidade genética. Por fim ocorre a espermiogênese formando o espermatozoide propriamente dito, onde não se tem mais divisão celular, e a espermátide haploide indiferenciada e arredondada sofre várias transformações para se tornar uma célula altamente diferenciada com cabeça (material celular) e um flagelo (RUA et al., 2014).

3.2 Epidídimo

O epidídimo está localizado dorsalmente ao testículo nos equídeos, sendo um órgão monotubular e alongado, dividido por cabeça, corpo e cauda. Tem a função de maturar as células espermáticas e transportar os espermatozoides do ducto eferente até o ducto deferente (AMANN, 2011). Segundo França et al. (2005), a duração do trajeto epididimário em equinos pode variar de cinco a quatorze dias e o deslocamento espermático ocorre devido à presença no ducto de uma musculatura lisa capaz de realizar contrações peristálticas e dos cílios presentes no epitélio. No polo cranial do testículo tem-se a cabeça do epidídimo que possui células ciliadas que auxiliam na absorção de fluídos, aquisição de motilidade e no transporte dos espermatozoides. O corpo se assemelha a uma fita com células baixas e pouco ciliadas e se localiza na face laterodorsal do testículo, com a função de absorver fluídos, transportar e maturar os espermatozoides, que nessa etapa irão adquirir capacidade de fecundação. A cauda do epidídimo se localiza no polo caudal do testículo, possui células baixas e não ciliadas e é o principal reservatório de espermatozoides prontos para a ejaculação (AMANN e GRAHAM, 2011).

Durante a passagem do espermatozoide pelo epidídimo algumas características bioquímicas são modificadas, como a condensação da cromatina, a troca de fosfolipídios e colesterol, modificações na composição das proteínas da superfície da membrana plasmática, o que permite que o espermatozoide esteja pronto para realizar o seu objetivo, a fecundação do oócito (DACHEUX e PAQUIGNON, 1980).

De acordo com Bedford (1994), nos mamíferos, o epidídimo possui diversas funções: promove a concentração do sêmen através da reabsorção de fluídos dos túbulos seminíferos, elimina os espermatozoides defeituosos, realiza o transporte, maturação e armazenamento das células. O volume e número de espermatozoides armazenado na cauda do epidídimo de touros e garanhões representa a capacidade suficiente para até 10 ejaculados sucessivos, dependendo de diversos fatores, como idade, tamanho e atividade reprodutiva dos animais.

É possível correlacionar, de acordo com a região do epidídimo, algumas características morfológicas com as propriedades funcionais. A cabeça e corpo do epidídimo estão relacionados com

a aquisição da habilidade progressiva dos espermatozoides e a capacidade de fecundar, já a cauda associa-se com o armazenamento de espermatozoides, sendo que a aquisição da capacidade de fecundação, quando em condições normais, finaliza-se somente quando os espermatozoides chegam na cauda do epidídimo (PINHO et al., 2015). O espermatozoide ao adquirir a habilidade de fertilização durante o trânsito no epidídimo é o que define a maturação espermática propriamente dita (ROBAIRE et al., 2006).

Naden et al. (1990) afirmam que para se saber o desenvolvimento sexual em animais jovens é necessário a busca por células espermáticas no epidídimo. Foi relatado que em equinos aos dois anos de idade, a concentração de espermatozoides em toda a porção do epidídimo foi acima de seis bilhões, o que é bem inferior a concentração em garanhões adultos relatados por outros pesquisadores (AMANN e GRAHAM, 2011).

3.3 Maturação espermática no epidídimo

Os espermatozoides, quando saem do testículo, ainda não são capazes de fertilizar o oócito, portanto, ao passarem pelo epidídimo, eles vão sofrendo alterações importantes em sua morfologia, passando a ser capazes de fecundar ao final do percurso. As principais mudanças envolvem alterações funcionais na habilidade de se ligar à zona pelúcida e no padrão da atividade do flagelo. Essas mudanças são refletidas na ligação de lecitinas, distribuição de partículas intramembranas, carga elétrica da superfície da célula, fluidez da membrana, ligação de anticorpos e composição de proteínas e lipídeos. (GUASTI et al., 2012). Durante o trânsito epididimário, ocorrem muitas modificações nas características bioquímicas, como a condensação da cromatina, modificações na composição das proteínas de superfície da membrana plasmática, trocas de colesterol e fosfolipídeos (GRANEMANN, 2006).

No lúmen epididimário há síntese de proteínas e secreções epididimais, que são reguladas por andrógenos provenientes do testículo, resultando em uma mistura de proteínas epididimais que irão interagir com os espermatozoides presentes no lúmen. Esses espermatozoides, durante o processo de maturação, dependem de uma sequência de modificações espermáticas resultantes da interação dos diversos fluidos intraluminais com a superfície do espermatozoide (RODRIGUEZ et al., 2001).

Durante o trânsito no epidídimo, os espermatozoides sofrem, também, significantes modificações na cromatina e núcleo espermático. Além disso, a gota citoplasmática migra da porção intermediária para a porção distal do flagelo. A presença de gotas citoplasmática proximal em

consideráveis quantidades nos espermatozoides ejaculados reflete a imaturidade do animal (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

3.4 Técnicas de coleta de espermatozoides no epidídimo

Segundo Granemann (2006), foram desenvolvidas e aperfeiçoadas diversas técnicas para coletar sêmen em equinos, como a vagina artificial, camisa peniana (camisa-de-vênus), esponja, fármacos indutores da ejaculação, colheita direta da cavidade vaginal ou uterina e colheita diretamente do epidídimo. Para a coleta de sêmen no epidídimo equino em animais que foram a óbito ou para animais que foram castrados, temos três técnicas: o método de flutuação, técnica de perfusão e a técnica de fluxo retrógado na cauda do epidídimo.

A técnica mais indicada para coletar espermatozoides da cauda do epidídimo de equinos é o fluxo retrógado. Esta técnica foi descrita por Garde et al. (1994) e consiste em separar o complexo testículo-epidídimo com remoção de todo o tecido que recobre o epidídimo, o segmento é estendido verticalmente e com uma seringa injeta-se o líquido e se faz uma pressão nos vasos deferentes o que fará com que os espermatozoides presentes sejam levados até o corte feito na junção entre a cauda e o corpo do epidídimo. As amostras obtidas por essa técnica apresentam-se menos contaminadas e de melhor qualidade seminal ao comparar com as demais técnicas. Porém, um fator limitante é que deve ser usada apenas para grandes animais devido ao tamanho do epidídimo e por ser mais complexa que as demais técnicas (MARTINEZ- PASTOR et al., 2006). Segundo Bruemmer (2006), utilizando a técnica de fluxo retrógado é possível obter uma recuperação espermática muito boa, em média 15 a 20 bilhões de espermatozoides por epidídimo no equino.

3.5 Classificação morfológica do espermatozoide

As alterações morfológicas dos espermatozoides podem ser classificadas de acordo com a origem em defeitos primários, que acontecem no testículo durante a espermatogênese, e defeitos secundários, que ocorrem no epidídimo durante a maturação espermática e os defeitos terciários que acontecem após a liberação do espermatozoide (BARTH E OKO, 1989).

A classificação mais utilizada é a binária em defeitos maiores ou menores. Os defeitos maiores estão relacionados com infertilidade e doenças testiculares e os defeitos menores se referem a defeitos de menor impacto na fertilidade do animal. Para interpretar o espermograma, é preciso levar em consideração os percentuais tanto dos defeitos maiores quanto dos menores. Para fazer a avaliação da morfologia espermática, se analisa os defeitos de forma e estrutura, podendo classifica-los em defeitos

de cabeça e cauda (peça intermediária e principal). Os defeitos maiores na cabeça são: acrossoma, subdesenvolvido, cabeça isolada anormal, contorno anormal, estreita na base, piriforme, pequena anormal e *pouch formation*. Os defeitos maiores de peça intermediária são: gota citoplasmática proximal, pseudogota e peça intermediária rudimentar. Temos também na peça principal a cauda fortemente dobrada. As formas teratológicas também são classificadas como defeitos maiores. Já os defeitos menores são: cabeça delgada, gigante, pequena normal, cabeça isolada normal, cauda dobrada, gota citoplasmática distal e cauda enrolada (CBRA, 2013).

3.6 Técnicas para avaliação morfológica

Os métodos convencionais para estudar a morfologia espermática são caracterizados pela avaliação microscópica das alterações nos espermatozoides (FERNANDES et al., 2009). As características morfológicas espermáticas podem ser analisadas através de esfregaços corados (corantes: Wright, Rosa de Bengala, Giemsa, Eosina-nigrosina, Karras, Vermelho Congo, entre outros) ou pela técnica de câmara úmida. Quando se tem disponível apenas a microscopia óptica comum deve-se utilizar a técnica do esfregaço corado, pois o espermatozoide é uma célula translúcida, sem a presença de um corante não se consegue ver nitidamente o contorno celular. Na técnica de câmara úmida os espermatozoides não são corados e deve-se utilizar somente na microscopia de contraste de fase ou microscopia de contraste de interferência diferencial, pois elas destacam os contornos celulares (ARRUDA et al, 2011).

O preparo dos esfregaços corados é feito da seguinte maneira: logo após a coleta do sêmen, deve-se preparar de dois a três esfregaços onde a gota de sêmen deve ser puxada sobre a lâmina base, pois assim evitam-se lesões nos espermatozoides, como desprendimento de cabeça e fraturas das peças intermediária ou principal. Em seguida procede-se a coloração de acordo com o protocolo de cada corante e a lâmina deve ser analisada no microscópio com aumento de 1000x vezes e deve-se contar e anotar os defeitos individualmente de no mínimo 200 células (CBRA, 2013).

Para realizar a preparação úmida, deposita-se em um frasco com 1 ml de solução formol-salina tamponada aquecido à 37°C, a quantidade necessária de gotas do sêmen até ter uma consistência leitosa. Em uma lâmina coloca-se 1 gota do sêmen e recobre-se com uma lamínula, analisando em um microscópio de interferência de fase ou de contraste de fase com aumento de 1000x. Avalia-se a morfologia espermática de no mínimo 200 células, analisando os defeitos de forma e estrutura e os classificando como defeito de cabeça e cauda (CBRA, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados testículos/epidídimos de três animais potros com idades entre 20 e 30 meses, não selecionados, provenientes do Frigorífico Prosperidade, Araguari, MG. Inicialmente seriam utilizados 10 animais para o estudo, porém, teve-se grande dificuldade em obter amostras pois no frigorífico a grande maioria dos animais já eram castrados ou idosos.

4.2 Coleta do sêmen

Após a aquisição do conjunto testículo/epidídimos dos animais estes foram levados para o Laboratório de Reprodução Animal, sendo transportados em uma temperatura em torno de 37°C.

Em seguida foi feita uma lavagem dos órgãos com soro fisiológico, para remover qualquer resíduo de sangue e dissecados (figura 1).



Figura 1. Dissecação e preparação dos testículos, epidídimos e ducto deferente dos equinos.

As estruturas foram separadas em: testículos, cabeça/corpo do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente, como mostra a figura 2.

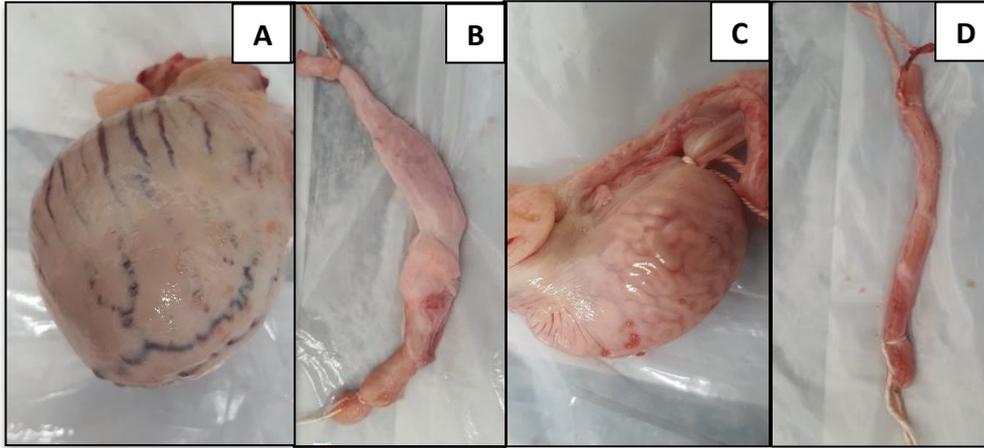


Figura 2 – Porções do trato reprodutivo do potro. Testículos (A), cabeça/corpo do epidídimo (B), cauda do epidídimo (C) e ducto deferente (figura D).

Os testículos (figura 3A) receberam um corte transversal no terço médio e foram lavados internamente com solução de PBS (Dulbecco modificado). A cabeça/corpo do epidídimo recebeu diversos cortes (figura 3B), que foram pressionados e lavados com a mesma solução com o objetivo de liberar os espermatozoides. Já na cauda do epidídimo e no ducto deferente utilizou-se a técnica de fluxo retrógrado, onde foi acoplada na extremidade proximal do ducto deferente uma seringa e agulha e injetado o PBS, de forma que os espermatozoides foram carreados pelo líquido e recuperados na outra extremidade, o mesmo procedimento feito com a cauda do epidídimo (MONTEIRO, 2013).

Os líquidos resultantes das lavagens foram recolhidos e identificados em tubos de 2ml. Foram retiradas as amostras para o teste supravital e em seguida foi acrescentado 1 ml de formol salina em cada frasco para preservação das células.

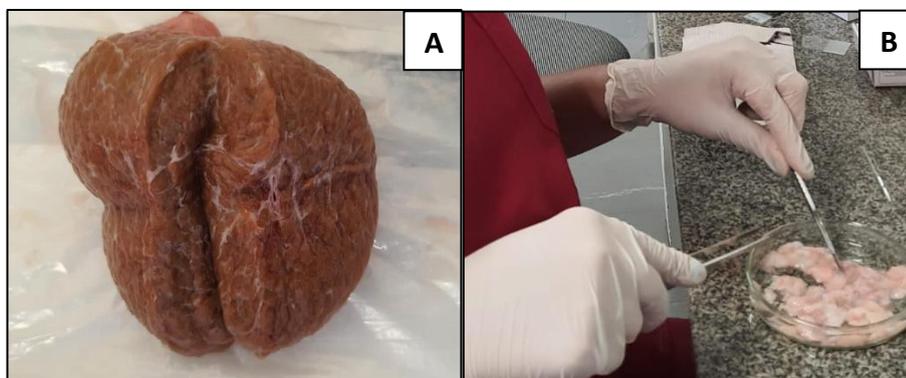


Figura 3. Preparação das estruturas para coleta do sêmen dos potros. A - Corte transversal em testículo. B - Fatiamento da cabeça/corpo do epidídimo.

4.3 Análise morfológica dos espermatozoides

A avaliação morfológica do sêmen foi realizada através das lâminas coradas com vermelho congo (CBRA, 2013). Para a preparação das lâminas foi coletado uma gota de cada parte a ser analisada, fazendo o esfregão e coloração, da seguinte forma: após o esfregão secar ele foi imerso em corante vermelho congo por 1,5 minutos, lavadas e secas novamente. Em seguida, mergulhou em violeta por 1 minuto, lavadas e secas. Análise em microscopia óptica sob aumento de 1000 X onde foram contadas um total de 200 células, verificando a porcentagem de anormalidades dos espermatozoides em sua cabeça, peça intermediária e cauda.

O teste supravital foi feito através da coloração de espermatozoides utilizando eosina-nigrosina, preparada com corante Botuvital®, Botupharma, Botucatu/SP. Para a preparação da lâmina foi colocado uma gota de sêmen e uma de corante, feito o esfregão e após secagem a avaliação em microscopia óptica. A avaliação foi feita em 100 células, verificando a porcentagem de vivos e mortos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As técnicas de corte transversal de testículo, fatiamento da cabeça/corpo do epidídimo e de fluxo retrógrado utilizada para cauda do epidídimo e o ducto deferente se mostraram eficientes em relação ao volume e concentração das células espermáticas recuperadas para a pesquisa.

Foi encontrada uma grande quantidade de espermatozoides nas amostras de cauda de epidídimo e menor concentração em cabeça/corpo do epidídimo. Em garanhões, dependendo do tamanho, idade e atividade reprodutiva do animal, a cauda do epidídimo é capaz de armazenar quantidade suficiente de espermatozoides para até 10 ejaculados (SULLIVAN et al., 2007).

A tabela 1 mostra a porcentagem média dos defeitos encontrados na análise espermática do testículo, cabeça/ corpo do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente.

Tabela 1 – Médias das alterações morfológicas dos espermatozoides verificadas no testículo, cabeça/corpo do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente em potros (em porcentagem).

ANORMALIDADE	TESTÍCULO	CABEÇA E CORPO	CAUDA	DUCTO DEFERENTE
Cabeça isolada	6 ± 2,66	9,33 ± 3,77	5 ± 3,33	3 ± 2
Cauda dobrada	0,6 ± 0,88	2,66 ± 1,77	1 ± 0,66	2 ± 1
Cauda enrolada	2,6 ± 1,11	5,33 ± 2,44	5,66 ± 5,55	10,5 ± 0,5
Cauda fortemente enrolada	0,66 ± 0,44	-	1,66 ± 2,22	0,5 ± 0,5
Contorno anormal	2,33 ± 3,11	1 ± 0	-	1 ± 0
Defeito de PI	3 ± 2,66	-	-	1 ± 1
Gota citoplasmática distal	4 ± 2,66	7 ± 5,33	8,66 ± 3,11	12 ± 3
Gota citoplasmática proximal	18 ± 2	13,66 ± 1,11	10,66 ± 2,44	13,5 ± 6,5
Pequeno normal	-	0,66 ± 0,44	-	-
Retroaxial	-	0,66 ± 0,88	-	-
TOTAL	37,33	40,33	32,66	43,5

A porcentagem média de defeitos encontrados foi de 37,33% no testículo, 40,33% na cabeça e corpo do epidídimo, 32,66% na cauda do epidídimo e 43,5% no ducto deferente. Houve uma redução no total de defeitos na cauda do epidídimo, porém verificamos uma pequena elevação não significativa no ducto deferente. Os principais defeitos encontrados foram a gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal, cabeça isolada normal, cauda dobrada e cauda enrolada (tabela 1 e figura 4).

A figura 4 mostra as principais alterações morfológicas verificadas nos espermatozoides dos animais estudados.

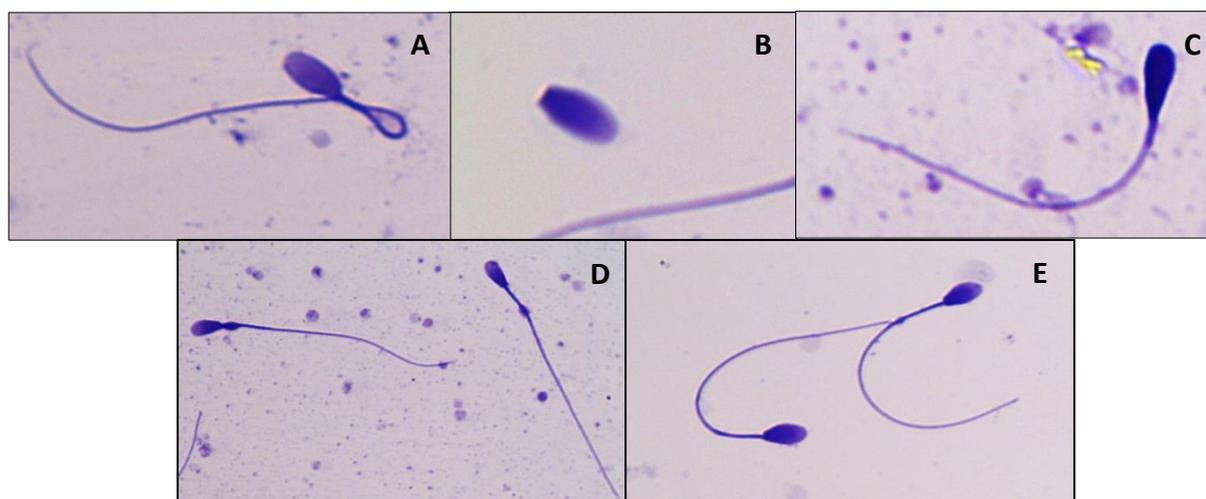


Figura 4 - Alterações morfológicas verificadas em maior quantidade nos espermatozoides dos potros. A - Cauda enrolada, B - Cabeça isolada normal C – Contorno anormal, D - Gota citoplasmática proximal e distal, E – Cauda dobrada.

É possível perceber que a gota citoplasmática proximal (tabela 1) foi o defeito mais encontrado em todas as estruturas, porém, nota-se que quantidade vai reduzindo. No testículo tinha-se 18% de gota citoplasmática proximal e no ducto deferente reduziu-se para 13,5%. Isso se dá devido a maturação do espermatozoide durante o trânsito epididimário. Nota-se que a quantidade de gota citoplasmática distal é inversamente proporcional a gota citoplasmática proximal, pois no testículo havia apenas 4% de gota citoplasmática distal e no ducto deferente aumentou para 12%, isso acontece porque durante a maturação espermática a gota migra da região proximal para a região distal da peça intermediária do espermatozoide ou é perdida com a aquisição da motilidade. O mecanismo de eliminação da gota citoplasmática ainda não é totalmente entendido, mas acreditam que estão relacionadas as atividades enzimáticas ou cisalhamento mecânico (SOARES e NEVES, 2020). Segundo os mesmos autores, esta movimentação da gota também influencia no aumento de defeitos de cauda durante a maturação espermática, achado este semelhante ao encontrado nesse estudo, pois no testículo haviam 2,6% de cauda enrolada e no ducto deferente havia 10,5%.

Na avaliação espermática dos semên deste estudo foi possível identificar dentre as porções estudadas uma média de 38,45% de defeitos, semelhante ao encontrado por Silva (2017) em semên fresco de garanhões. De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), o percentual de defeitos totais no sêmen da espécie equina não deve ultrapassar 30%. O elevado percentual de patologias espermáticas encontradas nos animais deste estudo talvez seja devido ao fato dos animais serem jovens e não terem sido selecionados previamente para reprodução.

A figura 5 mostra as porcentagens de defeitos morfológicos verificadas nas quatro porções analisadas nos animais estudados.

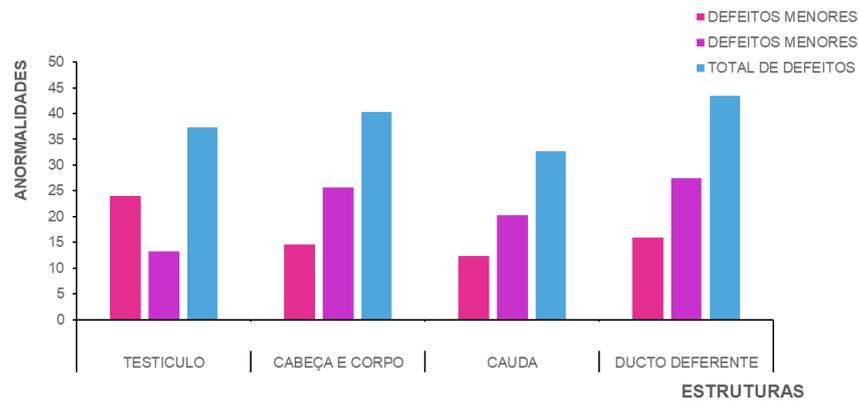


Figura 5 - Defeitos maiores, defeitos menores e totais de defeitos no testículo, cabeça/ corpo do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente em potros.

A figura 6 mostra o resultado do teste supravital observados nas quatro porções estudadas do trato reprodutivo masculino em potros.

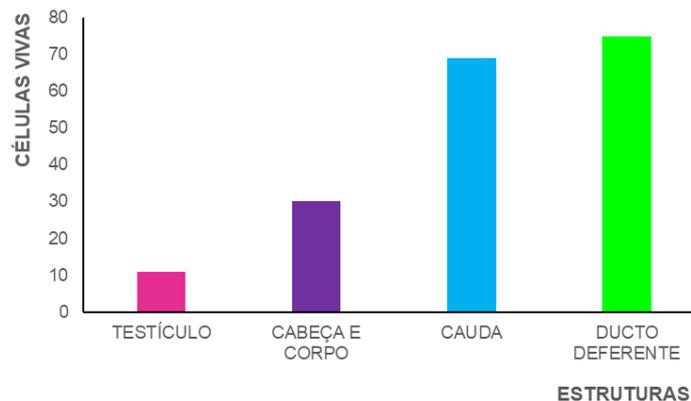


Figura 6 – Total de Espermatozoides vivos no testículo, cabeça/corpo e cauda do epidídimo e ducto deferente de potros (em porcentagem).

Observamos na figura 6 que o número de espermatozoides mortos no testículo tem um número elevado de 89% (11% vivos) e essa quantidade vai reduzindo gradualmente na cabeça/ corpo do epidídimo, cauda do epidídimo até o ducto deferente com 25% de células mortas (75% vivas). Esses resultados eram esperados, pois sabe-se que o epidídimo durante a maturação espermática faz a seleção celular, o que leva a remoção de células espermáticas defeituosas durante o trajeto até a cauda do epidídimo, o que também afirma Varesi et al., 2013.

6. CONCLUSÕES

As técnicas de lavagem e fatiamento utilizadas para obtenção das amostras de sêmen para a análise morfológica e teste supravital mostraram-se eficientes. Na análise morfológica foi possível observar a

maturação espermática através da variação das anormalidades encontradas do testículo até o ducto deferente dos animais, confirmado também pelo teste supravital.

REFERÊNCIAS

AMANN, R.P. Physiology and endocrinology. In: MCKINNON A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER D. D. **Equine Reproduction**. Boston: Ed. Wiley-Blackwell, 2 ed., p.715-745, 2011.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoa function. In: MCKINNON A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER D. D. **Equine Reproduction**. Boston: Ed. Wiley-Blackwell, 2 ed., p.1053-1084, 2011.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

BARROS, C.M.Q.; OBA, E.; SIQUEIRA, J.B.; LEAL, L.D.S.; KASTELIC, J.P. Efeitos da diminuição do fluxo sanguíneo testicular nas temperaturas escrotal superficial, escrotal subcutânea, intratesticular e intravascular em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.1, p.49-54, 2011.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989, 285p.

BASKA, K.M.; MANANDHAR, G.; FENG, D.; AGCA, Y.; TENGOWSKI, M.W.; SUTOVSKY, M.; YI, Y.J.; SUTOVSKY, P. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. **Journal of cellular physiology**, v. 215, n. 3, p. 684-696, 2008. <https://doi.org/10.1002/jcp.21349>

BEDFORD, J.M. The status and the state of the human epididymis. **Human Reproduction**, v.9, p.2187-2199, 1994. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138416>

BRUEMMER, J.E., REGER, H., ZIBINSKI, G.; SQUIRES, E.L. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.405-407, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00838-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00838-5)

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 3 ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013, 104 p.

DACHEUX, J.L.; PAQUIGNON, M. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. **Reproduction and Nutrition Development**, v.20, n.4, p.1085-1099, 1980. <https://doi.org/10.1051/rnd:19800617>

FERNANDES, C.E.; OLIVEIRA, A.R.; MIRANDA, P.D.A.B.; LOPES, S.D.C.P.; SILVA MORAES, S.; GRAÇA MORAIS, M.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Alterações na morfologia espermática em touros de corte com e sem suplementação de zinco na mistura mineral. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.4, p.1074-1083, 2009.

FRANÇA, L.; AVELAR, G.; ALMEIDA, F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v 63, p 300-318, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.014>

GARDE, J.; AGUADO, M.; PEREZ, S.; GARRIDO, D.; PEREZ-GUZMAN, M.; MONTORO, V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from *post mortem* rams. **Theriogenology**. v.41, p.2003, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80113-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80113-X)

GRANEMANN, L.C. **Avaliação comparativa do sêmen equino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós orquiectomia**. 2006. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.2, p. 169-180, 2012.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Editora Manole. 7 ed., p. 97-110, 2004.

LOVE, C.C.; Garcia, M.C.; Riera, F.R.; Kenney, R.M. Use of testicular volume to predict daily sperm output in the stallion. **Proceedings of the Annual Convention - American Association of Equine Practitioners**, p.15-21, 1991.

MA, L.; YU, H.; NI, Z.; HU, S.; MA, W.; CHU, C.; LIU, Q.; ZHANG, Y. Spink13, an epididymis-specific gene of the Kazal-type serine protease inhibitor (spink) Family, is essential for the acrosomal integrity and male fertility. **Journal Biology Chemical**, v.288, n.14, p.10154-10165, 2013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445866>

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Brasília: MAPA, 2016, 56 p.

MARTINEZ-PASTOR, F.; MACIAS, V.G.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v.65, p.471-485, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.045>

MONTEIRO, G.A. **Criopreservação e fertilidade de espermatozoides do ejaculado e recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subférteis**. 2013. 263 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2013.

MOTA-FILHO, A.C.; SILVA, L.D.M. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinária Brasileira**, v.6, n.1, p.1-8, 2012.

NADEN, J.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p 167-176, 1990. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880167>

OLIVA, S.U.; RINALDO, P.A.; STUMPP, T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, p.419-425, 2009. <https://doi.org/10.15343/0104-7809.20094419425>

PAPA, F.O. **Reprodução de Garanhões**, 1 ed., São Paulo: Editora MedVet, 2020, 336 p.

PINHO, R.O.; NEVES, J.G.S.; MONTES, J.C.; FREITAS, B.W.; MARTINS, L.F.; CASTILHO, E.F.; CAMILO, B.S.; GUIMARÃES, J.D. Maturação espermática durante o trânsito epididimário em um garanhão. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v.13, n.25, p. 1-9, 2015.

RAO, A.R.; BANE, A.; GUSTAFSSON, B.K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 1980. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(80\)90129-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(80)90129-6)

ROBAIRE, B.; HINTON, B.T.; ORGEBIN-CRIST, M.C. The Epididymis. In: NEILL J.D. (Ed.). Knobil and Neill's. **Physiology of Reproduction**, 3 ed., Elsevier, p. 1071-1148, 2006. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50027-0>

RODRIGUEZ, C.M.; KIRBY, J.L.; HINTON, B.T. Regulation of gene transcription in the epididymis. **Reproduction**, v.122, p.41-48, 2001. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220041>

RUA, M.A.S., QURINO, C.R.; PACHECO, A.; RIBEIRO, M.S.; BARTHOLAZZI JUNIOR, A.; VEJA, W.H.H.O. Espermatogênese em eqüinos. PUBVET, v. 8, n. 7, artigo 1696, 2014. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v8n7.1696>

SAMPER, J. C. Reproductive Anatomy and Physiology of the Breeding Stallion. In: YOUNGQUIST, Robert, S. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, 2 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, p.3-12, 1997.

SILVA, L.T.; MAIA, M.S.; AQUIMO, J.J.M.; MOURA, C.E.B. Comparação morfológica da célula espermática equina no sêmen fresco e refrigerado. In: Encontro Anual da Biofísica, Recife, **Anais...**, Recife: Biofísica e Radiobiologia, Biociências, p. 22-25, 2017. <https://doi.org/10.5151/biofisica2017-008>

SOARES, C.M.T.; NEVES, M.N. O papel da gota citoplasmática na funcionalidade de espermatozoides em mamíferos: uma revisão atualizada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.44, n.3, p.83-88, 2020. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2020.001>

SULLIVAN, R.; FRENETTE, G.; GIROUARD, J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. **Asian Journal of Andrology**. v.9, p. 483-491, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00281.x>

THOMASSEN, R.; FARSTAD, W. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 190-199, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.007>

VARESI, S.; VERNOCCHI, V.; FAUSTINI, M.; LUVONI, G.C. Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 55, n. 1, p. 17, 2013. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-17>