

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

**ANDRÉ LUIZ SILVA ZOCCOLI**

**A INFLUÊNCIA DA IDADE NA RESISTÊNCIA À REFRIGERAÇÃO DO  
SÊMEN DE GARANHÕES**

**UBERLÂNDIA**

**2023**

**ANDRÉ LUIZ SILVA ZOCCOLI**

**A INFLUÊNCIA DA IDADE NA RESISTÊNCIA À REFRIGERAÇÃO DO  
SÊMEN DE GARANHÕES**

Monografia apresentada a coordenação do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito à aprovação na disciplina de trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof. Dra. Renata Lançoni

**UBERLÂNDIA**

**2023**

## RESUMO

Este trabalho avalia a resistência à refrigeração do sêmen de garanhões de diferentes idades para isso, 5 animais foram separados em dois grupos: animais jovens (2 garanhões com até 8 anos) e animais idosos (3 garanhões a partir de 12 anos). Realizaram-se 2 colheitas seminais por animal. Logo após a colheita o sêmen era diluído em diluidor a base de leite desnatado (Botusemen®) na concentração de 25 a 50 milhões de espermatozoides/mL. As avaliações de motilidade total (%) e vigor (1-5), em microscopia óptica de luz, e integridade de membrana plasmática (% de membrana plasmática lesada – MPL), pela técnica de eosina-nigrosina, foram realizadas em dois momentos: logo após a colheita (MOT 1, VIG 1, MPL 1) e após 6 horas de refrigeração em caixa isotérmica de transporte passivo (Botuflex®) à 15°C (MOT 2, VIG 2, MPL 2). Além disso, também foram realizadas em todos os ejaculados análises da concentração (em câmara de Neubauer) e morfologia espermática (microscopia de contraste de fase). Os dados coletados foram comparados utilizando o programa Statistical Analyses Systems (SAS version 9.4; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) e previamente verificados quanto a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados normais ou transformados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido da observação de diferenças entre os grupos, quando significativa, pelo teste T (PROC TTEST). Os resultados foram apresentados em forma de média e desvio padrão. Para todas as comparações foi utilizado o nível de significância estatística de 5% ( $p \leq 0,05$ ), e o nível de tendência estatística de 10% ( $0,05 < p < 0,1$ ). A MOT1 apresentou valores de 52.5 ( $\pm 32,78$ ) nos animais jovens e 31 ( $\pm 20,12$ ) nos animais idosos. A MOT 2 foi de 41.25 ( $\pm 33,75$ ) em animais jovens e 18,00 ( $\pm 13,50$ ) nos animais idosos. O VIG 1 foi de 2,75 ( $\pm 1,5$ ) para garanhões jovens e 2,20 ( $\pm 0,84$ ) para garanhões idosos. O VIG2 foi de 2,5 ( $\pm 1,29$ ) para os jovens e 1,4 ( $\pm 0,54$ ) para os idosos. A MPL1 apresentou 44,62 ( $\pm 11,27$ ) nos garanhões jovens e 36,6 ( $\pm 16,44$ ) nos garanhões idosos. Após a refrigeração, os valores de MPL2 foram 47,25 ( $\pm 10,52$ ) e 36 ( $\pm 14,5$ ) em jovens e idosos, respectivamente. Não houve diferença estatística nos resultados de concentração e morfologia espermática suficiente entre os grupos, com ressalva para motilidade e integridade de membrana que tiveram diferenças entre os grupos e sem relevância no desvio padrão, devido ao número de animais sugere-se que caso o experimento seja feito em maior escala, possivelmente, seja evidenciada uma diferença na resistência a refrigeração em idades diferentes, abrindo a possibilidade de futuros estudos.

**Palavras-Chave:** Garanhão, Sêmen Refrigeração, Espermatozoide.

## ABSTRACT

This work evaluates the resistance to cooling of the semen of stallions of different ages for this, 5 animals were separated into two groups: young animals (2 stallions up to 8 years old) and elderly animals (3 stallions from 12 years old). Two seminal collections were performed per animal. Soon after collection, the semen was diluted in skimmed milk-based extender (Botusemen®) at a concentration of 25 to 50 million spermatozoa/mL. Evaluations of total motility (%) and vigor (1-5), in optical light microscopy, and plasma membrane integrity (% damaged plasma membrane – MPL), using the eosin-nigrosin technique, were performed in two moments: immediately after harvesting (MOT 1, VIG 1, MPL 1) and after 6 hours of refrigeration in a passive transport isothermal box (Botuflex®) at 15°C (MOT 2, VIG 2, MPL 2). In addition, analyzes of concentration (in a Neubauer chamber) and sperm morphology (phase contrast microscopy) were also performed in all ejaculates. The collected data were compared using the Statistical Analyzes Systems program (SAS version 9.4; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) and previously checked for normality of the residues using the Shapiro-Wilk test. Normal or transformed data were submitted to the analysis of variance test (ANOVA), followed by the observation of differences between groups, when significant, by the T test (PROC TTEST). The results were presented as mean and standard deviation. For all comparisons, a statistical significance level of 5% ( $p \leq 0.05$ ) and a statistical trend level of 10% ( $0.05 < p < 0.1$ ) were used. MOT1 showed values of 52.5 ( $\pm 32.78$ ) in young animals and 31 ( $\pm 20.12$ ) in elderly animals. The MOT 2 was 41.25 ( $\pm 33.75$ ) in young animals and 18.00 ( $\pm 13.50$ ) in old animals. The VIG 1 was 2.75 ( $\pm 1.5$ ) for young stallions and 2.20 ( $\pm 0.84$ ) for old stallions. The VIG2 was 2.5 ( $\pm 1.29$ ) for the young and 1.4 ( $\pm 0.54$ ) for the elderly. MPL1 showed 44.62 ( $\pm 11.27$ ) in young stallions and 36.6 ( $\pm 16.44$ ) in old stallions. After refrigeration, MPL2 values were 47.25 ( $\pm 10.52$ ) and 36 ( $\pm 14.5$ ) in young and elderly, respectively. There was no statistical difference in the results of sufficient sperm concentration and morphology between the groups, with exception for motility and membrane integrity that had differences between the groups and without relevance in the standard deviation, due to the number of animals it is suggested that if the experiment is done on a larger scale, possibly, a difference in resistance to cooling at different ages is evidenced, opening the possibility of future studies.

**Keywords:** Stallion, Refrigerated Semen, Sperm.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
2.1	A INFLUÊNCIA DA IDADE NA FERTILIDADE DO GARANHÃO .....	7
2.2	RESISTENCIA DO ESPERMATOZOIDE A REFRIGERAÇÃO.....	8
2.3	PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DO SÊMEN.....	9
2.3.1	<i>Aspecto</i> .....	9
2.3.2	<i>Volume</i> .....	9
2.3.3	<i>Motilidade</i> .....	9
2.3.4	<i>Vigor</i> .....	10
2.3.5	<i>Concentração</i> .....	10
2.3.6	<i>Morfologia</i> .....	11
2.3.7	<i>Integridade de Membrana</i> .....	11
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1	LOCAL E EXECUÇÃO .....	12
3.2	COLETA E MANIPULAÇÃO DO SÊMEN .....	12
3.3	ANÁLISES PRÉ-REFRIGERAÇÃO E PÓS-REFRIGERAÇÃO .....	13
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	13
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>14</b>
	TABELA 1.....	14
	TABELA 2.....	14
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>16</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>17</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Conforme dados divulgados pela Esalq/USP o setor equestre tem um PIB estimado em cerca de 30 milhões ano, e apesar dos tempos incertos que o mundo enfrentou devido a pandemia de SARS-CoV-2, o cenário para a equinocultura tem sido diferente, apresentando crescimento no rebanho Brasileiro de 1,9% durante a pandemia, e Minas Gerais sendo o estado com maior rebanho nacional comparado com ano de 2019 de acordo com dados divulgados pela CNA Confederação de Agricultura e Pecuária do Brasil, e com isso se faz necessário mão de obra capacitada assim como estudo para aprimoramento dos profissionais que lidam com a equinocultura no Brasil (CNA, 2020)

A reprodução é um tema que está diretamente ligado ao aumento do rebanho equino presente no Brasil, e com isso a avaliação da qualidade espermática dos garanhões pode auxiliar na melhor compreensão de características fisiológicas e eventuais efeitos negativos que esses garanhões possam ter como características, considerando que ao longo dos anos a seleção de reprodutores no Brasil se baseou em animais com grande desempenho atlético e características raciais, sendo então as características relacionadas a fertilidade negligenciadas (COSTA, 2009).

Os garanhões em especial merecem maior atenção quando relacionado a este assunto pois os mesmos são capazes de transmitir a sua genética para mais animais quando comparado a uma égua, pois um mesmo garanhão pode cobrir um plantel, e por essas características a avaliação da fertilidade assim como a seleção de bons reprodutores é fundamental pois quanto maiores as taxas de fertilidade do garanhão maiores serão as taxas de concepção, sendo então muito importante tanto quanto a égua uma boa avaliação e seleção do garanhão, pois o mesmo possui grande influência sobre a tropa, e sabe-se que a qualidade seminal deste, é de grande importância (FERNANDES et al., 2002).

Tem-se muitos estudos que observam as características reprodutivas do garanhão e analisam seu desempenho reprodutivo em momentos que apresenta queda em seu desempenho, tais quais a frequência de trabalho e sazonalidade que afetam o número total de espermatozoide assim como a concentração total e volume seminal (BIELANSKI et al., 1977).

Garanhões muitas vezes tem sua vida reprodutiva bem longa de forma que isto tem influência em sua função reprodutiva diretamente, visto que pode estar prejudicada por diversos fatores (ALVARENGA et al., 2017); mas ainda assim quando relacionado este assunto a idade desses garanhões que tem sua longa jornada reprodutiva, não se tem

muitas informações a alterações seminais que este poderia apresentar (BIELANSKI et al., 1993).

No Brasil a técnica de sêmen refrigerado é muito utilizada na inseminação artificial, que permite a inseminação em mais éguas que o animal cobriria no mesmo intervalo de tempo, assim como outro fator importante que seria a possibilidade de inseminar um animal distante do local do ganhão (PAPA et al., 2007). A um prolongamento da viabilidade dos espermatozoides por até 48 horas quando armazenados em temperatura mínima de 5°C (SILVA FILHO et al., 2011). Porém observa-se em ganhões que existe variação a essa viabilidade dos espermatozoides quando refrigerado, há animais que apresentam uma quantidade muito baixa de espermatozoides viáveis quando refrigerados, sendo insuficientes para a realização de inseminação artificial mesmo tendo passado por todo o protocolo corretamente (BRINSCO et al., 2000).

O objetivo deste trabalho é avaliar a resistência dos espermatozoides à refrigeração em temperatura em torno de 15°C, de forma a comparar ganhões jovens e ganhões idosos avaliando se existe interferência da idade relacionada a qualidade seminal quando refrigerado.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A influência da idade na fertilidade do ganhão**

É visto que a qualidade seminal e sua relação com a fertilidade está diretamente ligada com fatores observados como baixa incidência de anormalidade em espermatozoides, alta motilidade e vigor do espermatozoide, sendo esses sempre observados em ganhões com alta taxa de fertilidade (FERNANDES et al., 2002).

A idade do ganhão tem grande influência sobre a sua qualidade seminal visto que a seleção de animais para reprodução tem buscado sempre características atléticas ou padronizadas pela raça, sem considerar a idade de animais frente a qualidade espermática dos mesmos, é válido que mediante isso sejam abordadas metodologias para melhorar a qualidade espermática (ALVARENGA et al., 2014.). Um fator a ser observado que se relaciona com a qualidade espermática e a resistência seminal a refrigeração, é a composição do plasma seminal, que se altera com diferentes indivíduos e diferentes idades (JASKO et al., 1992).

O plasma seminal é basicamente uma mistura de secreções produzidas nos testículos, epidídimos e glândulas anexas que é resultante no ejaculado composto de várias frações desses fluidos somados, que podem variar de acordo com cada garanhão influenciando diretamente na longevidade do espermatozoide presente no plasma seminal (KARESKOSKI et al., 2008). Garanhões mais jovens tendem a produzir uma quantidade de espermatozoides menor que a de garanhões mais velhos pois o seu desenvolvimento testicular se dá até os 6 anos de idade (VAN BUITEN et al., 2003).

Sabe-se que a idade do garanhão pode influenciar na sua qualidade espermática, porém entende-se poucos detalhes mais específicos sobre isso, estima-se que sejam devidos a degeneração testicular, condicionamento físico como garanhões com sobrepeso, manejo reprodutivo inadequado que afetam diretamente a libido e capacidade de monta do garanhão (McDONNEL, 2005).

## **2.2 Resistencia do espermatozoide a refrigeração**

Sobre a qualidade espermática de garanhões é possível observar que o sêmen refrigerado tem maior utilização quando transportado e utilizado em até 24 horas pós coleta pois apresenta maior taxa de fertilidade e conseqüentemente maior taxa de concepção (PUGLIESI, 2009). A utilização do sêmen *in natura* apresenta alta taxa de fertilidade quando utilizado próximo a coleta em até 1 hora, quando transportado ou não, mas é cabível de acordo com o autor que sêmen diluído e refrigerado apresenta uma taxa de concepção similar comparado a sêmen fresco não transportado ao primeiro ciclo das éguas (SILVA FILHO et al., 1997)

Quando comparado sêmen diluído refrigerado em temperatura de 20°C e sêmen fresco diluído ao transporte, é possível então observar resultados bem próximos em relação a taxa de concepção de éguas inseminadas com ambos os sêmen, quando levado em consideração que o sêmen mantido em temperatura de 20°C por curto período de tempo é recomendado podendo evitar choque térmico devido a refrigerações em temperaturas menores (DE CARVALHO et al., 1997). Durante o processo de refrigeração o metabolismo do espermatozoide é reduzido conforme o decréscimo na temperatura, em 5°C o metabolismo está em torno de 10% do inicial, desta maneira pode-se estender a longevidade do espermatozoide (SQUIRES et al., 1999).

A longevidade seminal está relacionada com o diluidor, o meio de transporte do sêmen, ao protocolo empregado, as características espermáticas físicas, químicas e



metabólicas, de forma que para o resfriamento adequado do sêmen esses processos devem ser bem executados (ALMEIDA, 2004). No processo de refrigeração as estruturas espermáticas são afetadas com maior foco em membrana plasmática, a 5°C a membrana plasmática torna-se mais susceptível aumentando a possibilidade de alterações relacionadas a mudanças morfológicas e funcionais que se relacionam diretamente com a motilidade e capacidade de fecundação do espermatozoide (AMANN et al., 2011).

## **2.3 Parâmetros para avaliação do sêmen**

### **2.3.1 Aspecto**

Nos aspectos visuais que o ejaculado apresenta, avalia-se coloração e aparência identificando aspecto dentro da normalidade, ou se apresenta alterações como por exemplo uma coloração avermelhada, o que pode indicar sangue, ou uma coloração amarelada indicando urina. Para que se identifique as anormalidades é necessário que se entenda os padrões fisiológicos que o sêmen normal deve apresentar, como coloração esbranquiçada e levemente acinzentada, com aparência leitosa, cremosa, opalescente, serosa ou aquosa, variando de acordo com a concentração de espermatozoides no ejaculado. É levado em conta também o odor que é característico (CBRA, 2013)

### **2.3.2 Volume**

O volume do ejaculado fisiológico na espécie equina varia em relação, a idade do animal, raça, e metodologia de colheita. A quantidade de ejaculado varia entre 40 a 60 ml (CBRA, 2013). E as colheitas são feitas exclusivamente pelo método de vagina artificial na espécie equina.

### **2.3.3 Motilidade**

Para avaliação de motilidade é quantificado o número de espermatozoides em movimento, esta estimativa de motilidade é mensurada em porcentagem. Para análise de motilidade é necessário utilização de microscopia óptica, onde a amostra é depositada em lâmina pré-aquecida para evitar choque térmico, e sobreposta com uma lamínula, em seguida é feita a avaliação classificando a motilidade espermática (CBRA, 2013).

### 2.3.4 Vigor

O vigor é avaliado junto a motilidade e basicamente consiste em observar a intensidade do movimento do espermatozoide e a qualidade deste, de forma que este pode ser vigoroso e progressivo ou estático, e é mensurado de zero a cinco (CBRA, 2013). Garanhões que apresentam um bom vigor espermático estão mensurado acima de 3 onde o espermatozoide exibe movimento vigoroso e progressivo com boa movimentação de cauda (CBRA, 2013). Esses parâmetros devem ser observados em sêmen fresco, resfriado e congelado.

### 2.3.5 Concentração

A concentração é um parâmetro para avaliação do sêmen onde se avalia em milímetros ou centímetros cúbicos o número de células presente. É contado o número de cabeças presentes na amostra, que varia de acordo com a idade, raça desempenho e função reprodutiva do garanhão assim como o intervalo entre as coletas de sêmen do mesmo animal (CBRA, 1998). Esta análise de concentração é feita na câmara de Neubauer, que por sua vez é simples de ser executada e apresenta bom custo-benefício as outras técnicas de avaliação da concentração como espectrofotômetro e contagem computadorizada (OLIVEIRA et al., 2013).

A diluição do sêmen é feita para que seja possível contabilizar os espermatozoides na câmara de Neubauer, podem ser utilizadas diferentes diluições que podem variar de acordo com a concentração do sêmen assim como a intenção na contabilização e avaliação empregada quanto ao número de células, podendo variar de 1:10 a 1:100 (ALVARENGA et al., 2017).

Para elucidar o cálculo de concentração espermática, a fórmula matemática empregada é,  $n = \text{número de espermatozoides/mm}^3$  sobre a altura entre a lamínula e a câmara multiplicado pela média de 5 quadrados do primeiro retículo + a média de 5 quadrados do segundo retículo, sobre a área do quadrado- equivalente a  $1/25 \text{ mm}^2$ ,

multiplicado pela diluição realizada, como por exemplo a de 1:20, dessa forma o resultado encontrado será a concentração espermática da amostra por  $\text{mm}^3$ .

$$\frac{n}{1 \times 5^* \times 1} \\ 10 \ 25 \ 20$$

A contagem dos espermatozoides pode ser feita de duas maneiras, diagonal ou os cantos e o centro, é necessário atenção a contagem de espermatozoides pois a cabeça deve estar pelo menos 50% dentro da margem, deve ser contabilizado somente cabeças (PAPA et al., 2007).

### 2.3.6 Morfologia

Existem diversas técnicas para avaliação morfológica, dentre elas a mais simples em relação a custo benefício e procedimento seria o esfregaço corado, que pode ser realizado rapidamente e avaliado em microscopia óptica, sendo necessário o uso de corantes para possibilidade da avaliação dos defeitos morfológicos que são apresentados, para identificação morfológica são contabilizados no mínimo 100 células e entre elas são destacadas, observadas e classificadas as anormalidades encontradas e em que região se encontram no espermatozoide identificando o grau de deformidade apresentado, mensurando por meio de porcentagem o número de defeitos encontrados (ARRUDA et al., 2015).

A técnica de microscopia de contraste de fase tem algumas vantagens, como por exemplo a não utilização de corantes para visualização de seu conteúdo, assim como uma imagem de maior qualidade e detalhes para uma análise morfológica mais fidedigna na avaliação da morfologia espermática, é necessário que a amostra seja depositada em um frasco com solução formol-salina até que se turve o meio, em seguida uma pequena gota da amostra é colocada sobre uma lâmina e coberta por uma lamínula, sendo possível agora a avaliação no microscópio de contraste de fase, para contagem de defeitos e anormalidades e sua classificação para cada animal. (DA SILVA et al., 2017).

### 2.3.7 Integridade de Membrana

O teste de eosina-nigrosina é muito utilizado para corar esfregaço do sêmen e posterior avaliação de integridade de membrana plasmática do espermatozoide, pois a junção da eosina e nigrosina possibilitam a visualização de espermatozoides vivos e mortos (SILVA, 2006.).

Em caso de membrana lesada as células mortas irão captar a eosina e se corar por rosa, a eosina não cora células com a membrana plasmática intacta, então para o contraste das células que não foram coradas a nigrosina cora o fundo de forma a possibilitar a visualização da silhueta das células de membrana intacta sendo assim uma associação de corantes bastante eficiente quando utilizada para avaliação da integridade de membrana plasmática (MACÊDO, 2017).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local e execução**

Foram utilizados 2 garanhões de até 8 anos de idade (grupo jovens) e 3 garanhões a partir de 12 anos (grupo idosos), provenientes de um Haras na cidade de Uberlândia - MG, e neste mesmo local foram feitas as colheitas e diluição do sêmen dos animais e em seguida o armazenamento, para a posterior análise laboratorial realizada no Laboratório de Reprodução Animal na Universidade Federal de Uberlândia Campus Umuarama.

#### **3.2 Coleta e manipulação do sêmen**

As coletas de sêmen dos garanhões foram realizadas no Haras em que eles se encontram, e foram feitas através do método da vagina artificial seguindo um protocolo de higienização, limpeza do pênis do garanhão para evitar contaminação das amostras colhidas. Após a coleta do sêmen ele foi filtrado e diluído utilizando o diluidor a base de leite desnatado BotuSêmen<sup>®</sup> – Botupharma, na diluição de 2:1.

As amostras de cada garanhão foram refrigeradas na temperatura de 15°C na caixa de transporte BotuFLEX<sup>®</sup>, e foram divididas em duas para cada animal totalizando 10 amostras, as primeiras amostras de cada par foram analisadas de imediato, tendo seus dados registrados para então comparação com a segunda amostra 6 horas depois, para observação do impacto da refrigeração sobre os espermatozoides.

### 3.3 Análises pré-refrigeração e pós-refrigeração

As análises seguiram de maneira que, o sêmen colhido e divididos eram avaliados, observando primeiramente a motilidade (MOT1) dos espermatozoides utilizando porcentagem. Em sequência avaliou-se vigor (VIG1) dos espermatozoides em uma escala de 1 a 5. A análise de concentração foi feita utilizando a câmara de Neubauer quantificando os espermatozoides e baseado na diluição e o n° de espermatozoides encontrados utilizando uma equação matemática é possível chegar à concentração. É feito esfregaço e coloração da lâmina com o corante eosina-nigrosina, para avaliação de integridade de membrana (MPL1), todas estas etapas foram realizadas em microscopia óptica. Em microscopia de contraste de fase foi realizado a avaliação morfológica, visando observar os defeitos de formação e estruturais dos espermatozoides a fim de quantificá-los avaliando um total de 200 células.

Após 6 horas da colheita, o sêmen refrigerado era aquecido em uma mesa aquecedora em temperatura em torno de 37C°, assim como as lâminas que foram utilizadas para a análise, eram reavaliados (MOT2, VIG2, MPL2) que repetiram o processo que ocorreu com a primeira amostra com exceção a avaliação de morfologia espermática.

### 3.4 Análise estatística

Os dados coletados foram comparados com o programa Statistical Analyses Systems (SAS version 9.4; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) e previamente verificados quanto a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não respeitaram a normalidade foram transformados e/ou feita a retirada de outliers. Quando mesmo após transformação e/ou retirada dos outliers não respeitaram as premissas, foram analisados por estatística não paramétrica de ordem, sendo feita a análise através do teste de Kruskal-Wallis (PROC NPAR1WAY). Os dados normais ou transformados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido da observação de diferenças entre os grupos, quando significativo, pelo teste T (PROC TTEST). Os resultados foram apresentados em forma de média e desvio padrão. Para todas as

comparações foi utilizado o nível de significância estatística de 5% ( $p \leq 0,05$ ), e o nível de tendência estatística de 10% ( $0,05 < p < 0,1$ ).

#### 4 RESULTADOS

A tabela 1 ilustra as características espermáticas dos diferentes grupos dos garanhões.

**Tabela 1.** Média ( $\pm$  desvio padrão) das características espermáticas dos garanhões jovens e idosos.

<b>Características espermáticas</b>	<b>Garanhões jovens</b>	<b>Garanhões idosos</b>
Motilidade em T0 (%)	52.50 ( $\pm$ 32.78)	31.00 ( $\pm$ 20.12)
Motilidade em T6 (%)	41.25 ( $\pm$ 33.75)	18.00 ( $\pm$ 13.50)
Vigor em T0 1-5	2.75 ( $\pm$ 1.50)	2.20 ( $\pm$ 0.83)
Vigor em T6 1-5	2.50 ( $\pm$ 1.29)	1.40 ( $\pm$ 0.54)
MPL T0 (%)	44.62 ( $\pm$ 11.27)	36.60 ( $\pm$ 16.44)
MPL T6 (%)	47.25 ( $\pm$ 10.52)	36.00 ( $\pm$ 14.50)
Concentração (%)	118.12 ( $\pm$ 36.47)	83.50 ( $\pm$ 43.53)

MPL = membrana plasmática lesada, T0 = tempo zero, T6= tempo seis.

Na tabela 2, é possível visualizar a morfologia espermática dos diferentes grupos de garanhões. Não houve variação estatística entre garanhões jovens e idosos, mas é importante considerar o número de animais utilizados.

**Tabela 2.** Morfologia espermática comparativa entre os grupos.

<b>Defeitos morfológicos</b>	<b>Garanhões jovens</b>	<b>Garanhões idosos</b>
Acrossoma anormal	0.87 ( $\pm$ 1.43)	1.80 ( $\pm$ 1.35)
Cabeça anormal	0.25 ( $\pm$ 0.50)	1.20 ( $\pm$ 0.87)
Cabeça isolada	0.87 ( $\pm$ 1.03)	1.10 ( $\pm$ 1.94)
Gota proximal	3.12 ( $\pm$ 1.43)	3.00 ( $\pm$ 2.54)
Gota distal	1.25 ( $\pm$ 1.50)	3.20 ( $\pm$ 2.97)
Peça intermediária anormal	8.75 ( $\pm$ 8.42)	5.10 ( $\pm$ 2.83)
Cauda fortemente dobrada	5.12 ( $\pm$ 2.01)	6.60 ( $\pm$ 1.94)
Cauda dobrada/enrolada	1.37 ( $\pm$ 1.25)	0.40 ( $\pm$ 0.54)
Cabeça subdesenvolvida	0.12 ( $\pm$ 0.25)	0.20 ( $\pm$ 0.44)
Total de defeitos maiores	35.00 ( $\pm$ 12.92)	31.60 ( $\pm$ 11.88)
Total de defeitos menores	3.00 ( $\pm$ 2.04)	4.40 ( $\pm$ 2.67)
Defeitos totais	38.00 ( $\pm$ 10.92)	36.00 ( $\pm$ 12.12)

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo a análise dos dados obtidos nas coletas, não obteve diferença estatística significativa. Apesar dos dados obtidos neste trabalho apresentarem algumas diferenças entre os grupos em alguns aspectos analisados; O autor relata que encontrou variações na viabilidade e fertilidade espermática em diferentes avaliações de sêmen refrigerado (GOMES et al., 2015).

Neste estudo, é possível observar que entre os ganhões houve uma variação na motilidade em torno de 20% entre os dois grupos em T0, que se repete em T6, em relação ao vigor espermático a variação é mais evidenciada em T6 como é mostrado nos resultados da tabela 1, já em relação a MPL os ganhões mais jovens apresentaram maior porcentagem de MPL, assim como apresentaram maior média de concentração de espermatozoides por ml.

Visto que não houve grandes alterações em integridade de membrana e motilidade no tempo inicial e 6 horas após para ganhões do grupo jovem, para os ganhões idosos não houve variação em integridade de membrana, porém em relação à motilidade houve uma redução de quase 50% do valor inicial, no trabalho de (FARRÁS et al., 2012), identificou-se que a temperatura de armazenamento de 5°C e 15°C são eficientes na manutenção das características de motilidade e integridade de membrana plasmática

Sendo possível observar no presente estudo que quando conservado a 15°C as alterações encontradas são reduzidas, porém ainda presentes, enaltecendo que mesmo que refrigerado, quanto mais rápido e bem executado o protocolo, maiores são as chances de sucesso da inseminação com sêmen refrigerado, a utilização do sêmen refrigerado requer alguns cuidados para o sucesso e obtenção de bons resultados como observado por (ALVARENGA et al., 2012) de maneira que a realização adequada do protocolo e armazenamento correto nas temperaturas de 5°C ou 15°C, são fundamentais para o sucesso da inseminação

Foi encontrado redução de motilidade principalmente em ganhões do grupo dos idosos e defeitos de cauda, contudo não é possível afirmar serem decorrentes da refrigeração. DA SILVA et al., (2017) observam que em sêmen refrigerado ocorre a indução de defeitos principalmente de acrossoma e cauda dos espermatozoides, assim como redução de motilidade que está relacionada a incidência de defeitos menores, porém não chegaram a ser números de grande impacto na amostragem.

Os garanhões mais jovens apresentaram maior porcentagem de defeitos totais, com destaque para defeito de peça intermediária sendo o defeito mais apresentado para garanhões jovens e cauda fortemente dobrada para os mais velhos. A avaliação morfológica do ejaculado por si só não é capaz de afirmar se o potencial de fertilidade é elevado, mas quando somada a alta porcentagem de defeitos espermáticos é possível afirmar quando a fertilidade é baixa (BRITO et al., 2007).

No presente trabalho como já citado os garanhões não apresentaram alta motilidade, com destaque para os garanhões do grupo jovem que tiveram os maiores valores de motilidade, contudo a avaliação morfológica desses animais apresentou uma quantidade de defeitos totais de 38% e 36% para os garanhões do grupo idosos, não havendo diferença significativa entre os grupos em relação a defeitos morfológicos. Através de avaliação morfológica se obtém muitos dados, pois o garanhão pode apresentar motilidade de espermatozoides elevada, e assim mesmo, apresentar alta porcentagem de defeitos morfológicos, (VARNER et al., 2008),

O vigor espermático não teve muita variação nos garanhões jovens, já nos garanhões idosos, houve uma variação maior, assim como a concentração e motilidade apresentadas foram menores nos garanhões mais velhos, (LOPES et al., 2018) avalia em momentos distintos de 0 até 36 horas, com sêmen refrigerado a 5C° que houve alterações significativas em vigor espermático, assim como motilidade, no presente trabalho foi possível identificar também em concordância essas alterações, que foram mais evidenciadas nos garanhões idosos.

## **6 CONCLUSÃO**

Não foi observado diferença estatística relacionada a resistência espermática entre garanhões jovens e idosos à refrigeração, mas é importante salientar o baixo número de amostras, permitindo a possibilidade de novos estudos com número maior de amostras que possam evidenciar com mais clareza possíveis diferenças estatísticas.



## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Henry Berger de. **Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, triiodotironina e tiroxina e a longevidade de sêmen eqüino resfriado**. 2004. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. doi:10.11606/T.10.2004.tde-03092007-152156. Acesso em: 2023-02-08.

ALVARENGA, Marco Antonio et al. Methods of concentrating stallion semen. **Journal of equine veterinary science**, v. 32, n. 8, p. 424-429, 2012.

ALVARENGA, Marco Antonio; PAPA, Frederico Ozanam; NETO, Carlos Ramires. Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 81-85, 2017.

ALVARENGA, M. V.; PAPA, F. O.; NETO, C. R. Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.81-85, jan./mar., 2017. Disponível em: [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br). Acesso em: 02 de fevereiro de 2022.

ALVARENGA, M. A.; RAMIRES NETO, C.; PAPA, F. Ozanam. **Estratégias para melhorar a qualidade e fertilidade do sêmen de reprodutores equinos**. 2014.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O., et al. (Eds.). *Equine Reproduction*. 2. ed. Wiley-Blackwell, 2011. p. 1053–1084.

ANIMAL, CBRA–COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte, CBRA, 1998. 2013.

BIELANSKI, W. Results of extensive researches of the semen of stallions. *3rd Int Cong Anim Reprod*, 1956; 65-67.

BRASIL. Ministério de Agricultura e Abastecimento (MAPA) portaria nº 109 de 25 maio de 2009 e 393 de 16 de julho de 2010. Manual para exame andrológico e avaliação de

sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte (MG); 3 ed:104, 2013.

BRINSKO, Steven P.; VARNER, Dickson D. Inseminação artificial e preservação de sêmen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, n. 1, pág. 205-218, 1992.

BRITO, Leonardo FC. Avaliação da morfologia espermática de garanhões. **Técnicas Clínicas na Prática Equina**, v. 6, n. 4, pág. 249-264, 2007.

CANISSO, Igor Frederico et al. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 6, n. 3, p. 389-398, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.

DA SILVA, Lenilda Teixeira; Maia, Marciane da Silva; Aquino, José Jossier Maia de; Moura, Carlos Eduardo Bezerra de; "COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA DA CÉLULA ESPERMÁTICA EQUINA NO SÊMEN FRESCO E REFRIGERADO", p. 22-25. In: **Santana, Otacilio Antunes; Cabral Filho, Paulo Euzébio; Rodrigues, Claudio Gabriel. Anais do Encontro Anual da Biofísica 2017**. São Paulo: Blucher, 2017. ISSN 2526--607-1, DOI 10.5151/biofisica2017-008

DARR, C. R.; MORAES, L.E.; SCANLAN, T. N.; BAUMBER-SKAIFE, J.; LOOMIS P.R.; CORTOPASSI, G.A.; MEYERS, S.A. Sperm mitochondrial function is affected by stallion age and predicts post-thaw motility. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2016.

DE CARVALHO, Giovanni Ribeiro e cols. Fertilidade do sêmen eqüino diluído, resfriado a 20 C e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 3, pág. 473-478, 1997.

FARRÁS, M. C. et al. Comparison of sperm DNA fragmentation and motility parameters between Quarter Horse and Mangalarga Marchador stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 8, n. 32, p. 485, 2012.

FERNANDES, Carlos Eurico; PIMENTEL, Cláudio Alves. Características seminais e fertilidade em garanhões. **Ciência Rural**, v. 32, p. 829-834, 2002.

JASKO, David J. Evaluation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 129-148, 1992.

KARESKOSKI, Maria; KATILA, Terttu. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal reproduction science**, v. 107, n. 3-4, p. 249-256, 2008.

LOPES, V. M. **Avaliação da viabilidade espermática do sêmen equino resfriado a 5°C por 36 horas de garanhões alojados no município de Rolim de Moura – RO.** 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como exigência em graduação no curso de Bacharel em Medicina Veterinária na Fundação Universidade Federal de Rondônia, Campus de Rolim de Moura, sob a orientação do Prof. Dr. Fernando do Carmo Silva

MACÊDO, Iara Nóbrega. **AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER EM GARANHÕES QUARTO DE MILHA.** Trabalho de conclusão de Curso (Título de Bacharel em Medicina Veterinária) - Universidade Federal da Paraíba, Areia – Paraíba, p 46. 2017.

McDONNELL, S.M. Techniques for Extending the Breeding Career of Aging and Disabled Stallions. **Clinical Techniques in Equine Practice**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 269-276, 2005.

NOVELLO, Guilherme. **Criopreservação do sêmen de garanhões da raça crioula com baixo e alto escore de condição corporal e refrigeração de sêmen equino com diluentes a base de caseína.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal) -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Botucatu, São Paulo.Botucatu, p. 103. 2020.

OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, B.; CELEGHINI, E. C. C.; FERNANDES, C. B. & MATTOS, C. B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v 37, n. 1, p. 23-28, 2013.

PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; DELL'QUA, J. MONTEIRO, G. M. Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino. São Paulo, São Paulo, Brasil: Botupharma, 2007.

PUGLIESI, Guilherme. **Viability and fertility of equine semen diluted with two seminal extenders and cooled at 5 °C for 24 hours**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Animais Domésticos; Nutrição e Alimentação Animal; Pastagens e Forragicul) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; PERES, K.R.; ARRUDA, R.P. Effect of centrifugation in the maintenance of the motility of equine cooled spermatozoa at 5°C until 72 hours. In: XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2007, Costa do Sauípe. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre: UFRG, 2007a. v. 35. p. 1012.

RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; PERES, K.R.; ARRUDA, R.P. **Influence of centrifugation in the plasma and acrosomal membranes integrity and mitochondrial membrane potential of equine cooled spermatozoa at 5°C until 72 hs**. In: XXI Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2007, Costa do Sauípe. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre: UFRG, 2007b. v. 35. p. 1011.

SILVA FILHO, José Monteiro da et al. Avaliação de uma Técnica de Diluição e Transporte de Sêmen Equino, para as Condições Brasileiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 66-74, 1998.

SILVA FILHO, José Monteiro da et al. Fertilidade do sêmen equino diluído, resfriado e transportado. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, p. 1134-1141, 1997.

SILVA, José Robalo. Recolha e avaliação de ejaculados de garanhão em condições de campo Collection and evaluation of horse semen under field conditions. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, p 5. 2006.

SQUIRES, E.L.; Pickett, B.W.; Graham, J.K.; Vanderwall, D.K.; McCue, P.M.; Bruemmer, J.E. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, p.1-38. (Bulletin, 9), 1999

VAN BUITEN, A.; WESTERS, P.; COLENBRANDER, B. Male, female and management risk factors for non-return to service in Dutch mares. **Preventive veterinary medicine**, v. 61, n. 1, p. 17-26, 2003.

VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 448-462, 2008.