

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

**ELIGIANE PRISCILA MEURER**

**CORRELAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA COM A TAXA DE  
CONCEPÇÃO NO USO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM  
EQUINOS**

**Uberlândia - MG  
2023**

**ELIGIANE PRISCILA MEURER**

**CORRELAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA COM A TAXA DE  
CONCEPÇÃO NO USO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM  
EQUINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade  
Federal de Uberlândia como requisito parcial para  
obtenção do título de bacharel em Medicina  
Veterinária

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Lançoni

**Uberlândia - MG  
2023**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M598 Meurer, Eligiane Priscila, 1990-  
2023 CORRELAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA COM A TAXA DE  
CONCEPÇÃO NO USO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS  
[recurso eletrônico] / Eligiane Priscila Meurer. - 2023.

Orientadora: Renata Lançoni.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em  
Medicina Veterinária.

Modo de acesso: Internet.

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Lançoni, Renata, 1990-, (Orient.).  
II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em  
Medicina Veterinária. III. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

**ELIGIANE PRISCILA MEURER**

**CORRELAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA COM A TAXA DE  
CONCEPÇÃO NO USO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM  
EQUINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 27 de junho de 2023.

Banca Examinadora:

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Lançoni**  
(Médica veterinária/Docente FAMEV-UFU)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Teresinha Inês de Assumpção**  
(Médica veterinária/Docente FAMEV-UFU)

---

**Msc. Pedro Sanches Oquendo Jr**  
(Médico veterinário/Membro Externo)

Dedico este trabalho a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, que me presenteiam todos os dias com a energia da vida, que me dão forças, proteção e coragem para atingir meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, e por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo do curso.

Aos meus pais Pedro Cezar Meurer e Eliane dos Santos Meurer, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência em vários momentos durante toda a graduação.

Aos meus professores, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional. Especialmente à professora Teresinha Inês de Assumpção e professora Renata Lançoni por todos os ensinamentos, oportunidades e orientações.

À professora Kênia Carrijo, por me receber tão bem na UFU e por todos esclarecimentos dados com imensa empatia.

Ao médico veterinário Neimar Corrêa Severo, pelas oportunidades e ensinamentos.

À FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo apoio financeiro de grande valia.

Aos amigos feitos durante minha trajetória em Santa Catarina, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, aprendi muito com todos vocês.

Aos meus amigos Enaiane Patrícia Meurer, Fernanda Juceli de Oliveira, Hilmara Butzke, Jardel Luiz Meurer, Mônica Loch Hensing e Sabrina Maitê Andretti por me ajudarem de tantas maneiras a realizar meu sonho.

À minha madrinha Célia Schimidt pelos melhores passeios e áudios mais lindos e sinceros de apoio e admiração.

À Família Pedrosa, especialmente ao Valdivino e Ireni, pela hospitalidade e acolhimento durante toda minha estadia em Uberlândia.

À família Melo, especialmente à Drúcila Schusts Melo, por acreditarem em mim e me mostrarem novos horizontes.

À Dona Helen pelo carinho, acolhimento.

À Tia Edna Lopes, pela hospitalidade e carinho.

À Nina Pipeta Maria e ao Thorzinho pela companhia e amor incondicional.

Ao Francisco Tadeu Meurer (*in memoriam*), Olga dos Passos Meurer (*in memoriam*), João José de Castro (*in memoriam*), e Catarina Maria de Souza (*in memoriam*), pelo exemplo de vida, de paixão, de força e honestidade. Princípios que levarei por toda minha Vida.

## RESUMO

Equinos foram primordialmente selecionados quanto as aptidões e características fenotípicas e isto contribuiu para menor fertilidade entre estes animais. A avaliação da morfologia espermática é o componente do espermograma que melhor se correlaciona com a fertilidade do garanhão. Atualmente as biotécnicas de reprodução vem otimizando a distribuição de material genético por longas distâncias, no entanto também enfrentam desafios quanto a qualidade seminal de uma parcela importante de garanhões. Objetivando compreender mais os aspectos da fertilidade dos garanhões, neste trabalho recebemos e analisamos amostras quanto à morfologia espermática e correlacionamos com a taxa de concepção de fêmeas inseminadas. Utilizando a técnica de preparação úmida e microscopia de contraste de fase, foram contabilizadas 200 células por amostra de sêmen. No Teste de correlação de Pearson não encontramos coeficiente de correlação alto associado à significância estatística, sinalizando a necessidade de um maior número de animais/amostras participantes. Os resultados encontrados dizem respeito a defeitos morfológicos correlacionados, como: gota protoplasmática proximal e gota protoplasmática distal, cabeça isolada patológica e cabeça isolada normal, e por último, alteração no acrossoma correlacionado as alterações de cabeça como delgada, gigante, pequena, curta e larga. Dois garanhões apresentaram alta fertilidade e elevada porcentagem de defeitos morfológicos no sêmen, podendo ser explicado pela presença de defeitos compensáveis.

Palavras-chave: garanhões; avaliação espermática; fertilidade; biotécnicas da reprodução.

## ABSTRACT

Equines were primarily selected for skills and phenotypic characteristics and this contributed to lower fertility among these animals. The evaluation of sperm morphology is the component of the spermogram that best correlates with the fertility of the stallion. Currently, the reproduction biotechniques have been optimizing the distribution of genetic material over long distances, however, it also faces challenges regarding the seminal quality of an important portion of stallions. Aiming to better understand the aspects of stallion fertility, in this work we interpret and analyze the reflection on sperm morphology and correlate it with the conception rate of inseminated females. Using the wet preparation technique and phase contrast microscopy, 200 cells were counted per semen sample. In the Pearson Test, we were unable to reach high cognitive ability associated with statistical significance, signaling the need for a larger number of participating animals/samples. The results found relate to correlated morphological defects, such as: proximal droplets and distal droplets, pathological tailless heads and tailless heads, and finally, alteration in the correlated acrosome such as head changes such as narrow, giant, small, short broad and large. Two stallions showed high fertility and a high percentage of morphological defects in the semen, which can be explained by the presence of compensable defects.

**Keys-Words:** stallions; sperm avaluantiion; fertility; reproduction biotechniques.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1 Morfologia e Maturação Espermática.....	12
2.1.1 Defeitos espermáticos .....	13
2.1.2 Técnicas para avaliação da morfologia espermática .....	13
2.2 Taxa de Concepção .....	14
2.3 Sêmen Refrigerado .....	14
2.4 Sêmen Congelado .....	16
3. METODOLOGIA.....	16
3.1 Análise da Morfologia Espermática.....	19
3.2 Análise Estatística.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
5. CONCLUSÃO .....	25
REFERÊNCIAS .....	26

## 1. INTRODUÇÃO

Buscando melhoramento genético e melhores índices reprodutivos, as biotecnologias da reprodução têm sido amplamente empregadas na reprodução animal (COELHO; DIAS, 2021). Nos equinos, o sêmen diluído, refrigerado e transportado é a forma mais utilizada na inseminação artificial e representa uma excelente alternativa para a conservação e disseminação de materiais genéticos de alta qualidade, por maiores distâncias, evitando custos e estresse associados ao transporte de éguas até os garanhões (BLANCHARD et al., 2003; LOOMIS, 2006; KIEVITSBOSCH, 2011). Contudo, para obtenção de êxito na técnica de inseminação artificial é fundamental que os espermatozoides se mantenham viáveis durante todo o processo de refrigeração, congelamento, descongelamento, armazenamento, transporte até o momento da inseminação (AMANN; GRAHAM, 1993; SIEME et al., 2001). A estrutura mais susceptível ao choque térmico, quando exposta ao frio, é a membrana plasmática que recobre o espermatozoide, modificações nela podem impactar a permeabilidade resultando em alterações da função, do metabolismo, da motilidade e da capacidade fecundante da célula espermática (NUNES; ZÚCCARI; COSTA E SILVA, 2006). Neild et al. (2005) citam que a avaliação da qualidade biológica dos espermatozoides visa aumentar a capacidade de prever a fertilidade de garanhões doadores de sêmen. Um dos exames que avaliam os atributos do sêmen é o espermograma, composto pelo volume, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática (CBRA, 2013). Dentre esses parâmetros, as alterações morfológicas e de motilidade melhor se correlacionam com a fertilidade (ARRUDA et al., 2011; LOVE, 2011).

O espermograma, assim como o exame clínico geral, o exame clínico específico do sistema genital (escroto, testículos, epidídimos, cordões espermáticos, prepúcio e pênis), a avaliação do comportamento sexual e da índole do animal compõem o exame andrológico. Este é desejável para avaliar a aptidão reprodutiva de machos destinados à reprodução (CBRA, 2013). Todavia, ao longo dos tempos, os equinos foram selecionados prioritariamente quanto às aptidões esportivas e padrões raciais, desconsiderando a fertilidade, resultando assim em um significativo número de garanhões na reprodução com características de desempenho desejáveis, porém subfêrteis por diversas razões, algumas delas transmitidas geneticamente entre gerações (ARAÚJO; ARAÚJO, 2010; LOOMIS, 2006; NEILD et al., 2005). Além da fertilidade individual do garanhão, outros fatores podem influenciar a qualidade final do sêmen, como: as técnicas de preservação do sêmen, a taxa de diluição, a

taxa de resfriamento, condições de armazenamento, a concentração e o volume da dose inseminante (SIEME et al., 2001).

A fertilização do ovócito é um processo biológico extremamente complexo, sendo necessário que os espermatozoides possuam diferentes atributos (ARRUDA et al., 2011; BRITO, 2007). Dentre eles, para atingir o sítio de fertilização, é necessário que tenham motilidade progressiva e metabolismo para produção de energia, proteínas de membrana plasmática para se manterem vivos dentro do trato reprodutivo da fêmea, e por último, enzimas acrossomais intactas, fundamentais para penetração do espermatozoide na zona pelúcida do ovócito (OLIVEIRA, 2007) . Neste contexto, a relação entre avaliação *in vitro* de espermatozoides e a fertilidade *in vivo* requer mais pesquisas, motivando cientistas a desenvolverem novos ensaios laboratoriais buscando prever a fertilidade do sêmen com maior acurácia (ARRUDA et al., 2011).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar a correlação da porcentagem e do tipo de defeitos morfológicos espermáticos com a taxa de concepção no uso de inseminação artificial em equinos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Morfologia e Maturação Espermática

O espermatozoide é uma célula haploide, sua cabeça contém núcleo achatado, cromatina altamente condensada, composta por DNA e protaminas. Na extremidade anterior do núcleo, o acrossoma, com dupla camada de membranas, envolve o núcleo. Na extremidade posterior está a cauda do espermatozoide - constituída pela região do colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal (GARNER; HAFEZ, 2004; MARTINS; DODE; SILVA, 2016). Na espécie equina, a fixação abaxial da peça intermediária à cabeça do espermatozoide é fisiológica, sendo responsável por um movimento circular em uma alíquota específica de células (SIEME et al., 2001). Na peça intermediária encontram-se mitocôndrias, que geram a energia requerida para motilidade espermática. Na parte central da cauda do espermatozoide encontra-se o axonema - composto por nove pares de microtúbulos dispostos radialmente e um par central (GARNER; HAFEZ, 2004; MARTINS; DODE; SILVA, 2016).

A espermatogênese nos equinos leva em torno de 55 a 57 dias para ocorrer (RUA et al., 2014). Após esse período, os espermatozoides serão liberados na luz do túbulo seminífero (espermição), e seguirão do testículo para o epidídimo, onde ocorrerá a maturação epididimária, levando em torno de 09 dias (AMANN, 1993). Durante esta passagem haverá a maturação dos espermatozoides, adquirindo capacidade potencial de fertilizar os ovócitos, serão submetidos a diversas modificações funcionais como a compactação adicional da cromatina, maturação do acrossoma, desenvolvimento da capacidade de motilidade, perda de água progressiva, migração distal e eventual perda da gota citoplasmática (GARNER; HAFEZ, 2004). Assim, alterações morfológicas são provenientes de eventos ocorridos na espermatogênese, no transporte e/ou na maturação espermática epididimária (BRITO, 2007). Ainda, podem ser encontrados outros tipos celulares no ejaculado, são elas: células germinativas imaturas, medusas, células epiteliais, leucócitos, neutrófilos, eritrócitos e bactérias, geralmente ausentes em reprodutores sadios (CBRA, 2013; LOOMIS, 2006).

Para que ocorra a espermatogênese normal em mamíferos, é necessário que a temperatura testicular seja de 3°C a 5°C abaixo da temperatura corporal (BRITO, 2007). Em ganhões com termorregulação eficiente, a temperatura da superfície escrotal fica em torno de 35°C. Problemas na termorregulação resultam em anormalidades morfológicas nos espermatozoides (ALVARENGA; PAPA, 2009). Desordens endócrinas, desenvolvimento incompleto do epidídimo, degeneração do epitélio seminífero, genética, intoxicações, doenças,

nutrição, uso de corticoides, toxemias, inflamação das glândulas anexas também podem levar a anormalidades das células espermáticas (BRITO, 2007; MARTINS; DODE; SILVA, 2016).

### 2.1.1 Defeitos espermáticos

As anormalidades espermáticas foram classificadas de acordo com Blom (1973), e adaptação de Brito (2007) e Varner (2008) em porcentagem de defeitos espermáticos maiores e defeitos espermáticos menores. Assim sendo, os defeitos espermáticos menores causam menor impacto na fertilidade e os defeitos espermáticos maiores prejudicam mais a fertilidade e estão associadas à espermatogênese, patologias testiculares ou epididimárias (ARRUDA et al., 2015). No grupo das anormalidades de maior gravidade estão: formas teratológicas, acrossoma, gota protoplasmática proximal, subdesenvolvida, cauda enrolada na cabeça, cabeça isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal, contorno anormal, *Pouch formation* ou vacúolos, alterações na peça intermediária (fibrilação, fratura, edema, pseudogotas, outros), cauda fortemente dobrada ou enrolada, dobrada com gota protoplasmática distal anexa. No grupo de defeitos menores estão: gota protoplasmática distal, cabeça delgada, gigante, pequena, curta, larga, isolada normal, implantação retroaxial, oblíqua, cauda dobrada ou enrolada (BLOM, 1973; BRITO, 2007; VARNER, 2008).

### 2.1.2 Técnicas para avaliação da morfologia espermática

Conforme descrito por Arruda et al. (2011), o espermatozoide é uma célula translúcida, e sua visualização sob microscopia óptica comum (microscópio de campo claro) não é muito nítida, requerendo assim a utilização da técnica de esfregaço corado. Outra técnica aplicada na análise espermática é a de preparação úmida, onde os microscópios de contraste de fase ou de interferência diferencial são capazes de detectar os contornos celulares sem a utilização de corantes, reduzindo assim a incidência de artefatos (ARRUDA et al., 2011; AX et al., 2004; CBRA, 2013).

Em suma, avalia-se 200 espermatozoides, classificando o tipo e registrando a incidência de um defeito morfológico por célula (AX et al., 2004). O percentual de espermatozoides anormais no ejaculado não deve ser maior do que 30% na espécie equina. O sêmen refrigerado é considerado fora do padrão quando apresentar mais de 40% defeitos totais e mais de 20% de defeitos maiores. No sêmen congelado é desejável mais de 60% de células normais para a dose inseminante (CBRA, 2013).

## 2.2 Taxa de Concepção

A taxa de concepção é obtida a partir da razão entre o número de animais que estão prenhes, formaram embriões ou conceberam, pelo número total de inseminações realizadas, em determinado período, pode ser influenciada por fatores relacionadas à fêmea, ao macho, à técnica de inseminação artificial e a efeitos da criopreservação. Relacionadas às fêmeas, destacam-se a endometrite, urovagina, pneumovagina, piometra, traumas, deficiência nutricional, fatores endócrinos, idade, estresse, temperatura ambiente, defeitos no embrião e morte embrionária precoce (MAIA; OLIVEIRA; CROCOMO, 2019; PAPA et al., 1998; SILVA; UNANIAN; ESTEVES, 1998; WOODWARD; TROEDSSON, 2013).

Relacionadas aos machos, a concentração e volume da dose inseminante, alta frequência de espermatozoides morfologicamente anormais ou a alta incidência de um único defeito espermático são os fatores que impactam a taxa de concepção (ARRUDA et al., 2011; KATILA, 2005). Os fatores relacionados à técnica de inseminação artificial são ligados a frequência e o momento da inseminação artificial em relação à ovulação, local de deposição do sêmen e experiência do inseminador (COELHO; DIAS, 2021; XAVIER et al., 2009). E por fim, o processamento do sêmen, a manipulação, a refrigeração, o congelamento, o descongelamento, o armazenamento e o transporte do sêmen também podem modificar os resultados da taxa de concepção (SIEME et al., 2001).

## 2.3 Sêmen Refrigerado

A dose utilizada na técnica de inseminação artificial com sêmen refrigerado equino deve ter entre 10 e 75 ml, contendo  $500 \times 10^6$  espermatozoides progressivamente móveis (BRINSKO, 2006; CBRA, 2013). Existem dois tipos de sistemas para a refrigeração do sêmen, os ativos e os passivos (NUNES; ZÚCCARI; COSTA E SILVA, 2006). No Brasil, o sistema mais utilizado é o passivo, de menor custo, o sêmen é armazenado e transportado em caixa de isopor própria para esta finalidade (SILVA et al., 2017). Neste sistema, a taxa de refrigeração é variável de acordo com a temperatura ambiente, volume e temperatura inicial da amostra, podendo refrigerar o sêmen de 24 a 48h a uma temperatura entre 15°C e 5°C (COELHO; DIAS, 2021). O método ativo possui taxa de refrigeração pré-determinada, porém menos viável economicamente e por este motivo, menos utilizado (VALLE et al., 1999).

O metabolismo espermático é alto, com a queda da temperatura em 10°C, há a redução de 50% do metabolismo. Quando mantidos a 5°C somente 10% de seu metabolismo é necessário para manutenção da sobrevivência. Assim, a refrigeração atua reduzindo o metabolismo e o catabolismo espermático preservando-o por mais tempo (NUNES; ZÚCCARI; COSTA E SILVA, 2006; SQUIRES et al., 1999). Ao se resfriar o sêmen de 37°C a 5°C, a taxa de refrigeração deve ser controlada, principalmente entre 19°C e 8°C, interim com possibilidade de ocorrer o choque térmico (MORAN et al., 1992). A estrutura mais susceptível ao choque térmico quando exposta ao frio é a membrana plasmática que recobre o espermatozoide, composta por dupla camada lipídica, proteínas e carboidratos. Espermatozoides mais resistentes ao choque térmico geralmente possuem altas concentrações de colesterol na membrana plasmática. (AMANN; GRAHAM, 1993). A variação individual dos gametas implica em diferenças na composição da membrana plasmática do espermatozoide e do plasma seminal, o que reflete na resistência do sêmen no processo de refrigeração (BRINSKO et al., 2005; MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005). Objetivando diminuir danos durante a refrigeração do sêmen, podem ser adicionadas ao diluidor substâncias fonte de lipídeos e lipoproteínas como a gema de ovo e o leite, respectivamente (AMANN; GRAHAM, 1993).

Pesquisadores acentuam a necessidade da taxa de refrigeração lenta no processo de resfriamento do sêmen, não superiores a -0,05°C/min, entre 19 e 8°C, período crítico de maior susceptibilidade de ocorrência de lesões na membrana plasmática (MORAN et al., 1992; SQUIRES et al., 1999), a partir de 8°C até 5°C, pode ser feito de forma rápida, sem prejuízo para membrana espermática (SILVA et al., 2017). Além disso, para manutenção da fertilidade dos espermatozoides é fundamental uma taxa de diluição adequada, entre 1:4 a 1:19, refrigeração a 5°C e com 5% de plasma seminal, importante para manter a viabilidade do espermatozoide (JASKO et al., 1992).

A temperatura ideal de estocagem do sêmen não é unanimidade entre os pesquisadores. Há alguns trabalhos indicando 4 e 5°C como mais eficazes (LOVE et al., 2001; VARNER et al., 1988; VARNER et al., 1989) e outros trabalhos demonstrando a temperatura ideal sendo entre 15 e 20°C (BATELLIER et al., 2001; PROVINCE et al., 1985). O período de estocagem ideal é influenciado pela taxa de crescimento de microrganismos, pelas lesões celulares induzidas pelo frio que comprometem a integridade funcional e estrutural dos espermatozoides, pelos processos bioquímicos que desencadeiam a capacitação espermática prematura e estresse oxidativo da membrana espermática que inviabiliza a capacidade de

penetrar e fertilizar o ovócito (NUNES; ZÚCCARI; COSTA E SILVA, 2006; POMMER; LINFOR; MEYERS, 2002).

## 2.4 Sêmen Congelado

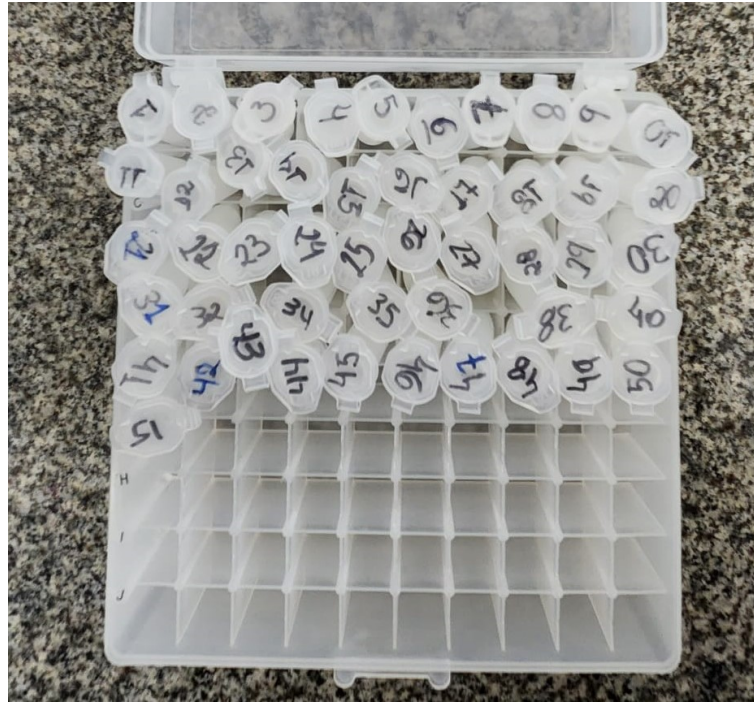
O congelamento de sêmen possibilita o armazenamento por tempo indeterminado, acomodado em contentores de nitrogênio líquido, o sêmen é envasado em palhetas e mantido a uma temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  (HOLT, 2000). O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) recomenda que haja entre  $100 - 200 \times 10^6$  espermatozoides móveis por palheta, totalizando uma dose inseminante convencional de  $400 \times 10^6$  espermatozoides móveis. Sieme et al. (2001), indicam que o regime de coleta para sêmen congelado seja de 48 horas, alterações neste intervalo podem influenciar no volume de sêmen ejaculado (MACIEL, 2014). Contudo, o sucesso da criopreservação de sêmen está relacionado à individualidade de cada ganhão e tais recomendações devem ser adaptadas quando necessário (SIEME et al., 2001). Ainda, existem os ganhões que não apresentam sêmen de boa qualidade pós-descongelamento, sendo a técnica contraindicada para estes animais (ALVARENGA; CARMO, 2007; XAVIER et al., 2009).

## 3. METODOLOGIA

As amostras de sêmen foram colhidas por meio de vagina artificial modelo para equinos Bothupharma® e manequim para monta do animal. Após a coleta, diluição, refrigeração, inseminação, uma alíquota de cada amostra foi reservada e inserida em microtubos graduados (1,5ml), contendo 500 $\mu\text{l}$  de solução de formol salina (DPBS + formol 4%) e armazenadas em suporte plástico tipo caixa (Figura 1), mantidos sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram numeradas e correlacionadas com dados registrados em ficha impressa, previamente desenvolvida, contendo as seguintes informações: número, nome do ganhão, data e hora da colheita, data e hora da inseminação, volume e concentração do ejaculado, confirmação de prenhez e observações gerais. A informação de prenhez foi obtida aos 14 dias pós inseminação, através de ultrassonografia transretal (modo B), identificando ou não a presença de vesícula embrionária no corpo uterino. As amostras foram recebidas e analisadas quanto à morfologia espermática no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, e também conservadas sob refrigeração de  $4^{\circ}\text{C}$  (Materiais utilizados na avaliação da morfologia espermática - Figura 2).



Figura 1 - suporte plástico tipo caixa contendo amostras numeradas.



Legenda: Total de 49 amostras de sêmen equino. Fonte: arquivo pessoal da autora (2023).

Figura 2 - Materiais utilizados na análise da morfologia espermática.



Legenda: A: pipeta (5 µl), B: ponteiros para pipeta, C: laminulas, D: lâminas, E: contador manual, F: óleo de imersão, G: suporte plástico tipo caixa contendo amostras de sêmen. Fonte: arquivo pessoal da autora (2023).

Foram utilizados dezesseis garanhões adultos ( $n = 49$  amostras), das raças Quarto de Milha, Puro Sangue Inglês e Manga Larga Marchador, com idade entre 05 e 10 anos, em

constante regime de colheita durante a estação de monta 2022/2023. Os animais recebiam nutrição balanceada, sal mineral e água *ad libitum*, mantidos em baias e soltos em piquetes individuais, meio período por dia. As fêmeas (49 animais) pertenciam às mesmas raças, com boa saúde geral e reprodutiva, foram inseminadas por profissionais experientes.

A taxa de concepção foi obtida através da razão entre o número de animais prenhes ou que formaram embriões (29 animais), dividido pelo total de inseminações realizadas (49 inseminações), sendo a taxa de concepção geral nesta estação de monta de 59,18% e conforme consta na tabela 1, a taxa de concepção individual por garanhão.

Tabela 1 - Taxa de concepção por garanhão e quantidade de ejaculados.

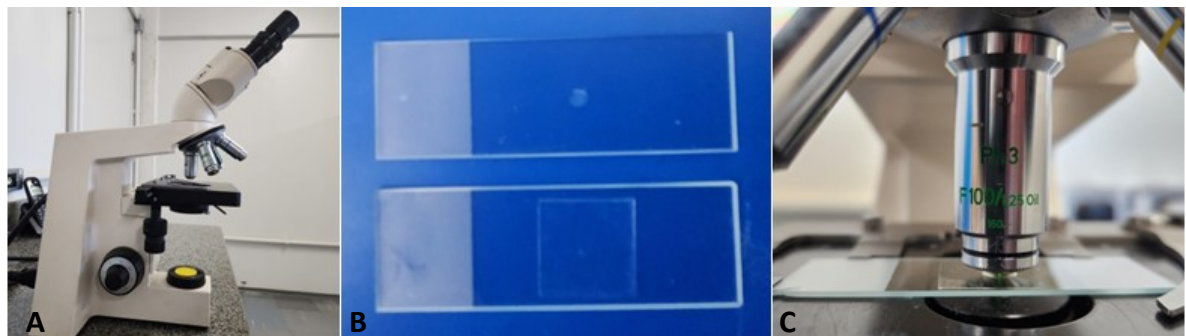
Nº garanhão	Taxa de concepção por garanhão	Nº de ejaculados
01	70%	10
02	80%	10
03	50%	06
04	60%	05
05	100%	03
06	100%	02
07	0%	02
08	0%	02
09	0%	02
10	100%	01
11	100%	01
12	100%	01
13	0%	01
14	0%	01
15	0%	01
16	0%	01

Fonte: Autora (2023).

### 3.1 Análise da Morfologia Espermática

A determinação da morfologia espermática foi feita através da técnica de preparação úmida, no microscópio de contraste de fase, modelo Standard 20 Zeiss®. Conforme descrito pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013), após ressuspensão das células mediante agitação, uma alíquota de sêmen diluído (5 µl) foi depositada sobre a lâmina e coberta por lamínula, sob óleo de imersão, na objetiva de 100X, foram avaliados 200 espermatozoides por amostra (Figura 3). Na avaliação da morfologia espermática foram registrados os defeitos individualmente e agrupados de acordo com os percentuais de defeitos maiores, menores, e defeitos totais (BLOM, 1973; BRITO, 2007; VARNER, 2008). Ainda, de acordo com instruções de Arruda et al. (2015) para avaliação da morfologia espermática, apenas um defeito por célula anormal foi registrado. Quando observado dois ou mais defeitos na mesma célula, foi registrado em ordem de prioridade, o defeito maior em relação ao menor e, quando observados dois defeitos de mesma categoria, registrou-se apenas o de maior importância para fertilização.

Figura 3 – Microscópio e técnica de avaliação espermática.



Legenda: A: microscópio de contraste de fase - modelo Standard 20 Zeiss®. B: Lâmina contendo alíquota de sêmen (5 µl) e coberta por lamínula. C: lamínula sob óleo de imersão na objetiva de 100X – técnica de preparação úmida. Fonte: arquivo pessoal da autora (2023).

### 3.2 Análise Estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando a normalidade do teste foi significativa ( $P < 0,05$ ) os dados foram transformados ou retirados os *outliers* e reavaliados. Foram realizadas correlações de Pearson entre os defeitos morfológicos espermáticos e a taxa de concepção utilizando o PROC CORR

do programa SAS (versão 9.4; SAS institute, Inc., Cary, NC, USA). A probabilidade de  $P \leq 0,05$  foi considerada como diferença significativa. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, ao avaliar a correlação entre a taxa de concepção por garanhão e os defeitos morfológicos espermáticos, não obtivemos alto coeficiente de correlação ( $r$ ) concomitante à significância estatística ( $P \leq 0,05$ ) (Tabela 2). Foi encontrada correlação positiva significativa ( $r = 0,62$  e  $p < 0,0001$ ) entre os defeitos gota protoplasmática proximal e gota protoplasmática distal, entre cabeça isolada patológica e cabeça isolada normal ( $r = 0,63$  e  $p < 0,0001$ ), entre acrossoma e cabeça delgada, gigante, pequena, curta e larga ( $r = 0,82$  e  $p < 0,0001$ ). Além disso, o Teste de Pearson apresentou correlação positiva significativa para cauda enrolada na cabeça e estreita na base ( $r = 0,73$  e  $p < 0,0001$ ), no entanto, a cauda enrolada na cabeça foi encontrada apenas em uma amostra. Foi encontrada correlação positiva significativa ( $r = 0,63$  e  $p < 0,0001$ ) entre o total de defeitos maiores e cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa e cauda fortemente dobrada ou enrolada ( $r = 0,63$  e  $p < 0,0001$ ). O total de defeitos menores apresentou correlação positiva significativa ( $r = 0,86$  e  $p < 0,0001$ ) com gota protoplasmática distal anexa. E por último, os defeitos totais apresentaram correlação positiva significativa ( $r = 0,91$  e  $p < 0,0001$ ) com o total de defeitos maiores e total defeitos menores ( $r = 0,61$  e  $p < 0,0001$ ).

Não encontramos correlação positiva significativa entre os defeitos espermáticos e a taxa de concepção neste estudo, provavelmente devido ao baixo número de amostras/animais participantes. Ao avaliar a morfologia espermática do garanhão 01 e garanhão 02 observamos elevada quantidade de defeitos maiores e defeitos totais nos ejaculados e excelente fertilidade, 70% e 80% respectivamente (Gráfico 1 e 2), o que contrapõe a ideia de Brito (2007), que afirma que a avaliação da morfologia espermática possibilita a identificação de garanhões inférteis ou subférteis, e que a fertilidade potencial é baixa quando houver alta proporção de espermatozoides com anormalidades. Nossos resultados para o garanhão 01 e 02 também sinalizam um aspecto controverso aos parâmetros estipulados de pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) para o sêmen equino. Por outro lado, Varner (2008) diz que espermatozoides morfológicamente anormais não influenciam diretamente na fertilidade dos garanhões, que o sêmen pode ter muitas anormalidades e mesmo assim o garanhão apresentar fertilidade normal, o que aparentemente ocorre nos garanhões 01 e 02 deste estudo. Saacke

(2008) justifica que tais achados (alta fertilidade e alta quantidade de defeitos espermáticos) pode ocorrer devido a existência de defeitos morfológicos compensáveis no sêmen, onde os espermatozoides apresentam anormalidades que impedem o seu movimento adequado pelo trato reprodutivo da fêmea até o sítio de fertilização, e com o aumento da dose inseminante contendo células funcionalmente competentes, são compensáveis e podem atingir sua fertilidade máxima. Os defeitos compensáveis citados por Saacke (2008) são os defeitos de cauda, gotas protoplasmáticas e defeitos sutis no formato da cabeça, compatíveis com os achados deste estudo de cauda dobrada ou enrolada, gota protoplasmática proximal e distal e cabeça delgada, gigante, pequena e larga que constituíram as principais anormalidades do garanhão 1 e 2.

Turner (2007) afirma que a morfologia espermática demonstra a saúde e funcionalidade testicular, dentre as anormalidades que apresentaram correlação positiva significativa no Teste de Pearson (Figura 4), ocorrem na espermatogênese os defeitos de cabeça delgada, gigante, pequena, curta e larga (distribuição anormal cromossômica) e cabeça isolada patológica que pode estar associada a comorbidades (ANGRIMANI et al., 2017). A cabeça isolada normal está relacionada a inflamação das glândulas acessórias, degeneração testicular ou aumento de temperatura testicular (BARTH; OKO, 1989). Defeitos no acrossoma podem surgir a partir de problemas durante a espermatogênese, maturação e transporte espermático, ou ainda, relacionados à criopreservação do sêmen (ARRUDA et al., 2015; WATSON, 2000). A gota protoplasmática proximal, gota protoplasmática distal, cauda fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa são anormalidades que ocorrem durante a maturação espermática, comumente encontradas em animais jovens devido a imaturidade sexual (SOARES; MACHADO-NEVES, 2020), no entanto, todos garanhões participantes deste estudo eram animais adultos, com intervalo de idade entre 05 e 10 anos, e encontravam-se em boa saúde geral e reprodutiva, deste modo, a morfologia espermática não demonstrou necessariamente a saúde e funcionalidade testicular, visto que os animais eram saudáveis e mesmo assim apresentavam anormalidades espermáticas, podendo então, ser apenas características normais do ejaculado destes garanhões. Devido ao baixo número de amostras, não conhecemos a real fertilidade dos outros garanhões (ganhão 03 ao 16), tão pouco, se os defeitos morfológicos espermáticos impactariam ou não a fertilidade deles.

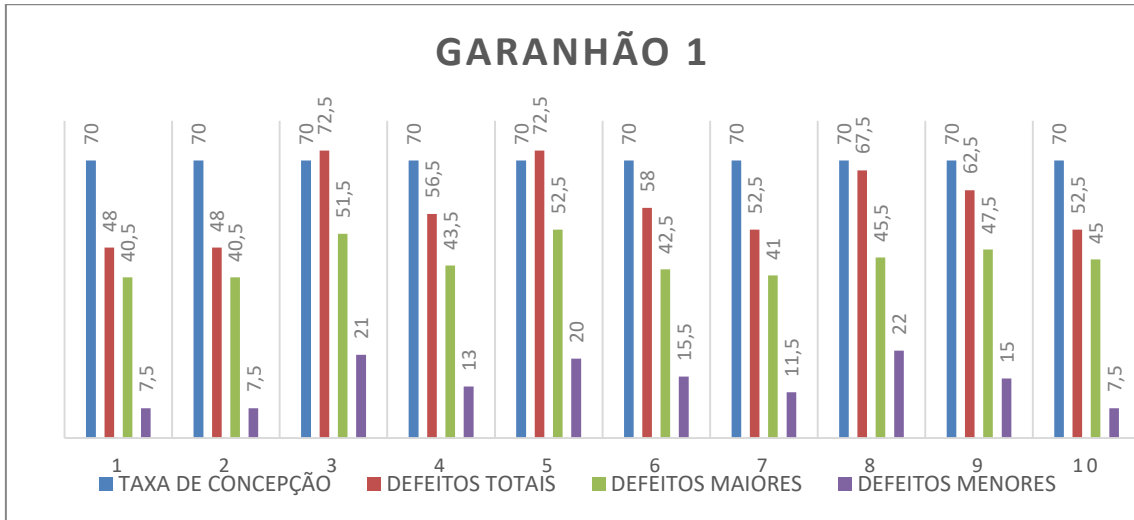
Tabela 2 – Coeficientes de correlação de Pearson entre prenhez, e defeitos morfológicos de espermatozoides de garanhões.

	<b>Taxa de Con. por garanhão</b>	<b>Formas Terat.</b>	<b>Acros.</b>	<b>Gota Proto. Prox.</b>	<b>Cauda Enr. na Cab.</b>	<b>Cab. Iso. Pato.</b>	<b>Fort. Dob. ou Enr.</b>	<b>Dob. com Gota Proto. Distal Anexa</b>	<b>Total Def. Mai.</b>	<b>Gota Proto. Distal</b>	<b>Total Def. Men.</b>
<b>Est. na Base</b>	-0,15	0,14	-0,02	-0,09	0,73*	-0,05	-0,18	-0,14	-0,07	0,05	-0,04
<b>Total Def. Mai.</b>	0,12	0,04	0,13	0,33	0,00	0,33	0,63*	0,63*	100	0,14	0,23
<b>Gota Proto. Distal</b>	-0,07	-0,04	-0,15	0,62*	-0,07	-0,02	-0,08	-0,14	0,14	100	0,86
<b>Del., Gig., Peq., Curta, Larga</b>	0,33*	-0,13	0,82*	-0,24	-0,05	0,16	0,05	0,05	0,08	-0,18	0,26
<b>Cab. Iso. Norm.</b>	-0,12	-0,03	-0,16	0,13	-0,10	0,63*	0,16	0,24	0,31	0,05	0,14
<b>Total Def. Men.</b>	0,07	-0,15	0,19	0,52	-0,14	0,17	-0,02	-0,03	0,23	0,86*	100
<b>Def. Totais</b>	0,13	-0,02	0,18	0,49	-0,06	0,34	0,51	0,50	0,91*	0,48	0,61*

\* indicam P-valor significativo ( $P \leq 0,05$ ). Legenda: **Acros**: acrossoma, **Cab**: cabeça, **Con**: Concepção, **Def**: Defeitos, **Del**: Delgada, **Dob**: dobrada, **Enr**: enrolada, **Est**: estreita, **Fort**: fortemente, **Gig**: gigante, **Iso**: isolada, **Mai**: maiores, **Men**: menores, **Norm**: normal, **Pato**: patológica, **Peq**: pequena, **Proto**: protoplasmática, **Prox**: proximal, **Terat**: teratológicas.

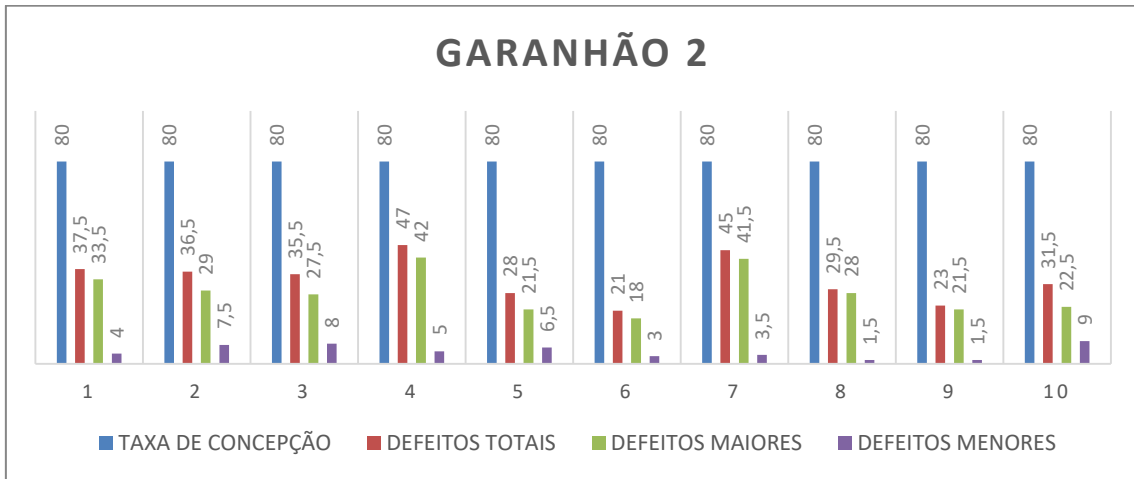
Fonte: Autora (2023).

Gráfico 1 – Taxa de Concepção por garanhão, defeitos totais, maiores e menores. - Garanhão 01.



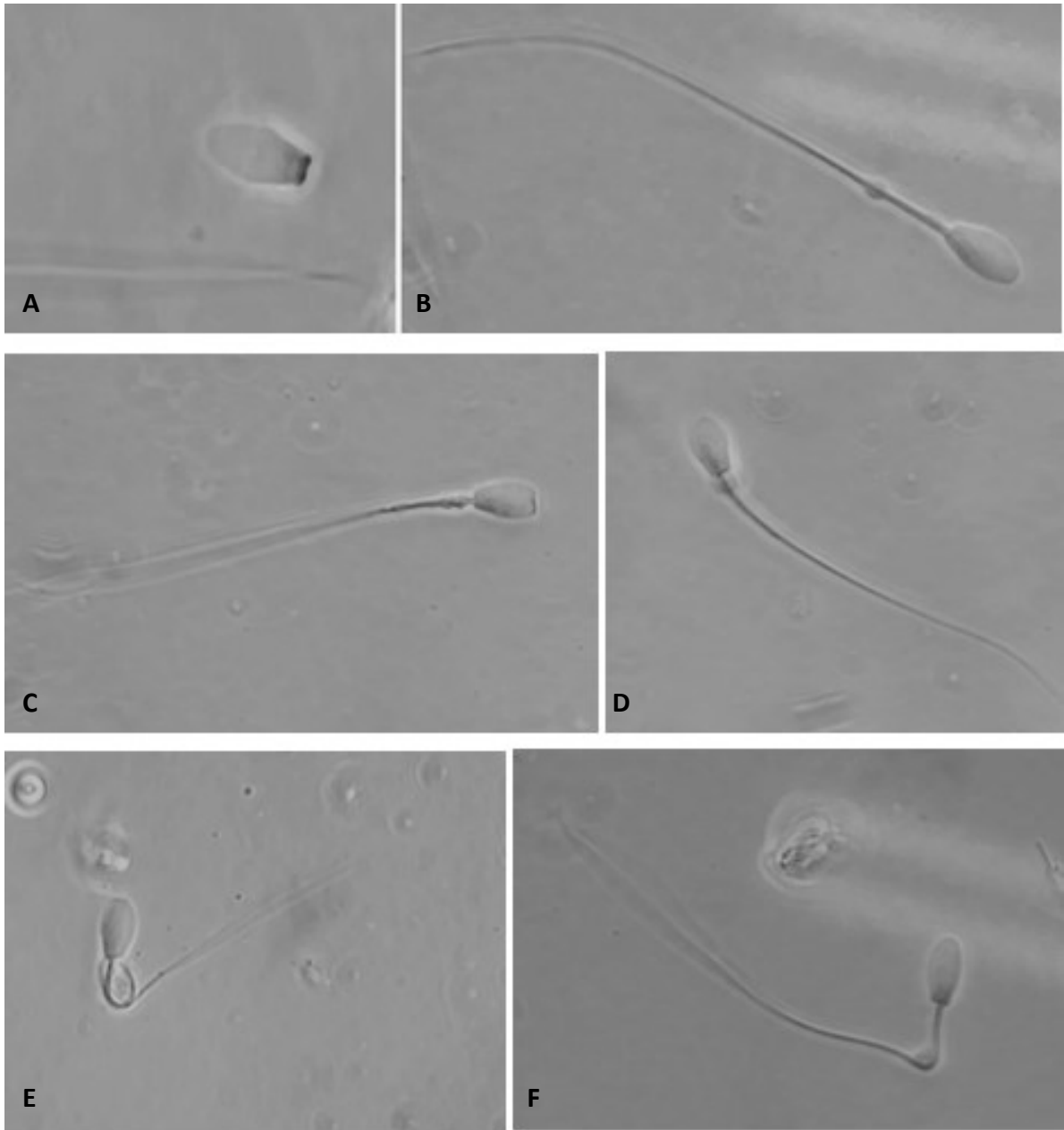
Fonte: Autora (2023).

Gráfico 2 - Taxa de Concepção por garanhão, defeitos totais, maiores e menores. - Garanhão 02.



Fonte: Autora (2023).

Figura 4 - anormalidades que apresentaram correlação positiva significativa no Teste de Pearson.



Legenda: A: cabeça isolada normal. B:gota protoplasmática distal. C: acrossoma. D: gota protoplasmática proximal. E: cauda fortemente dobrada ou enrolada. F: dobrada com gota protoplasmpatica distal anexa.  
Fonte: arquivo pessoal da autora (2023).



## 5. CONCLUSÃO

Não obtivemos resultados conclusivos na correlação da morfologia espermática com a taxa de concepção dos animais estudados, provavelmente devido ao baixo número de animais participantes. Animais com alta taxa de defeitos morfológicos espermáticos podem sim ter bons índices de fertilidade e isso pode estar atrelado a presença de defeitos compensáveis. A fertilidade do garanhão ainda não é totalmente estabelecida e novos estudos devem ser feitos para melhor correlacionar a avaliação *in vitro* de células com a fertilidade *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T. Biotecnologia em reprodução equina: O que há de novo para o veterinário de campo. **Brazilian Journal of Equine Medicine**, p.26-30, 2007. Disponível em: <http://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/ebba64683df2af06431d7ebb278a8000.pdf>. Acesso em: 07 maio 2023.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.6, p. 204-209, 2009. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/p204-209.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2023.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, v.7, p.715-745, 1993.
- ANGRIMANI, D. S. R. et al. Cytoplasmic droplet acting as a mitochondrial modulator during sperm maturation in dogs. **Animal reproduction science**, v. 181, p. 50-56, 2017. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432017300040?casa\\_token=GOskcRvDBW4AAAAA:tI4pWun8cE7mXD7QDy0kbiPvFwIFUdFD9LPy8LwqwqeqAAxqNyYTA20emh4mJteTV6orKgWDwXE](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432017300040?casa_token=GOskcRvDBW4AAAAA:tI4pWun8cE7mXD7QDy0kbiPvFwIFUdFD9LPy8LwqwqeqAAxqNyYTA20emh4mJteTV6orKgWDwXE). Acesso em: 10 jun. 2023.
- ARAÚJO, A.M. S.; ARAÚJO, S. A.C. Alterações Morfológicas Encontradas nas Células Espermáticas de Garanhões Pônei. **Revista Científica e Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 1-12, 15 jul. 2010. Semestral. Disponível em: <https://1library.org/document/y812k7rz-alteracoes-morfologicas-encontradas-celulas-espermaticas-garanhoes-poneiamanda-santanna.html>. Acesso em: 19 dez. 2021.
- ARRUDA, R.P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momentos atuais e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, pág. 145-151, 2011. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n2/RB385%20Arruda%20145-151.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2022.
- ARRUDA, R. P. et al. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, pág. 47-60, 2015. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n1/pag47-60%20\(RB572\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n1/pag47-60%20(RB572).pdf). Acesso em: 21 fev. 2022.
- AX, R. L. et al. Avaliação do Sêmen. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B.. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. Cap. 25. p. 369-394.

BATELLIER, F. et al. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 181-190, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432001001555>. Acesso em: 25 fev. 2022.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State University Press, 1989.

BLANCHARD, T. L. et al. **Manual of equine reproduction**. 2ª ed. USA: mosby, 2003. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?id=rzV7DjV\\_mr8C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?id=rzV7DjV_mr8C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false). Acesso em: 22 fev. 2022.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk veterinærmedicin.**, v. 25, p. 383-391, 1973. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4768226/>. Acesso em: 03 fev. 2022.

BRINSKO, S. P. et al. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1519-1527, 2005. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X0400247X?casa\\_token=XGUV8pjhXPAAAAA:ZWbImazgmidMLPZVP4U5NKxgs9AuHbPEZPQGxGEg86CbxrOjX1jPUcN8VE5\\_xzbMgdUZeYvhbw](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X0400247X?casa_token=XGUV8pjhXPAAAAA:ZWbImazgmidMLPZVP4U5NKxgs9AuHbPEZPQGxGEg86CbxrOjX1jPUcN8VE5_xzbMgdUZeYvhbw). Acesso em 06 fev. 2022.

BRINSKO, S. P. Insemination doses: how low can we go? **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 543-550, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X06002615?via%3Dihub>. Acesso em: 31 mar. 2023.

BRITO, L. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 249-264, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1534751607000418>. Acesso em: 06 fev. 2022.

COELHO, R. W. A.; DIAS, J. C. O. Freezing equine semen after 24 hours of cooling. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-21, 14 jan. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i1.9939>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/9939/10528>. Acesso em: 10 fev. 2022.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B.. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. Cap. 7. p. 97-110.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 62, n. 1-3, p. 3-22, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00152-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00152-4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10924818/>. Acesso em: 06 maio 2023.

JASKO, D. J. et al. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, n. 6, p. 1241-1252, 1992. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X9290180Y>. Acesso em: 06 fev. 2022.

KATILA, T. Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 89, n. 1-4, p. 31-38, out. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.023>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16061333/>. Acesso em: 07 maio 2023.

KIEVITSBOSCH, T. **Refrigeração de Sêmen de Garanhões**. 2011. 23 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011. Disponível em: [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/119530/kievitsbosch\\_t\\_tcc1\\_botfmvz.pdf?sequence=1](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/119530/kievitsbosch_t_tcc1_botfmvz.pdf?sequence=1). Acesso em: 21 fev. 2022.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 663-676, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073906000502?via%3Dihub>. Acesso em: 21 fev. 2022.

LOVE, C. C. et al. The relationship between chromatin quality and fertility of chilled stallion sperm. In: **Proceedings of the 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**. 2001. p. 229-231. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Dickson-Varner-2/publication/265261812\\_The\\_Relationship\\_Between\\_Chromatin\\_Quality\\_and\\_Fertility\\_of\\_Chilled\\_Stallion\\_Sperm/links/58092f5908ae1c98c2525f22/The-Relationship-Between-Chromatin-Quality-and-Fertility-of-Chilled-Stallion-Sperm.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Dickson-Varner-2/publication/265261812_The_Relationship_Between_Chromatin_Quality_and_Fertility_of_Chilled_Stallion_Sperm/links/58092f5908ae1c98c2525f22/The-Relationship-Between-Chromatin-Quality-and-Fertility-of-Chilled-Stallion-Sperm.pdf). Acesso em: 25 fev. 2022.

LOVE, C. C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 547-557, 2011. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11001270?casa\\_token=IzJ\\_h8yZwLkAAAAA:vR19yhSQKJqghgvJh4dwUrnVdiYxL5reGeZdhRLNZ8oodotwJVvjBFqJ2-0wZtSw7v3OIWVJNg](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11001270?casa_token=IzJ_h8yZwLkAAAAA:vR19yhSQKJqghgvJh4dwUrnVdiYxL5reGeZdhRLNZ8oodotwJVvjBFqJ2-0wZtSw7v3OIWVJNg). Acesso em: 29 jun. 2023.

MACIEL, A. C. **Viabilidade do sêmen equino armazenado em um sistema de polietileno para transporte por até oito horas**. 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/108172/000947912.pdf?sequence=1>. Acesso em: 06 maio 2023.

MAIA, H. G. O.; OLIVEIRA, N. J. F.; CROCOMO, L. F. Fisiologia e fatores interferentes na reprodução de éguas. **Ciência Animal**, v.29, n.4, pág. 112-123, 2019. Disponível em <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/11.%20n.4,%202019%20-%20REVIS%C3%83O%20LITERATURA%2005%20=%20Pg%20112-123.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2022.

MARTINS, C. F.; DODE, M. A. N.; SILVA, A. E. D.F. Atlas de morfologia espermática bovina. **Embrapa Cerrados-Livro científico (ALICE)**, 2016. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1052692/1/atlas-morfologia1412.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2022.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2372-2381, 2005. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04003796?casa\\_token=se28IJSAlCUAAAAA:4YBLnwfHKvjvQ3El2BD-sIXjOfcunaYV-A7YdUJXF\\_7ScUdh\\_EAxxi4SXj8rOFy9cJT2gCKHvQ](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04003796?casa_token=se28IJSAlCUAAAAA:4YBLnwfHKvjvQ3El2BD-sIXjOfcunaYV-A7YdUJXF_7ScUdh_EAxxi4SXj8rOFy9cJT2gCKHvQ). Acesso em 06 fev. 2022.

MORAN, D. M. et al. Determinação da temperatura e taxa de resfriamento que induzem choque frio em espermatozoides de garanhões. **Theriogenology**, v. 38, n. 6, pág. 999-1012, 1992. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X92901147>. Acesso em: 05 fev. 2022.

NEILD, D.N. *et al.* Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 89, n. 1-4, p. 47-56, out. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.017>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16054782/>. Acesso em: 08 maio 2023.

NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, p. 42-56, 2006. Disponível em: <http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB039%20Nunes%20p42-56.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2022.

OLIVEIRA, C. H. de. **Avaliação das características do espermatozóide equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas**. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Reprodução Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. Disponível em:

[https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SSLA-7UDHRY/1/camila\\_haddad\\_de\\_oliveira.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SSLA-7UDHRY/1/camila_haddad_de_oliveira.pdf). Acesso em: 15 jun. 2023.

PAPA, F. O. et al. Morte embrionária precoce em éguas: aspectos clínicos e hormonais. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia**, v. 35, p. 170-173, 1998. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/bjvras/a/J8VTTHN67fKNS6KZYvjz5cQ/?format=html&lang=en>. Acesso em: 04 fev. 2022.

POMMER, Â. C.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Capacitação e exocitose acrossomal são aumentadas pela incubação de espermatozoides de garanhões em um diluente de sêmen comercial. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, pág. 1493-1501, 2002. Disponível em:

[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02006593?casa\\_token=D-3bw1IOi2EAAAAA:c\\_e6j0Ulu-5G3lQltqFPHG8D5-tnFZTxJ20PWlIL\\_pJqeyiUcWhM2rtZd2GDE0kttYILRMXGSnYh](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02006593?casa_token=D-3bw1IOi2EAAAAA:c_e6j0Ulu-5G3lQltqFPHG8D5-tnFZTxJ20PWlIL_pJqeyiUcWhM2rtZd2GDE0kttYILRMXGSnYh). Acesso em: 11 fev. 2022.

PROVINCE, C. A. et al. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 23, n. 6, p. 925-934, 1985. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X8590010X>. Acesso em: 25 fev. 2022.

RUA, M. A. S. et al. **Espermatogênese em equinos**. PUBVET, Londrina, v. 8, n. 7, ed. 256, 2014. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Mariana-Ribeiro-19/publication/309367988\\_Espermatogenese\\_em\\_equinos/links/584f4cc808aeb989252cb65e/Espermatogenese-em-equeinos.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Mariana-Ribeiro-19/publication/309367988_Espermatogenese_em_equinos/links/584f4cc808aeb989252cb65e/Espermatogenese-em-equeinos.pdf). Acesso em: 22 mar. 2023.

SAACKE, R.G.. Sperm morphology: its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. **Theriogenology**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 473-478, ago. 2008. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.012>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X08001969>. Acesso em: 02 jun. 2023.

SIEME, H. et al. AI - sperm of the stallion: evaluation criteria and minimal standards-a survey. *Pferdeheilkunde*, v. 17, n. 2, p. 145, 2001. Disponível em:

<https://www.pferdeheilkunde.de/10.21836/PEM20010208>. Acesso em: 20 mar. 2023.

SILVA, L. T. et al. Comparação morfológica da célula espermática equina no sêmen fresco e refrigerado. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: ENCONTRO ANUAL DA BIOFÍSICA, 2017, Recife. Anais. Recife: UFPE, 2017. Disponível em:

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1081560/1/Marciane2017.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2021.

SOARES, C. M. T.; MACHADO-NEVES, M. 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. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v44/n3/RB864%20Soares%20diagramacao%20final%20com%20DOI.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2023.

SQUIRES, E. L. et al. Cooled and Frozen Stallion Semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, v. 9, p. 1-38, 1999. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63649051005.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2022.

TURNER, R. M. O. Pathogenesis, diagnosis, and management of testicular degeneration in stallions. **Clinical techniques in equine practice**, v. 6, n. 4, p. 278-284, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534751607000431>. Acesso em: 10 jun. 2023.

VALLE, G. R. et al. Utilização de um contêiner modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 505-514, 1999. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/L74RMTDQLK69JsYLQyxcB4S/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 04 fev. 2022.

VARNER, D. D. et al. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1043-1054, 1988. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X88800281>. Acesso em: 25 fev. 2022.

VARNER, D. D. et al. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20° C. **Theriogenology**, v. 32, n. 4, p. 515-525, 1989. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X89902732>. Acesso em: 25 fev. 2022.

VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 448-462, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X08002070>. Acesso em: 06 fev. 2022.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 481-492, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432000000993>. Acesso em: 09 jun. 2023.

WENKOFF, Martin S. **The evaluation of bulls for breeding soundness**. 1988.

WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. Equine breeding-induced endometritis: A review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 9, p. 673-682, 2013. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073708061200874X?casa\\_token=WEs4IZ9mW2EAAAAA:Me3D4KhnheEgl9b-x2mHOKRdxrzADc7j7r1RTR0syuZsw5vS0paWqrpQIfSlpVhvJgYJ5q8uJ3st](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073708061200874X?casa_token=WEs4IZ9mW2EAAAAA:Me3D4KhnheEgl9b-x2mHOKRdxrzADc7j7r1RTR0syuZsw5vS0paWqrpQIfSlpVhvJgYJ5q8uJ3st) . Acesso em: 21 fev. 2022.

XAVIER, I. L.G.S. et al. Fertilidade de éguas inseminadas no corpo ou no ápice do corno uterino com diferentes concentrações espermáticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 50-56, fev. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352009000100008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/WLXVMR4dFjy98YFycnyC7p/>. Acesso em: 07 maio 2023.