

COLETA E ANÁLISE MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DE SEMÊN EQUINO

CANEPA, Gabriela de Godoy¹
LUCAS, Gabriel Helio da Costa Calbar¹
LACERDA, Tainara Farias¹
NUÑES, Valentina Zaballa^{1*}
ROSSATO, Andressa Dutra Piovesan²
TEIXEIRA, Bruno Borges Machado²
SIMÕES, Michele da Rosa Scholant²
VAN DER LINDEN, Liana de Salles²
CORADINI, Márcia Goulart Lopes²

RESUMO: A indústria equina mundial exerce importante papel como fonte geradora de renda e empregos, com isso, a biotecnologia da reprodução se coloca como uma importante ferramenta a serviço da equideocultura mundial, como instrumento direto do melhoramento genético. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o sêmen de um equino da raça Crioula de 12 anos de idade. Para a realização deste trabalho coletou o sêmen do equino através do método da vagina artificial para avaliação das características macroscópicas como aspecto, odor, volume e densidade, bem como, características microscópicas como concentração, motilidade, vigor e suas patologias. Com relação aos resultados, se obteve motilidade de 70% e vigor de 4, estando dentro dos parâmetros para a espécie estudada. Foram analisadas também a integridade das membranas que obteve como resultado 85% de espermatozoides íntegros, sendo um resultado desejável, pois mostra que tem uma porcentagem maior de espermatozoides íntegros que com membrana lesada. Dando finalidade ao trabalho avaliamos a morfologia de outro sêmen, que foi coletado com fins de complementar o trabalho, devido a problemas de avaliação das lâminas no primeiro momento do trabalho, diferenciamos os defeitos em defeitos totais que obteve como resultado 51,5%, defeitos maiores 8,5 e defeitos menores 43%. Concluiu-se com este trabalho a importância do estudo das biotecnologias para análises de sêmen e a importância para a equinocultura do Brasil, também concluímos que os resultados encontrados na análise do sêmen estudado, esta entre os parâmetros para a espécie Crioula e um sêmen de extrema qualidade.

Palavras-chave: Biotecnologia; Análise Seminal; Equino; Macroscópica; Microscópica.

ABSTRACT: The world equine industry plays an important role as a source of income and jobs, and reproduction biotechnology is an important tool in the service of world equideoculture as a direct instrument of genetic improvement. Thus, the objective of this work was to evaluate the semen of a 12-year-old Crioula equine breed. In order to perform this work, the equine semen was collected through the artificial vagina method to evaluate macroscopic characteristics such as appearance, odor, volume and density, as well as microscopic characteristics such as concentration, motility, vigor and its pathologies. Regarding the results, motility of 70% and vigor of 4 were obtained, being within the parameters for the species studied. The integrity of the membranes was also analyzed, which resulted in 85% of intact spermatozoa, being a desirable result, since it shows a higher percentage of intact spermatozoa than with damaged membrane. In order to evaluate the morphology of another semen, which was collected with the purpose of complementing the work, due to problems of evaluation of the slides in the first moment of the work, we differed the defects in total defects, which resulted in 51.5% defects greater 8.5 and minor defects 43%. We conclude that the results obtained in the analysis of the semen studied are among the parameters for the Crioula species and a semen of the extreme semen. In this work the importance of the study of biotechnologies for semen analysis and the importance for the equine culture of Brazil, quality.

Keywords: Biotechnology; Seminal Analysis; Equine; Macroscopic; Microscopic.

¹ Docentes do Curso de Medicina Veterinária, Nível 4 2017/2 - Faculdade IDEAU – Bagé/RS.

² Discentes do Curso de Medicina Veterinária, Nível 4 2017/2 – Faculdade IDEAU – Bagé/RS.

*E-mail para contato: zaballavalentina@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A indústria equina mundial exerce importante papel como fonte geradora de renda e empregos. Em um recente estudo estimativo sobre a indústria do cavalo no Brasil, demonstrou-se que o rebanho efetivo é de cerca de 8,5 milhões de equinos. Esse segmento agropecuário é responsável pela geração de 600 mil empregos diretos e 3,2 milhões de empregos indiretos (CNA, 2006). A biotecnologia da reprodução se coloca como uma importante ferramenta a serviço da equideocultura mundial, como instrumento direto do melhoramento genético. Dadas as vantagens proporcionadas pela inseminação artificial, esta talvez seja a biotecnologia com maior impacto na produção equina, pois um reprodutor pode deixar centenas de descendentes ao longo de sua vida reprodutiva quando a inseminação artificial (IA) é usada eficientemente.

O transporte e a coleta de sêmen eqüino, não é, em si, um fato novo, podendo até mesmo ter sido responsável pela primeira citação na literatura, envolvendo a inseminação artificial (IA) nos animais domésticos, conforme relatos em textos árabes no ano de 1322, quando um chefe determinou que coletassem sêmen de um garanhão de uma tribo rival para realizar a inseminação de uma de suas éguas (DAVIES-MOREL, 1999).

O sêmen garanhão é o mais valioso sêmen da terra, que requer uma atenção especial na sua recolha e cuidados na sua coleta e análise, a coleta depende muito da saúde reprodutiva dos machos, um fator decisivo para programas de acasalamento utilizando monta natural ou inseminação artificial.

Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo coletar sêmen de um eqüino da raça Crioula com 12 anos de idade, de pelagem Gateado Típico pesando 513 kg, que localiza-se em Dom Pedrito/ RS. Foi realizada análises macroscópicas e microscópicas, além da avaliação de pontos negativos e positivos da coleta de sêmen.

2 DESENVOLVIMENTO

Nesta parte do trabalho será detalhado o referencial teórico, a metodologia empregada e os resultados encontrados. Contém a exposição ordenada e pormenorizada do assunto tratado do estudo.

2.1 Referencial Teórico

2.1.1 Anatomia e Fisiologia do Trato Genital do Macho Equino

O sistema genital do garanhão é composto pelos testículos, epidídimo, canal deferente, uretra (pélvica e peniana), pênis e prepúcio. O garanhão possui três glândulas acessórias importantes: as vesículas seminais, com função de produzir a maior parte do sêmen, servindo para o transporte e nutrição dos espermatozóides; a próstata, com função de neutralizar o pH ácido da vagina; e as glândulas bulbouretrais, que limpam a uretra e ao final da ejaculação secretam uma espécie de “tampão”, que é espermicida e serve para dificultar a fecundação por outros machos (DITTRICH, 2008).

No macho, a produção de espermatozóides se dá com a produção de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) pelo hipotálamo, que atua na hipófise provocando a liberação de LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio estimulante do folículo). O LH vai atuar nas células de Leydig, estimulando a produção de testosterona, enquanto que o FSH irá atuar nas células de Sertoli, que liberam proteínas importantes na produção e diferenciação dos espermatozóides. A testosterona é responsável pelo comportamento de garanhão, libido, e manutenção dos caracteres sexuais secundários (DITTRICH, 2008).

O garanhão ideal seria aquele com bom temperamento, saudável, com aparelho reprodutor funcional, apresentando sêmen de qualidade (análise quantitativa e qualitativa), boa genética e morfologia e com bom desempenho competitivo. A estação de monta nos equinos vai de setembro a fevereiro na maioria das raças, que é exatamente onde ocorre a maior parte dosaios férteis (DITTRICH, 2008).

2.1.2 Andrologia e Biotecnologia de Sêmen em Garanhões

Como descrito por Canibal et al. (2013), o exame andrológico é uma importante avaliação reprodutiva feita em garanhões, visando observar além das condições do sêmen, também toda a função reprodutiva do animal, ou seja, estado geral, aparelho locomotor e aparelho genital externo.

O exame inicia-se com uma avaliação geral do animal: idade, dentição, batimentos

cardíacos e respiratórios, nutrição, uso de quaisquer medicamentos ou suplementação, histórico de doenças e de temporadas passadas (quantidade de éguas cobertas, índices de prenhes), (CANIBAL,2013).

Logo, se avalia o aparelho reprodutivo externo incluindo prepúcio, pênis, testículos e epidídimo, e o aparelho reprodutivo interno, as chamadas glândulas anexas, através da palpação retal e com o auxílio da ultra-sonografia (CANIBAL,2013).

A seguir, coleta-se o sêmen do reprodutor (pode haver a necessidade de duas ou mais coletas) para a análise de suas características macroscópicas (volume, aspecto, odor) e microscópicas (concentração, motilidade e patologias) a fresco, em seguida, dilui-se e armazena-se adequadamente uma pequena porção para posterior análise em 24 e 48 horas, com o objetivo de avaliar durabilidade do sêmen. Ainda segundo (CANIBAL,2013) o exame andrológico deve ser feito antes da temporada de monta e antes da compra e venda do reprodutor. Através dele, o Médico Veterinário pode estimar a quantidade de éguas a serem cobertas, assim como o manejo mais adequado para a monta, podendo optar pela monta natural, monta controlada ou inseminação artificial (conforme regulamento de cada raça).

O laudo de um exame andrológico nunca é definitivo, pois o animal pode vir a sofrer alguma injúria ou patologia que leva à redução de sua capacidade reprodutiva, tendo, portanto, validade máxima de 60 dias. Assim, o exame deve ser realizado regularmente a fim de que possam tomar as devidas providências com relação aos reprodutores (CANIBAL,2013)

2.1.3 Colheita de Sêmen em Garanhões

As recuperações de células espermáticas podem ser obtidas por várias técnicas como vagina artificial (PICKETT, 1993), estimulação manual (McDONNELL & LOVE, 1990), eletroejaculação (CARY et al., 2004), ejaculação química (JOHNSTON & DeLUCA, 1998; McDONNELL, 2001) e colheita de espermatozóides cauda do epidídimo (PAPA, 2008; MONTEIRO, 2010).

A técnica de colheita de sêmen mais utilizada em equinos é a da vagina artificial (VA) fechada. Há diversos tipos de VA fechada como: Hanover, Colorado, Botucatu, Nishikawa, Missouri, entre outros, sendo que as mais utilizadas em território nacional são: modelo Hanover e Botucatu (PAPA, 2008; MONTEIRO, 2010).

A colheita com vagina artificial pode ser feita com manequim (fantoche ou égua), a temperatura da vagina artificial deve estar entre 42 e 45°C. Deve lavar-se o pênis do garanhão antes da colheita de sêmen (apenas com água). Não deve usar-se muito lubrificante na vagina artificial, porque o lubrificante quando em contato com a vagina acaba atrapalhando o movimento espermático, o espermatozóide adere-se no lubrificante e não consegue movimentar-se (PAPA, 2008; MONTEIRO, 2010).

O incremento da criopreservação do sêmen equino possibilitou a preservação de células espermáticas de animais de alto valor genético. No entanto, alguns processos patológicos ou morte súbita do garanhão podem dificultar a recuperação espermática. Nestes casos, existem técnicas complementares como a ejaculação química (McDONNELL, 2001) e colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo (PAPA et al., 2008; MONTEIRO, 2010), que possibilitam a preservação do material genético desses animais.

2.1.4 Colheita de Espermatozóides do Epidídimo

De acordo com JAMES et al., (2002) a colheita de espermatozóides epididimais pode ser a última chance para assegurar a preservação do material genético após lesão ou morte do reprodutor. Estudos têm demonstrado que espermatozóides epididimais podem ser usados na inseminação artificial, fertilização “in vitro” e injeção intracitoplasmática de espermatozóides com resultados satisfatórios.

A primeira dificuldade na utilização dos espermatozóides epididimais é a obtenção dos espermatozóides da cauda do epidídimo. Muitos métodos de recuperação são descritos e variam dependendo do autor e da espécie animal. No caso dos pequenos animais devido ao tamanho do epidídimo, o método de preferência (flutuação) consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo e deixar repousar em um meio gelatinoso, desta maneira, os espermatozóides migram para o meio e são recuperados através de filtração (YU e LEIBO, 2002). Esta técnica também é usada para obter amostras de espermatozóides de grandes animais (SILVA et al., 2003).

Uma técnica similar consiste em fazer numerosos cortes na cauda do epidídimo e pressionar suavemente a cauda e colher os espermatozóides por 19 extravasamento (KAABI et al., 2003). Outra possibilidade é usar uma agulha e perfurar os túbulos (BARTELS et al., 2000). KISHIKAWA et al. (1999), utilizaram pinças para comprimir a cauda do epidídimo de ratos e

recuperar os espermatozóides. Outro método consiste em promover um fluxo retrógrado na cauda do epidídimo aplicando pressão nos vasos deferentes até que o conteúdo da cauda saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo (GARDE et al., 1994). A pressão é gerada com uma seringa, que injeta ar ou algum líquido não prejudicial aos espermatozóides ou algum tipo de diluente (LAMBRECHTS et al., 1999; COMIZZOLI et al., 2001). MARTINEZ-PASTOR et al. (2006), demonstraram que a colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo através do fluxo retrógrado é a técnica mais indicada, pois as amostras obtidas são menos contaminadas e de melhor qualidade seminal em relação aos outros métodos. Possui a limitação de ser usada para grandes animais devido ao tamanho do epidídimo e ser mais complexa que as outras técnicas. No experimento de GRANEMANN et al., (2006) a colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo de eqüinos através da técnica modificada de fluxo retrógrado, pôde ser realizada de maneira rápida e eficiente.

Normalmente duas técnicas são utilizadas para a colheita de espermatozóides do epidídimo em equinos, flutuação e fluxo retrógrado. Estudos com inseminação na extremidade do corno uterino e injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) mostraram valor satisfatório com sêmen recuperado da cauda do epidídimo. Baseado na possibilidade de colheita e nos resultados de fertilidade, conclui-se que estes espermatozóides podem ser utilizados com êxito em técnicas de reprodução assistida, visando a obtenção de produtos de animais geneticamente superiores (PICKETT, 1993).

2.1.5 Análise do Sêmen

Segundo Monteiro et al (2010) assim que o ejaculado chega ao laboratório este deve ser mantido em banho-maria a 37°C, após deve ser avaliado pelos distintos análises.

Análise Macroscópica, avalia, volume, cor, odor, pH e densidade. O volume pode variar de 20 a 80 mL (livre de gel), a cor é definida como branco ou acinzenado. O odor “Suis-generis”, o PH determinado e de 7-7,5 e a densidade estabelecida de e aquoso a leitoso.

Após isso é feita a Análise Microscópica que é onde avalia-se a motilidade espermática, vigor espermático, morfologia espermática, integridade da membrana plasmática e para finalizar a concentração espermática

A Motilidade espermática, avalia a porcentagem de células móveis (classificação 0 a 100%). O Vigor espermático é a intensidade de deslocamento dos espermatozóides

(classificação 0 a 5), a integridade de membrana plasmática deve possuir coloração supra vital, teste hiposmótico e sondas fluorescentes (MONTEIRO, 2010)

A Morfologia espermática é definida com Karras modificado ou eosina-negrosina, e o análise do número de espermatozoides/ mm³ e a concentração espermática.

O cálculo de concentração espermática é feito após a homogeneização, os dois retículos da câmara de Neubauer serão preenchidos com a amostra já diluída. Serão contados os espermatozoides presentes em 5 quadrados na região central de cada retículo. O valor encontrado é referente a concentração espermática por mm³, para converter esse dado para mL, basta multiplica-lo por 10⁶.

2.1.6 Degeneração Testicular

A degeneração testicular caracteriza-se por processos degenerativos e neuróticos das células germinativas. É uma afecção de origem multifatorial, e pode apresentar-se de maneira uni ou bilateral, a depender da cauda, temporária ou permanente e podendo variar de discreta a severa sob o ponto de vista patológico (CAMP, 1997).

A degeneração testicular leve pode ser detectada apenas de forma microscópica, mas quando é grave e crônica, o testículo apresenta-se pequeno e firme. As causas são inúmeras e, em um indivíduo em particular, a causa específica geralmente é desconhecida. A degeneração pode ser unilateral ou bilateral, dependendo da causa ser sistêmica ou local. Em machos jovens em forma de crescimento, a distinção entre a degeneração testicular e a hipoplasia é difícil quando se utilizam apenas características morfológicas (FOSTER, 2009).

Duas lesões estão geralmente associadas, pois testículos hipoplásicos são propensos a degeneração. A inflamação também pode estar sobreposta a degeneração quando há obstrução, levando a uma pressão retrógrada, a ruptura dos túbulos seminíferos e a formação de granulomas espermáticos. A recuperação de um testículo degenerado é possível caso o agente agressor seja eliminado e os danos não sejam muito graves (MCGAVIN; ZACHARY, 2009).

As perdas econômicas resultante desta doença em equinocultura são substanciais (TUNER, 2012).

Falando em etiologia Foster et al (2009) afirma que são muitos os agentes específicos da degeneração testicular, e dados de pesquisas indicam que são muitos os agentes que atuam

via apoptose das células germinativas. Febre ou calor produzidos pela inflamação da pele escrotal são causas clássicas da degeneração testicular.

2.1.7 Migração Errática de Nematódeos

Os nematodeos do gênero *Strongylus* e *Setaria* são capazes de fazer migração errática nos testículos dos equinos e provocar mudanças de característica inflamatória. Estes parasitas podem ser observados no parênquima testicular e epididimo e, mais raramente na túnica vaginal, particularmente em cavalos jovens. Uma hipótese é que os parasitas atingem o testículo através da artéria espermática ou diretamente pelo peritônio, movendo-se sob a túnica vaginal do cordão testicular (MCENTEE,1990). Se o parasita morre nestes locais desenvolve-se uma reação granulomatosa. A maioria das infestações não demonstram manifestação clínica, com exceção das infestações maciças que provocam aumento do tamanho testicular (DE VRIES,1993).

Em um estudo larvas de *Strongylus* spp foram detectadas em testículos de 11 animais, entre dois e sete anos de idade. Um dos animais era criptorquida bilateral com presença de larvas em ambos testículos, enquanto os outros animais tinham somente uma gônada afetada. Sendo abdominal em sete casos, inguinal em dois e escrotal em um caso. As larvas e suas extensões foram observadas no cordão testicular e no testículo, da túnica albugínea ao centro do parênquima. As extensões consistem de canais de cerca de dois milímetros contendo leucócitos, sendo muitos eosinófilos, e hemorragias que podem se estender ao parênquima adjacente. Geralmente não se observam outros sinais clínicos decorrentes da invasão do parasita no testículo (SMITH,1973; LADDS, 1993).

2.2 Material e Métodos

A execução da parte prática do presente trabalho teve início no dia 02 de setembro de 2017, para a coleta de sêmen foi utilizado um garanhão da raça Crioula pelagem gateada típico, pesando 513 kg, no período fora da temporada de monta, o garanhão localizava-se em Dom Pedrito/RS. A coleta foi realizada utilizando como manequim uma égua fora do período de cio. A vagina artificial utilizada foi a Botucatu, sendo constituída por três porções principais que são: tubo rijo, mucosa interna e copo coletor. A vagina utilizada para a coleta continha, mucosa

de latex e mucosa de plástico descartável, a que teve contato direto com o pênis foi a mucosa de plástico justamente por ser descartável. Entre o tubo rijo e a mucosa interna encontra-se um espaço que foi preenchido com água quente. Após sua montagem e enchimento com 2 litros de água aquecida a 45°C, devido à perda de calor para o material que compõe a vagina artificial. Antes de coletar verificamos a temperatura para ter certeza que não estava com uma temperatura elevada, assim evitando o estresse do animal e até mesmo uma lesão mais grave no pênis, lubrifica-se a mucosa interna da porção proximal da vagina artificial com gel estéril, com a finalidade de lubrificar e não machucar o pênis do cavalo, lembrando que o uso excessivo pode dificultar o transporte espermático.

Quando foi feita a coleta as variáveis avaliadas foram: tempo de reação (TR), ocorrido após a aproximação do manequim e a ereção do pênis, tempo para a monta (TM), período entre a ereção e a monta, tempo de ejaculação (TE), reflexo de flehmen (RF), cheirar, morder ou lamber partes do manequim. Também avaliamos se o cavalo faria movimento de bandeira coisa que 99% dos cavalos fazem no momento da ejaculação, entre outros comportamentos esperados em garanhões no momento da monta e coleta do sêmen.

Os materiais utilizados para a coleta e análises foram: Vagina artificial Botucatu, copo coletor de sêmen, lâminas, pipeta automática, eppendorf, câmera aquecedora, microscópio, saco plástico (mucosa descartável), lubrificante, água destilada, óleo de imersão.

2.2.1 Análises Macroscópicas e Microscópicas do Sêmen

Após a coleta de sêmen, analisou-se suas características macroscópicas, como aspecto, odor, volume e densidade.

Posteriormente realizamos a análise microscópica após ter filtrado o sêmen, avaliando concentração, motilidade, vigor e suas patologias.

A concentração foi avaliada através da câmera de Neubauer, foi feita uma diluição, utilizando 19 gotas de água destilada para uma gota de sêmen, diluiu-se bem e foi feita a contagem.

O cálculo de concentração espermática foi feito após a homogeneização, os dois retículos da câmara de Neubauer foram preenchidos com a amostra já diluída.

Posteriormente no microscópio foram contados os espermatozoides presentes em 5 quadrados na região central de cada retículo. O valor encontrado é referente a concentração espermática por mm³, para converter esse dado para mL, basta multiplica-lo por 10⁶.

Após esse processo fizemos a coloração com eosina, uma gota de eosina para uma gota de sêmen com a finalidade de avaliar a integridade das membranas. Após a secagem da lâmina fomos analisá-la no microscópio contamos 200 células aleatoriamente, sendo que os espermatozoides que estavam com coloração rosa avermelhado, estavam com a membrana lesada o que permitiu a entrada do corante, os demais que não se coraram são classificados como íntegros.

Posteriormente avaliamos a motilidade, nada mais é do que a porcentagem de movimentação de células vivas. A avaliação foi realizada observando-se a extremidade de uma gota de sêmen puro colocada sobre uma lâmina, em objetiva de 40x. Logo após foi feita a avaliação do vigor espermático que é a intensidade de deslocamento dos espermatozoides.

Em seguida foi realizado esfregaço de 10 lâminas e coloração das mesmas para avaliar a morfologia no dia 5 de setembro de 2017 Faculdade Ideau- Bagé/RS, porém ficaram em péssimo estado de visualização, então como não tínhamos mais sêmen disponível para realizar esfregaço em outras lâminas, optamos por fazer a morfologia de outro sêmen, com a finalidade de dar continuidade a técnica e aprender a avaliar as morfologias.

Então dando continuidade a técnica, para realizar a morfologia utilizamos kit panótico rápido, para fazer a coloração, o primeiro passo foi pegar as três soluções e colocar em diferentes beakers. Segundo passo, com a pipeta pegamos uma gota de sêmen fresco e pingamos na lâmina, realizando assim o esfregaço, utilizou-se o bico de bulbo com a finalidade de secar melhor e rapidamente a lâmina. No terceiro passo começamos a coloração com o Panótico rápido I,II,III.

A primeira coloração a ser utilizada é a de triarilmetano, a segunda coloração compõe-se por uma solução de xanteno e a terceira coloração é composta por uma solução de tiazina. Ambas as soluções a 0,1%, foram submergidas por 30 segundos, posteriormente foram lavadas com água deionizada e após esse processo aguardamos que secassem as lâminas.

Após esses processos avaliamos as lâminas no microscópio, utilizando óleo de imersão, avaliamos em: bons, e os que possuíam defeitos, esses defeitos foram separados em defeitos maiores e defeitos menores.

2.3 Resultados e Discussão

A realização da parte prática do trabalho findou-se quando o sêmen foi avaliado de todas as formas propostas anteriormente. Um ponto positivo da utilização da vagina artificial

Botucatu é que ao colocar a água quente podemos completa-la com ar, então preparamos para ficar com a temperatura que desejamos podendo completa-la para não ficar tão pesada, principalmente no verão que demora a esfriar a mucosa pela água muito quente e o excesso de calor.

O cavalo avaliado foi fácil e rápido de coletar, não apresentou reflexo de flehmen, o tempo de reação foi de 25 segundos períodos entre a ereção e a monta, mordeu a égua.

O tempo de ejaculação foi de 55 segundos, onde juntamente fez movimento de bandeira. O aspecto do sêmen foi branco acinzentado, o volume em torno de 60% (livre de gel), a densidade estabelecida foi aquosa.

A avaliação microscópica começou com a concentração espermática, após avalhamos a integridade das membranas, lembrando que coramos as lâminas com eosina e identificamos os espermatozóides que estavam com a membrana lesada (coloração avermelhada) e os que estavam com coloração íntegra.

A motilidade foi avaliada visualmente por tanto, fizemos aproximadamente para ter uma motilidade mais concreta, logo avaliando também sua motilidade progressiva. Após avaliamos a intensidade de deslocamento dos espermatozóides, ou seja, o vigor, lembrando que o vigor é de 0 a 5%.

Finalizamos a avaliação microscópica com a avaliação morfológica, onde como já foi citado antes, devido a problemas com a coloração das lâminas optamos por fazer a morfologia de outro sêmen, com a finalidade de dar continuidade a técnica e aprender a avaliar as morfologias, onde os resultados se encontram na Tabela I e Tabela II.

Tabela I- Resultados da Análise Microscópica do Sêmen, Dom Pedrito, Rio Grande do Sul.

Concentração espermática	319 milhões de espermatozoides/ml
Integridade das membranas	85% Íntegros
Motilidade	70%
Motilidade progressiva	65%

Vigor	4%
Morfologia	51,5% defeitos totais- 8,5% defeitos maiores- 43% defeitos menores

Tabela II- Defeitos encontrados no Sêmen avaliado, Dom Pedrito, Rio Grande do Sul

DEFEITOS TOTAIS	DEFEITOS MAIORES	DEFEITOS MENORES
Cabeça isolada	Cabeça dupla	Cabeça Isolada
Cauda dobrada	Gota distal	Cauda dobrada
Peça intermediária	Gota proximal	Peça intermediária
Cabeça invertida		Cabeça invertida
Cabeça dupla		
Gota distal e Gota proximal		

Um ponto importante do nosso trabalho é que demonstra o quão importante é a higienização antes da coleta, lembrando que no presente trabalho não houve higienização dos órgãos genitais do garanhão, justamente para avaliar tudo o que fosse encontrado.

Após a coleta quando fomos filtrar o sêmen nos deparamos com um esmegma que nos machos se localiza especificamente no prepúcio.

Na presença do esmegma a égua pode não emprenhar e pode causar problemas graves a fêmea, como endometrite.



Figura1- Coleta de Sêmen

Foto: Nunez. V.Z.2017- Faculdade IDEAU- Bagé/Rs.



Figura2- Esmegma encontrado no Sêmen

Foto: Lucas, G.H.2017- Faculdade IDEAU-Bagé/Rs

Segundo DE SOUZA et al., (2011), o comportamento sexual é uma interação sócio-sexual influenciada por fatores genéticos, ambientais, nutricionais, hormonais, idade, experiência prévia do indivíduo e ordem de dominância social. No trabalho de DE SOUZA et al. (2011), foram utilizados 15 garanhões da raça Crioula. No presente trabalho foi avaliado em período fora da temporada de monta.

A média em segundos para tempo de reação foi de 17 a 72 segundos, outros variaram de 14 a 48 segundos, o tempo para a monta variou de 23 a 55 segundos e em alguns casos de 15 a 99 segundos. Lembrando que no presente trabalho o tempo de reação foi de 25 segundos, o que se encaixa com alguns cavalos utilizados no trabalho de DE SOUZA et al., (2011).

Para o tempo de ejaculação foram avaliados entre 18 a 11 segundos e 17 a 31, já no presente trabalho o tempo de ejaculação se estendeu para 55 segundos. Os cavalos avaliados por DE SOUZA et al.; (2011), também apresentaram vocalização 70% sim e 30% não, 20% dos cavalos analisados apresentaram reflexo de flhemen e 80% não. Dos animais avaliados 34% não morderam o manequim. Já no presente trabalho não houve vocalização e não apresentou reflexo de flhemen, entretanto mordeu a égua.

Estímulos visuais, táteis e circunstanciais são importantes no acasalamento e foram evidenciados com frequência, concordando com os achados de Richardson e Wenkoff (1976) e Mc Donnell (1986).

Já no trabalho de VAN DER LINDEN (2012), avaliaram-se seis garanhões da raça Crioula, comprovadamente férteis e também no período fora de temporada de monta pertencentes a criatórios de Dom Pedrito /RS e Lavras do Sul/RS. As coletas de sêmen foram feitas no local onde estavam localizados os animais, o sêmen foi coletado com uma vagina artificial modelo Hannover (GOTZE, 1949), o que se diferencia do presente trabalho que a vagina artificial utilizada foi a Botucatu, como manequim foi utilizado uma égua em cio, foram utilizados seis ejaculados de seis garanhões lembrando que no presente trabalho foi utilizado somente um ejaculado. No trabalho de VAN DER LINDEN (2012) o sêmen foi avaliado macroscopicamente quanto ao volume, aspecto e coloração. Após efetuou-se a separação da fração gel e o sêmen filtrado através da gaze estéril, a motilidade progressiva e total foi avaliada, a concentração espermática também foi feita do mesmo modo que o presente trabalho, através da câmera de Neubauer.

No trabalho de VAN DER LINDEN (2012), a motilidade total variou de 65% a 85,5%, já a motilidade total do presente trabalho foi de 70%, a concentração espermática /ml variou

de $72,6$ a 274×10^6 , no presente trabalho a concentração foi maior do que a encontrada por VAN DER LINDEN (2012), o número total de espermatozoides no ejaculado apresentou uma variação de $5,66$ a $17,13 \times 10^9$.

No trabalho de NARDINO et al., foram utilizados 14 garanhões comprovadamente férteis e no período fora de temporada de monta, pertencentes a criatórios dos municípios de Dom Pedrito e Santana do Livramento. As coletas de sêmen se realizaram na propriedade de origem dos garanhões, sendo as amostras processadas na Central de Congelamento de Sêmen Bovino PROGEN, no município de Dom Pedrito. Mas além de avaliar o sêmen também avaliaram as medidas testiculares dos garanhões (comprimento, largura e altura do testículo direito e esquerdo), para as coletas se utilizou uma vagina artificial modelo Hannover, e como manequim uma égua em cio. O sêmen foi avaliado macroscopicamente quanto à volume, aspecto e coloração. A seguir, foi avaliada a motilidade progressiva e total, a concentração espermática foi avaliada através de contagem em câmara de Neubauer, como no presente trabalho foram abordados os mesmos aspectos.

A motilidade progressiva média do sêmen fresco foi de $53,21 \pm 23,66\%$. Na análise da morfologia espermática foram encontrados $67,88 \pm 10,53$ espermatozoides normais, sendo o defeito mais encontrado o de cauda enrolada ou dobrada, o que teve o mesmo resultado no presente trabalho.

Então após fazer a discussão com os demais artigos, pode-se observar que no presente trabalho os parâmetros seminais encontrados para a raça Crioula encontram-se dentro dos considerados normais.

3 CONCLUSÃO

O presente projeto beneficiou os envolvidos com um vasto aprendizado sobre coleta de sêmen, análise microscópica e macroscópica de sêmen, mostrou aos envolvidos o quão importante é a higienização do animal antes da coleta e os problemas que pode ocasionar um descuido. Também aprendemos sobre a colheita de espermatozoides epididimais que pode ser a última chance para assegurar a preservação do material genético após lesão ou morte do reprodutor. E ao finalizar o trabalho concluímos que o sêmen avaliado era de grande valor, um sêmen desejável para inseminação artificial. Os resultados que foram encontrados na análise se encaixam nos parâmetros desejáveis e estudados para a raça Crioula.

REFERÊNCIAS

ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTER, C.; PARSLEY M. **Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen.**

Theriogenology, v.50, p.535-546, 1998.

ALVARENGA, M.A; PEPA, F.O. **Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. In: Anais- Congresso Brasileiro de Reprodução Animal.** Belo Horizonte - MG, 2009

AMANN, R.P; Functional anatomy of the adult male. In McKinnon AO, Voss JL (eds): **Equine Reproduction**, p 645. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

DE SOUZA, et al. **Aspectos Comportamentais De Equinos da Raça Crioula Estabulados Fora Da Estação Reprodutiva, Submetidos a Coleta De Sêmen.** Rio Grande do Sul: CAD, 2011. . Disponível em:
<<http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/3218>>. Acesso em: 03 Set. 2017

MCGAVIN, M.D; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária.** 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier p 1463, 2009.

MCKINNON, et al. **Equine Reproduction.** 2 ed. Philadelphia , p 3310, 2011.

MONTEIRO GA. **Criopreservação e fertilidade de espermatozóides recuperados da cauda do epididimo [dissertação].** Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010.

NARDINO T.A.C. **Características Sêminalis De Garanhões Da Raça Crioula Na Região Do Bioma Pampa.** Congrega Urcamp, 2011.

GARDES TP, Cardoso RNR, Arruda RP, Nascimento J, Silva DF, Gallego AM, Andrade AFC. **Comparação da eficiência de meios para a capacitação dos espermatozóides através das análises por citometria de fluxo e computadorizada da motilidade. In: Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação do Departamento de Reprodução Animal, 3, 2010, Pirassununga-SP. Anais...** Pirassununga, SP: USP/FMVZ, 2010.

PAPA, O. et al. **Manual de Andrologia e Manipulação de Sêmen Equino.** Botucatu. Sp: Fmvz-unesp, 2011. 46 p, 2011.

SISSON, S. Aparelho urogenital do equino. **Anatomia dos animais domésticos.** Editora Guanabara, Rio de Janeiro. 5ed, cap 20, p 491-514, 1996.



INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO
EDUCACIONAL DE BAGÉ
FACULDADES IDEAU



VAN DER LINDEN. Criopreservação do Sêmen Equino: Comparação Da Gema De Ovo De Ema Com Gema De Ovo De Galinha. Porto Alegre,p 41-44,2012.

VAN DER HOLST, W. De huidige en de toekomstige ontwikkeling van de K.I. bij paarden in Nederland. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v.53, p302-307, 1984b.

VAN DER HOLST, W. Stallion semen production in A.I. programs in the Netherlands. In: COUROT, M. (ed.) **The male in farm animal reproduction**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1984a. p195-201.