



Repetibilidade das características seminais, espermáticas e fertilidade de garanhões

Miguel Alejandro Silva Rua¹, Celia Raquel Quirino¹, Aylton Bartholazzi Junior¹, Paula Nascimento Santoro¹,
Mariana da Silva Ribeiro¹, Wilder Hernando Ortiz Vega¹, Marcus Antônio Pessanha Barreto¹

¹ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil. E-mail: miguelvet-rua@hotmail.com; crqster@gmail.com; bartjruef@gmail.com; pnascstuentf@gmail.com; msrmegueng@gmail.com; whovcol@hotmail.com; marcusgalop@gmail.com

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade e estimar a repetibilidade das características físicas e morfológicas do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador assim como a fertilidade dos animais durante e fora da estação reprodutiva na região norte do estado do Rio de Janeiro. Foi coletado o sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, jovens (≤ 4 anos) e adultos (≥ 5 anos). Foi avaliado o pH, volume seminal, motilidade, vigor, concentração espermática, número total de espermatozoides (NTSTZ), defeitos espermáticos e fertilidade. Não foram verificadas variações entre a categoria de idade e estação reprodutiva na maioria das características físicas do sêmen dos garanhões. No entanto, houve variação da quantidade de defeitos espermáticos entre estações, em que durante a estação reprodutiva foi observado mais defeitos espermáticos em comparação com o período fora da estação reprodutiva. Em relação à fertilidade foi observado 60% de recuperação embrionária e após a transferência de embrião, foi observado 57,8% de prenhes. Conclui-se que os sêmens desses garanhões poderão ser coletados e utilizados sem grandes alterações na sua qualidade, durante e fora da estação reprodutiva, proporcionando a otimização da utilização do material genético de animais geneticamente superiores.

Palavras-chave: equinos, andrologia, qualidade seminal

Repeatability of the seminal and spermatozoa traits and fertility evaluation of stallions

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate seminal and spermatozoa quality of stallions from North of Rio de Janeiro State in the breeding season and non-breeding season. Semen was collected from Mangalarga Marchador stallions, young (≤ 4 years) and adults (≥ 5 years). It was evaluated the pH, seminal volume, motility, vigor, concentration, the total number of spermatozoa, spermatozoa defects, and fertility. There was no variation between age category and breeding seasons in most of the traits. Although, there was a variation on spermatozoa defects between seasons, in that during breeding season we could observe more defects. Regarding the fertility, it was observed 60% of embryo recovery and 57.8% of pregnancy after embryo transfer. Concluding that one can collect and used the semen of these stallions for insemination in both breeding season without changing the quality, optimize the using of the genetic of the stallions.

Key words: horses, andrology, seminal quality

Introdução

A aplicação de biotécnicas reprodutivas utilizando o sêmen tem possibilitado maior aproveitamento de animais que possuem bom potencial zootécnico. Segundo Fernandes & Pimentel. (2002) o reprodutor deve apresentar eficiente potencial de fertilidade tanto “in vitro” quanto “in vivo”, no entanto a qualidade do sêmen pode variar entre indivíduos diferentes, com a idade dos animais e manejo reprodutivo. Por isso, para avaliar o potencial de fertilidade dos reprodutores é fundamental a análise das características seminais e espermáticas.

Diariamente, há uma intensa produção de espermatozoides e essa quantidade pode variar entre animais e entre coletas do mesmo animal, assim como pelo tamanho do parênquima testicular, da estação do ano, processo patológico, ou condição ambiental (Heninger et al., 2004; Robalo Silva et al., 2007). Assim como a qualidade seminal pode sofrer alterações de acordo com a frequência de coleta do mesmo garanhão (Sieme et al., 2004).

Os cavalos apresentam reprodução estacional, com capacidade reprodutiva máxima nos dias longos, que corresponde ao verão (Clay & Clay, 1992). A atividade reprodutiva durante o ano é regulada e sincronizada através do estímulo ambiental chamado fotoperíodo e estes estímulos são transmitidos pelo sistema neuroendócrino em sinais hormonais que regulam a atividade gonadal (Gorman & Zucker, 1995).

Em vista dos diversos eventos ambientais que podem influenciar na qualidade seminal do garanhão, o objetivo desse estudo foi avaliar a qualidade e estimar a repetibilidade das características físicas e morfológicas do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador assim como a fertilidade dos animais durante e fora da estação reprodutiva na região norte do estado do Rio de Janeiro.

Material e Métodos

Este trabalho foi realizado com aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA-UENF) conforme protocolo número 245 de 11 de março de 2014, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação com Animais adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), bem como com a lei federal 11794.

Foram utilizados 15 garanhões da raça Mangalarga Marchador, de propriedades situados no norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Latitude - 21° 45'15”, longitude -41° 19'28”, atitude 13 m). Os garanhões tinham idades entre 2,5 a 18 anos e foram divididos em categoria de idade (CI) com animais jovens (< 4 anos da idade) e adultos (> 5 anos de idade).

Os animais, durante o período em que decorreu o estudo, foram mantidos em baias individuais e receberam ração comercial peletizada Equitec® com 12% de proteína bruta, 15% fibras e 20 g kg⁻¹ de gordura, capim picado e feno duas vezes ao dia. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*.

Todos os animais mantiveram boa condição corporal durante o estudo, que foi realizado durante a estação reprodutiva (ER1) e fora da estação reprodutiva (ER2). Na região norte do estado do Rio de Janeiro, a estação reprodutiva ocorre nos meses de setembro até abril e o período fora da estação reprodutiva ocorre de maio até agosto. Antes do período experimental, os garanhões foram submetidos a exame andrológico. Os animais foram submetidos a 5 coletas de sêmen em dias consecutivos, prévios ao início do estudo, para esgotar as reservas epididimárias. Para a coleta de sêmen, foi utilizada uma égua em estro natural como manequim para estimular o garanhão a realizar a monta. Foi utilizada uma vagina artificial da marca Botupharma®.

Para as análises do experimento, ao todo, foram realizadas oito coletas de sêmen de cada animal, com intervalo de 30 dias.

Foram avaliadas as seguintes características: Vigor (escore de 1 a 4), avaliado com uso de um microscópio óptico; volume (mL) medido em tubo graduado e o pH seminal, com fita medidora de pH. Para análise de concentração espermática (Conc), o sêmen foi diluído na proporção de 1:200 em solução de formol citrato para fazer a contagens de células espermáticas em câmara de Neubauer, e para se obter o resultado do número total de espermatozoides (NTSTZ), multiplicou-se a concentração espermática pelo volume espermático (de cada animal separadamente).

A análise computadorizada do sêmen foi realizada no CASA system o software Hamilton Thorn Research (HTM-CEROS®) para avaliações de motilidade.

A avaliação da morfologia espermática foi realizada utilizando amostras mantidas em formol citrato preparadas através de câmara úmida e coradas com o corante rosa bengala. Os defeitos espermáticos foram classificados de acordo com Blom (1973) em defeitos maiores (Dma), defeitos menores (Dme) e defeitos totais (DT).

Para avaliação da fertilidade dos garanhões, foram feitas 336 observações de recuperação embrionária e taxa de prenhez. Foram utilizadas 35 éguas doadoras de embriões durante a estação reprodutiva e fora da estação reprodutiva. As éguas foram inseminadas com sêmen fresco dos garanhões do presente estudo e as lavagens uterinas para recuperação embrionária foram realizadas oito dias após a ovulação. As inovulações foram feitas após as recuperações embrionárias no mesmo dia. Todas as éguas utilizadas no experimento tinham de 10 a 24 anos de idade. Cada égua foi inseminada por cada garanhão durante o experimento de acordo com critérios de acasalamento pré-estabelecidos. As éguas receptoras foram examinadas antes do experimento e não foi observada nenhuma anormalidade clínica nem ginecológica antes do experimento.

Foi feita a análise de variância das características físicas, morfológicas (PROC MIXED, SAS). O modelo utilizado foi $Y_{ij} = \mu + Id_i + ER_j + E_{ij}$; em que: Y_{ij} = variável dependente; μ = média geral, associada à variável dependente; Id_i = efeito da i ésima idade; ER_j = efeito da j ésima estação reprodutiva; e_{ij} = resíduo aleatório associado a cada observação. As médias foram comparadas pelo teste “SNK” em 5% de probabilidade.

Para obter as correlações simples, foi usado o procedimento CORR do programa estatístico SAS (2009) e a repetibilidade

foi calculada a partir das estimativas das variâncias pelo método REML do procedimento VARCOMP (SAS, 2009).

Resultados e Discussão

A média geral para pH observada no presente estudo foi de $7,2 \pm 0,3$, apresentando-se próxima ao valor de 7,35 observado por Ribas (2006) e de 7,7 relatado por Veronesi et al. (2010).

Os valores de pH para equinos, segundo Henry & Neves (2013) variam de 6,8 a 7,6. Esta variável está diretamente relacionada com a quantidade de constituintes inorgânicos presentes no plasma seminal, os quais apresentam relações diretas com a osmolaridade presente nos componentes do sêmen, como solução ativadora, influenciando a motilidade espermática (Rurangwa et al., 2004; Alvi & Cosson, 2005), tornando-se uma avaliação importante na rotina de exame andrológico de garanhões, visto que a motilidade, na prática da reprodução equina, seria a característica mais corriqueira e relevante de se avaliar e de se levar em consideração para classificar a fertilidade de uma dose de sêmen.

Segundo Franco Junior et al. (1997), o pH é determinado pelas secreções tanto da próstata (ácida) quando pela secreção das vesículas seminais (básica). O mesmo autor relatou que pH abaixo do normal para equinos, sugere agenesia ou oclusão das vesículas seminais, e pH acima da média normal para cada espécie sugere a presença de infecção. Sendo assim, o estudo da variação do pH é de extrema importância para diagnosticar patologias ligadas à próstata e às vesículas seminais.

Segundo Mann (1964) e Salisbury & Vandermark (1964), o pH do sêmen é um dos fatores que mais afetam a motilidade, o metabolismo e a viabilidade dos espermatozoides. Salisbury & Vandermark (1964) e Chevalier (1980) relataram que o pH ácido inibe o metabolismo, enquanto o alcalino estimula o metabolismo dos espermatozoides. Em geral, as amostras de sêmen tendem à neutralidade, apesar dos espermatozoides de mamíferos apresentarem grande resistência às variáveis de pH. Os mesmos autores observaram que a excessiva alcalinidade inicial do sêmen pode estar associada à baixa fertilidade do reprodutor, podendo estar relacionado com a baixa concentração espermática ou quando há presença de infecção bacteriana no ejaculado.

Na comparação do pH entre animais jovens e adultos do presente estudo, as médias não diferiram. Considerando que o pH seminal se altera em relação a algum processo patológico, seja na próstata ou bacteriana (Fair & Cordonier, 1978; Franco Junior et al., 1997), a idade não seria um fator que estaria influenciando nessa característica. Além do mais, as médias de pH dos animais do presente estudo apresentaram-se dentro da normalidade de acordo com a literatura.

A média geral de volume seminal de cavalos da raça Mangalarga Marchador, foi de $44,4 \pm 27,9$ mL, resultado próximo à média de 44,2 mL relatada por Ribas (2006), e pouco menor que as médias relatadas por Veronesi et al. (2010) (65 mL). Esta diferença nos resultados pode ter ocorrido devido à diferença entre raças avaliadas, assim como diferenças climáticas aos quais os garanhões foram submetidos em cada estudo, assim também pelo fato de sempre poder haver

diferenças no volume espermáticos entre um animal e outro e até o mesmo animal pode expressar diferentemente essa característica em coletas diferentes (McKinnon et al., 2011).

Em relação à idade dos animais, o volume espermático apresentou-se menor em animais jovens em relação aos adultos. Concordando com os resultados encontrados por Ribas (2006).

As médias de volume seminal não foram diferentes entre as estações reprodutiva 1 e 2, salientando que as estações reprodutivas correspondem aos períodos de chuva (primavera, verão) e seca (outono, inverno) respectivamente. Nos resultados observados por Ribas (2006) o volume seminal não variou entre a estação seca e chuvosa. No entanto, Freitas (2010), observou aumento progressivo no volume seminal entre o outono e o verão (30,2 a 73,1 mL respectivamente). Verifica-se que essa característica é variável entre os estudos, havendo também registros de maiores volumes na primavera e menores no inverno como nos resultados observados por Robalo Silva et al. (2007).

Pode-se explicar essas diferenças nas médias de volume seminal em função também das diferentes raças estudadas, frequência na coleta de sêmen, estímulo do garanhão à presença da égua em estro (Robalo Silva et al., 2007), pelo clima e em diferentes idades (Ribas, 2006).

A média geral da concentração espermática observada no presente trabalho foi de $456,4 \pm 489,6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, superior à média de $311,8 \times 10^6$ observada por Freitas (2010); de $207,7 \times 10^6$ por Ribas (2006) e de $243,3 \times 10^6$ apresentada por Veronesi et al. (2010).

Em relação à idade dos garanhões, a concentração espermática em animais jovens apresentou maior variabilidade, com grandes variações entre diferentes coletas do mesmo animal e entre os garanhões jovens. Mesmo não havendo diferença nas médias entre jovens e adultos, pode-se perceber um alto coeficiente de variação em ambas categorias, sendo essa uma das categorias seminais que mais sofrem variações.

As médias de concentração espermática foram diferentes entre as ER1 e 2, sendo inferior na ER2. Robalo Silva et al. (2007) e Wrench et al. (2010), não observaram diferenças na concentração espermática entre ejaculados nas diferentes estações reprodutivas. Porém, Freitas (2010) observou em cavalos da raça Mangalarga Marchador, maior média de concentração espermática no outono.

Segundo Sieme et al. (2004), um fato importante que pode ser explicado pela divergência nos resultados é que a concentração espermática pode variar dependendo do intervalo entre coletas. Podendo sugerir que esse é um dos fatores mais determinantes para as diferenças observadas entre estudos.

A média geral do número total de espermatozoides foi de $17,9 \pm 25,3 \times 10^9$ apresentando-se próxima aos valores de NTSTZ observados por Freitas (2010) em cavalos da raça Mangalarga Marchador.

Em relação à idade dos garanhões, o NTSTZ foi menor em animais jovens em comparação com os garanhões adultos. Johnson & Neaves (1981) observaram o aumento do número de espermatozoides produzidos diariamente em garanhões à medida que aumenta a idade dos animais. Esses autores também relataram que à medida que aumenta a idade dos

garanhões, aumentam o número de células de Leyding e as proporções de parênquima testicular e túbulo seminíferos em consequência do aumento de seu diâmetro e comprimento. Sendo esses componentes os principais responsáveis pela produção espermática, sugerindo assim, que o aumento dos mesmos com a idade proporciona aumento na produção de espermatozoides.

As médias de NTSTZ não variaram entre estação reprodutiva (Tabela 1), o que também pode ser observado por Freitas (2010).

Segundo Leme (2003), o aumento no número total de espermatozoides durante a estação reprodutiva no hemisfério norte pode ser explicado pelo aumento da luminosidade, o que gera sinais na glândula pineal dos animais com reprodução sazonal de que está na época da reprodução. Contudo, em grande parte do território brasileiro, essas diferenças sazonais e o fotoperíodo não são tão expressivos como na América do Norte e Europa. Sendo assim, pode-se sugerir que não foram encontradas diferenças no NTSTZ no presente trabalho devido ao fato do estudo ter sido conduzido em uma região onde as diferenças sazonais e de fotoperíodo não são tão expressivas.

As médias das variáveis motilidade total, motilidade progressiva e vigor do sêmen dos garanhões da raça Mangalarga Marchador, não foram diferentes entre animais jovens e adultos nem entre estação reprodutiva (Tabela 2), não sendo verificado efeito de idade e de ER nessas características ($p > 0,05$).

Para a motilidade total, foi encontrada média geral de $73,8 \pm 14,7\%$, apresentando-se dentro dos padrões recomendados por Henry & Neves (2013). Os valores de médias encontrados para motilidade nesse trabalho são bem próximos às médias relatadas por Freitas (2010) e Veronesi et al. (2010).

Segundo Janett et al. (2003), Robalo Silva et al. (2007) e Freitas (2010) as médias de motilidade também não foram diferentes durante as estações do ano. Possíveis diferenças observadas na motilidade espermática poderiam ocorrer pelo

Tabela 1. Médias das características seminais: pH, volume, concentração espermática, número total de espermatozoides (NTSTZ) de cavalos da raça Mangalarga Marchador em relação à categoria de idade (CI) e estação reprodutiva (ER)

Efeito	pH	Volume (mL)	Concentração ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)	NTSTZ ($\times 10^9$)
CI				
Jovem	7,2 \pm 0,4a	29,0 \pm 13,6b	586,2 \pm 750,8a	13,3 \pm 11,5a
Adulto	7,2 \pm 0,3a	56,8 \pm 36,9a	352,5 \pm 323,0a	21,6 \pm 37,2a
ER				
1	7,1 \pm 0,2b	42,7 \pm 32,6a	507,1 \pm 615,9a	20,1 \pm 32,2a
2	7,6 \pm 0,5a	50,0 \pm 30,5a	278,7 \pm 224,9a	10,2 \pm 7,0a

Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$).

Tabela 3. Médias das variáveis de cinemática espermática: velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos (BCF), retidão (STR) e linearidade (LIN), obtidas de garanhões da raça Mangalarga Marchador em relação à categoria de idade (CI) e estação reprodutiva (ER)

Efeito	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
CI							
Jovem	75,7 \pm 28,1a	61,6 \pm 24,2a	129,3 \pm 43,0b	5,7 \pm 0,8b	32,8 \pm 5,1a	82,2 \pm 5,2a	49,5 \pm 6,5a
Adulto	91,4 \pm 21,3a	71,2 \pm 16,0a	162,5 \pm 37,2a	6,7 \pm 1,2a	30,9 \pm 4,7a	77,8 \pm 4,8b	45,4 \pm 3,9b
ER							
1	87,3 \pm 24,2a	69,5 \pm 19,8a	151,1 \pm 40,8a	6,2 \pm 1,2a	32,6 \pm 4,7b	80,0 \pm 5,4ab	47,8a \pm 5,7a
2	74,6 \pm 28,0a	57,4 \pm 19,9a	137,1 \pm 50,7a	6,7 \pm 0,9a	28,2 \pm 4,2a	78,6 \pm 5,4a	44,4a \pm 3,6a

Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$).

manejo dos animais, frequência de coletas de sêmen (Sieme et al., 2004) e condições ambientais, como pela temperatura e umidade (Rua et al., 2013).

Segundo Matos et al. (2008), é importante realizar a análise computadorizada, devido ao fato da motilidade ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides, sendo proposta e aplicada com objetivo de minimizar os efeitos da avaliação convencional do sêmen por ser uma análise objetiva. Para estes autores, as variáveis de motilidade obtidas com a análise computadorizada, apresentam alta correlação com a fertilidade, sugerindo que, pode-se prever a taxa de fertilização, o que também foi relatado por Ferreira et al. (1997) que verificaram que os garanhões que apresentavam maiores motilidade espermática apresentavam melhores índices de fertilidade.

As médias das variáveis de cinética espermática VAP, VSL não foram diferentes entre as categorias de idade e entre estação reprodutiva (Tabela 3). Foi observada diferença na variável ALH nos animais adultos, no entanto não foi suficiente para afetar as características de velocidade e motilidade, apesar de que, segundo Arruda et al. (2003), se o valor de ALH for elevado, torna-se indesejável por afetar a progressão celular e consequentemente uma menor qualidade da amostra seminal.

As médias de cinética espermática encontradas no presente estudo (Tabela 3) apresentam-se próximas às médias observadas por Silva (2010) e Stuhmann et al. (2012) que também analisaram o sêmen de garanhões pelo método de análise computadorizada. Versteegen et al. (2002) utilizaram as variáveis cinéticas VCL e VAP para prever a capacidade de fertilização, visto que estas características sofrem aumento após a capacitação espermática.

As médias gerais encontradas para defeitos espermáticos do sêmen de cavalos da raça Mangalarga Marchador foram de $19,4 \pm 19,8$ para defeitos maiores (Dmai), $13,0 \pm 7,1$ para defeitos menores (Dmen) e $32,4 \pm 20,8$ para defeitos totais (DTT) (Tabela 4). Estes valores encontram-se dentro do padrão sugerido por Henry & Neves (2013), que consiste em até 30% de defeitos totais e até 20% de defeitos maiores.

Tabela 2. Médias das variáveis motilidade total (MotTT), motilidade progressiva (MotPr), vigor espermático em relação à categoria de idade (CI) e estação reprodutiva (ER), de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Efeito	MotTT	MotPr	Vigor
CI			
Jovem	70,2 \pm 25,3a	45,8 \pm 26,7a	3,9 \pm 0,8a
Adulto	77,8 \pm 17,4a	48,6 \pm 13,6a	4,2 \pm 0,8a
ER			
1	74,4 \pm 20,1a	47,9 \pm 19,4a	4,1 \pm 0,8a
2	77,2 \pm 25,9a	45,3 \pm 23,4a	4,0 \pm 0,9a

Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$).

Tabela 4. Médias e desvio padrão das características morfológicas espermáticas: defeitos maiores (Dmai), defeitos menores (Dmen) e defeitos totais (DTT), em relação à categoria de idade (CI) e estação reprodutiva (ER) de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Efeito	Dmai (%)	Dmen (%)	DTT (%)
CI			
Jovem	26,5 ± 26,1a	13,5 ± 9,2a	40,0 ± 26,5a
Adulto	13,6 ± 10,0a	12,5 ± 11,8a	26,2 ± 16,7a
ER			
1	19,6 ± 17,8a	15,1 ± 11,0a	34,8 ± 20,8a
2	18,5 ± 26,9a	5,4 ± 2,9b	23,9 ± 26,9b

Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$).

As médias de defeitos espermáticos entre garanhões jovens e adultos não apresentaram diferenças. Pode-se observar que o motivo de não ter havido diferenças entre as médias para CI, se deve ao fato dos altos desvios. No entanto, pode-se observar uma tendência dos adultos apresentarem menores valores em relação aos jovens para Dmai, Dmen e DTT (Tabela 4).

A média de defeitos totais na estação reprodutiva 1 apresentou-se pouco acima ($34,8 \pm 20,8\%$) do padrão desejável para seleção de equinos sugerido por Henry & Neves (1998) que consiste em até 30% de defeitos totais, mas para defeitos maiores a média ($19,6 \pm 17,8\%$) encontrou-se dentro do padrão sugerido como aceitável.

Freitas (2010) não observou variações de defeitos espermáticos ao longo do ano em cavalos da raça Mangalarga Marchador. Robalo Silva et al. (2007) e Janett et al. (2003) observaram maiores porcentagens de defeitos espermáticos no sêmen de garanhões no verão, comparado com outono e primavera. Ribas (2006) apresentando-se maiores na estação reprodutiva, que corresponde ao verão.

A menor presença de defeitos espermáticos na ER 2 (Tabela 4) pode estar relacionada à melhor qualidade da espermatogênese durante o mesmo período correspondente do ano, estimulada por melhores condições ambientais como clima mais ameno na época do ano referente a maio, junho, julho e agosto (McKinnon et al., 2011). Estes autores também concluíram que esta diminuição nas médias de defeitos espermáticos poderia estar relacionada à melhor qualidade da espermatogênese durante o inverno, estimulada por melhores condições ambientais, de manejo e de controle térmico do próprio testículo.

Segundo Johnson (1985), nos garanhões há uma modulação ou regulação da produção diária de espermatozoides que sofre variações durante as ER. No entanto, nos garanhões, a produção de espermatozoides continua no decorrer de todo o ano. O efeito sazonal na espermatogênese ocorre devida a degeneração celular durante a meiose e a modulação sazonal no número de espermatogônias do tipo A, que é duas vezes maior durante estação reprodutiva do que fora da estação reprodutiva, o que poderia sugerir a melhor qualidade dos espermatozoides em relação à morfologia na ER2 observada no presente estudo.

Nascimento & Santos (1997) observaram que quando a temperatura e a umidade relativa estão altas a termoregulação testicular fica prejudicada, o que interfere negativamente na espermatogênese, aumentando a quantidade de células degeneradas. Sendo assim, no presente trabalho, a ER 1 foi a

que apresentou maior média de defeitos espermáticos (verão) quando se verificou temperaturas muito elevadas.

Em geral, os valores de patologias espermáticas foram baixos (Tabela 5). Os defeitos espermáticos mais frequentes foram cauda fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada, que são defeitos que surgem após a ejaculação. Sugerindo que a causa de ter sido observada maior quantidade desse defeito seria pela manipulação e transporte do sêmen até o momento da realização da análise. Uma vez que mudanças de temperatura podem afetar a morfologia espermática, principalmente da cauda (McKinnon et al., 2011).

Os defeitos como gota citoplasmática foram baixos. Estes são defeitos que surgem durante o trajeto das células, traduzindo falhas na maturação espermática.

As características de qualidade do sêmen apresentaram repetibilidade (Tabela 6) variando de 0,15 para NTSTZ a 0,65 para volume espermático. As estimativas de repetibilidade foram moderadas para volume, motilidade total e vigor espermático.

A repetibilidade das características concentração espermática e NTSTZ apresentaram-se baixas, provavelmente por ser uma característica de grande variação, tanto entre animais e para o mesmo animal em coletas diferentes. Segundo Johnson & Neaves (1981) o NTSTZ varia de acordo com a idade dos garanhões. Leme (2003) relatou que o NTSTZ sofre variações de acordo com variações climáticas e de fotoperíodo. Com isso, sugere-se que a baixa repetibilidade dessa característica deve-se ao fato dela sofrer muita influência de fatores ambientais. Portanto, essa característica deve ser analisada diversas vezes para ter confiabilidade.

Pattie & Dowsett (1982) ao realizarem a estimativa de repetibilidade para características seminais de equinos,

Tabela 5. Médias \pm desvio padrão (X e DP) das patologias espermáticas observadas de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Tipos de patologias espermáticas	X e DP
Defeitos maiores	
Acrossoma	0,08 \pm 0,3
Gota protoplasmática proximal	1,9 \pm 2,5
Cabeça isolada patológica	0,1 \pm 0,4
Cabeça subdesenvolvida	0,9 \pm 1,6
Cauda enrolada na cabeça	0,2 \pm 0,7
Cabeça contorno anormal	2,9 \pm 5,1
Formas teratológicas	0,4 \pm 0,9
Pouch formation	0,1 \pm 0,4
Patologias da peça intermédia	5,8 \pm 6,6
Cauda fortemente dobrada e enrolada	23,4 \pm 34,3
Cauda dobrada com gota	2,3 \pm 3,0
Defeitos menores	
Cabeça gigante	0,1 \pm 0,3
Retroabaxial	0,1 \pm 0,4
Cabeça isolada	2,3 \pm 3,2
Cauda dobrada ou enrolada	21,6 \pm 19,3
Gota protoplasmática distal	1,1 \pm 1,9

Tabela 6. Componentes de variância e estimativa de repetibilidade (R) das características seminais (CS) de garanhões da raça Mangalarga Marchador

CS	$\sigma^2_{\text{ganhão}}$	σ^2_{e}	R
Vol	530,94	280,58	0,65
Mot	124,66	214,93	0,37
Vig	0,23	0,31	0,43
Concent	38926,1	149242,2	0,21
NTSTZ	76226328	42448340	0,15

observaram baixa repetibilidade ($< 0,3$) para pH, e repetibilidade moderada (0,3 a 0,6) estimada para volume espermático, motilidade, concentração e NTSTZ.

Como a repetibilidade mede o limite superior da herdabilidade, e representa a proporção da variância fenotípica de uma característica, explicada por diferenças permanentes ou não, entre indivíduos (Pereira, 2012), considera-se um parâmetro importante para seleção dos ganhanos com melhores características de fertilidade a entrarem em uma estação reprodutiva e conseqüentemente aumentar os sucessos nas taxas de prenhes em programas reprodutivos como de transferência de embriões.

A concentração espermática e NTSTZ apresentam baixa repetibilidade. Como estas características são consideradas de extrema importância na predição da qualidade reprodutiva de ganhanos, as mesmas devem ser avaliadas com frequência, sempre que o ganhão iniciar uma estação reprodutiva e até mesmo durante a estação, para se ter um melhor controle da qualidade espermática dos animais e caso necessário a realização de mudanças de manejo em busca de se obter melhores resultados, uma vez que os efeitos ambientais influenciam diretamente nas características espermáticas ou até mesmo na intervenção como uma pausa nas coberturas ou coleta de sêmen de ganhanos que venham a apresentar algum problema seminal e/ou espermático, assim como a realização de algum tratamento quanto pertinente.

As características como volume, motilidade e vigor apresentaram motilidade de moderada a alta, sendo necessária poucas avaliações durante a estação reprodutiva pois, um resultado de uma dessas variáveis é representativo para uma produção futura das mesmas. Apesar de serem de extrema importância na fertilidade dos ganhanos, desprende-se menos tempo na avaliação dessas características.

Foi observado 60% de taxa de recuperação embrionária e 57,8% de taxa de prenhez utilizando o sêmen dos ganhanos do presente estudo durante duas estações reprodutiva (BS and NBS). Esses resultados são similares aos reportados por Lopes et al. (2013) em um estudo realizado com equinos da raça Mangalarga Marchador onde foi verificado recuperação embrionária de 72,8% em 1140 lavados uterinos. Aurich et al. (2011) relataram uma taxa de recuperação embrionária de 64%. Uiliani et al. (2010) observaram taxas de recuperação embrionária de 62% em éguas jovens e de 51% em éguas idosas e taxa de prenhez de 75%. As taxas de recuperação embrionárias dependem muito da qualidade do sêmen a ser utilizado na inseminação artificial (IA), sendo assim as taxas obtidas no presente estudo estão dentro do aceitável segundo relatos na literatura para ganhanos saudáveis e com sêmen fresco. No entanto pode-se encontrar algumas diferenças em relação à taxa de prenhez que poderia estar ligado à qualidade da receptora. Todas as receptoras utilizadas no presente estudo não apresentavam sintomas aparentes de endometrite, como presença de líquido intra-uterino ou presença de neutrófilos na citologia uterina, no entanto existem outros fatores que possam influenciar na taxa de prenhes como anatomia uterina, qualidade do endométrio ou alguma falha na defesa do organismo da égua na limpeza uterina após cópula ou IA (Christoffersen et al., 2015).

Conclusões

Em geral as características espermáticas não sofrem alterações na qualidade devido aos efeitos sazonais, podendo o sêmen ser coletado apresentando boa fertilidade em ambas as estações sem que altere a qualidade.

Devido à baixa repetibilidade das características de concentração espermática e número total de espermatozoides, recomenda-se a sua avaliação periódica independente da estação reprodutiva.

Literatura Citada

- Alvi, S. M. H.; Cosson, J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*, v. 29, n.2, p. 101-110, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.11.021>>.
- Arruda, R. P.; Ball, B. A.; Gravance, C. G.; Liu, I. K. M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de ganhanos pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, supl., p. 226-227, 2003.
- Aurich, C. Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, v. 24, n. 3-4, p. 220-228, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.005>>.
- Blom, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of Bull spermogram. *Nordic Veterinary Medicine*, v. 25, n. 7, p. 383-391, 1973.
- Chevalier, F.C. Contribution a l'étude de l'insémination artificielle chez le cheval. Alfort: Ecole Nationale Veterinaire D'Alfort, 1980. 91p. Thèse Doctorat.
- Christoffersen, M.; Brandis, L.; Samuelsson, J.; Bojesen, A. M.; Troedsson, M. H. T.; Petersen, M. R. Diagnostic double-guarded low-volume uterine lavage in mares. *Theriogenology*, v. 83, n. 2, p. 222-227, 2015. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.008>>.
- Clay, C. M.; Clay, J. N. Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod, and the peri-pubertal period in stallions. In: Blanchard, T. L.; Varner, D. D.; Turner, A. S. (Eds.). *Stallion management, the veterinary clinics of North America, equine practice*. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 31-56.
- Fair, W. R.; Cordonnier, J. J. The pH of prostatic fluid: a reappraisal and therapeutic implications. *The Journal of Urology*, v. 120, n. 6, p. 695-698, 1978.
- Fernandes, C. E.; Pimentel, C. A. Características seminais e fertilidade em ganhanos. *Ciência Rural*, v. 32, n. 5, p. 829-834, 2002. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000500014>>.
- Ferreira, J. C. P.; Neves Neto, J. R.; Papa, F. O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de ganhanos com fertilidade comprovada. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 21, n. 3, p. 131-132, 1997.
- Franco Junior, J. G.; Baruffi, R. L. R.; Mauri, A. L.; Petersen, C. G. *Reprodução Assistida*. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 1997. 164p.

- Freitas, B. W. Parâmetros fisiológicos e seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador na região da Zona da Mata Mineira do decorrer das estações climáticas. Viçosa: UFV, 2010. 72p. Dissertação Mestrado. <<http://repositorio.ufv.br/handle/123456789/5047>>. 12 Mar. 2016.
- Gorman, M. R.; Zucker, I. Seasonal adaptation of Siberian hamster: II. Patterns of change in day length controls annual testicular and body weight rhythms. *Biology of Reproduction*, v. 53, n. 1, p. 116-125. 1995. <<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod53.1.116>>.
- Heninger, N. L.; Staub, C.; Blanchard, T. L.; Johnson, L.; Varner, D. D.; Forrest, D. W. Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. *Theriogenology*, v. 62, n. 1, p. 283-297, 2004. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.022>>.
- Henry, M.; Neves, J. P. Manual para exames andrológico e avaliação de sêmen. 3.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. 49p.
- Janett, F.; Thun, R.; Niederer, K.; Burger, D.; Hassig, M. Seasonal changes in sêmen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology*, v. 60, n. 3, p. 453-461, 2003. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00046-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00046-3)>.
- Johnson L. Increase daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. *Biology of Reproduction*, v. 32, n. 5, p. 1181-1190, 1985. <<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod32.5.1181>>.
- Johnson L.; Neaves, W. B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*, v. 24, n. 3, p. 703-712, 1981. <<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod24.3.703>>.
- Leme, D. P. Características reprodutivas de garanhões sob luz natural ou acrescida de luz artificial à noite nos meses de maior e menor luminosidade do ano na região de Botucatu, São Paulo. Botucatu: UNESP, 2003. 84p. Tese Doutorado.
- Lopes, E. de P.; Pinho, R. O.; Siqueira, J. B.; Rocha, A. N.; Pereira, J. V. T. do N.; Franco, L.; Guimarães, J. D. Correlação dos fatores que interferem na eficiência reprodutiva de éguas Mangalarga Marchador em programas de transferência de embriões. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 35, n. 1, p. 69-75, 2013. <http://www.rbmv.com.br/pdf_artigos/02-07-2013_11-35RBMV%20012.pdf>. 12 Mar. 2016.
- Mann, T. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. London: Methuen, 1964. 493p.
- Matos, D. L.; Araújo, A. A.; Roberto, I. G.; Toniolli, R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008. <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB176%20Matos%20p225.pdf>>. 03 Mar. 2016.
- McKinnon, A. O.; Edward, L.; Squires, E. L.; Wendy, E. V.; Dickson, V. D. (Eds.). *Equine reproduction*. 2.ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. 3288p.
- Nascimento, E. F.; Santos, R. L. Patologia da reprodução dos animais domésticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 108 p.
- Pattie, W. A.; Dowsett, K. F. The repeatability of seminal characteristics of stallions. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplements*, v. 32, p. 9-13, 1982.
- Pereira, J. C. C. Melhoramento genético aplicado à produção animal. 5.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2012. 758p.
- Ribas, J. A. S. Influência das estações cheia e seca nas características reprodutivas e seminais de garanhões da raça pantaneira. Campos de Goitacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006. 80p. Tese Doutorado.
- Silva, J. R.; Agrícola, R.; Barbosa, M.; Costa, L. L. da. Variação sazonal do volume testicular, da produção e qualidade do sêmen e do comportamento sexual de cavalos Lusitanos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 102, n. 561-562, p. 119-125, 2007. <http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf6_2007/119-125.pdf>. 12 Mar. 2016.
- Rua, M. A. S.; Quirino, C. R.; Bartholazzy Junior, A.; Veja, W. H. O.; Ribeiro, M. S.; Santoro, P. N.; Matos, L. F. Caracterização fisiológica e seminal de pôneis do Norte do Estado do Rio de Janeiro - Brasil. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. v. 3 p. 51-58, 2013. <http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2013/Trabajo008_AICA2013.pdf>. 28 Feb. 2016.
- Rurangwa, E.; Kime, D. E.; Ollevier, F.; Nash, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, v. 234, n. 1-4, p. 1-28. 2004. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>>.
- Salisbury, G. W.; Vandemark, N. L. Fisiologia de la reproducción e Inseminación Artificial de los bovidos. Zaragoza, Acribia. 1964. 707p.
- SAS Institute. SAS/STAT® 9.2 User's Guide. 2.ed. Cary, N.C.: SAS Institute, 2009.
- Sieme, H.; Katila, T.; Klug, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and fertility of stallions. *Theriogenology*, v. 61, n. 4, p. 769-784, 2004. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00251-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00251-6)>.
- Silva, C. M. B. Efeito da melatonina em espermatozoides de equino. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, 2010. 71p. Dissertação Mestrado. <<http://hdl.handle.net/10400.5/2193>>. 10 Mar. 2016.
- Stuhtmann, G.; Oldenhof, H.; Peters, P.; Klewitz, T.; Martinsson, G.; Sieme, H. Iodixanol density gradient centrifugation for selecting stallion sperm for cold storage and cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v. 133, n. 3-4, p. 184-190, 2012. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.017>>.
- Uliani, R. C.; Ramires Neto, C.; Dell'Aqua, J. A.; Pessoa, M. A.; Camargo, A. L.; Alvarenga, R.; Alverenga, M. A. Effect of mare breed and age on embryo transfer efficiency. *Animal Reproduction Science*, v. 121, n. 1-2, p. 303-304, 2010. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.140>>.
- Veronesi, M. C.; Tosi, U.; Vilani, M.; Govoni, N.; Faustini, M.; Kindahl, H.; Madej, A.; Carluccio, A. Oxytocin, vasopressin, prostaglandin F_{2α}, luteinizing hormone, testosterone, estrone sulfate and cortisol plasma concentrations after sexual stimulation in stallions. *Theriogenology*, v. 73, n. 4, p. 460-467, 2010. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.028>>.

- Verstegen, J.; Iguer-Ouda, M.; Onclin, K. Computer assisted semen analyzer in andrology research nad veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1)>.
- Wrench, N.; Pinto, C. R. F.; Klinefelter, G. R.; Dix, D. J.; Flowers, W. L.; Farin, C. E. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Animal Reproduction Science*, v. 119, n. 3, p. 219-227, 2010. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.02.007>>.