



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CAMPUS II – AREIA – PB**

IARA NÓBREGA MACÊDO

**AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E ULTRASSONOGRAFIA
DOPPLER EM GARANHÕES QUARTO DE MILHA**

AREIA

2017

IARA NÓBREGA MACÊDO

**AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E ULTRASSONOGRAFIA
DOPPLER EM GARANHÕES QUARTO DE MILHA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (T.C.C.)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Isabella de Oliveira Barros

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Sildivane Valcácia Silva

Colaborador: Allan Gledson Ferreira dos Santos

AREIA

2017

Dedico este trabalho à minha tão amada avó, Maria do Carmo Nóbrega de Pontes, (in memoriam). Das memórias que guardo comigo, o exemplo de amor, fé, honestidade e esmerado cuidado com tudo o que fazia, são aprendizados enraizados em mim. Dedico a ela, não só este trabalho, mas a minha vida e tudo que vier a conquistar, pois foi uma figura de grande importância em minha formação e de quem eu sinto muita saudade. Minha querida avó, obrigada por me permitir continuar essa história chamada vida, sustentando seus valores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao criador dessa jornada, Deus, que me concedeu o dom da vida e cuidou de todo o meu percurso para finalmente chegar até aqui. Por ter sido agraciada nas estradas ao longo do caminho com crescimento pessoal e profissional, e ainda, por ter tido a oportunidade de conhecer e conviver com todas as pessoas abaixo citadas.

À minha amada mãe, Maria do Socorro, por ter cuidado do meu sonho como se fosse seu, sendo fonte de inspiração, dedicação e garra. Ela que, com seu amor sem limites, seu abraço de mãe e seu trabalho árduo, me ensinou a ir em busca dos meus objetivos. Espero poder ter a clareza, a firmeza, a sanidade e a serenidade para transmitir para os meus filhos a infinidade de coisas boas que dela recebi.

Ao meu pai, José Macêdo, de quem herdei todo o meu amor pelos animais, sem ele, talvez eu não estivesse aqui. Dele tiro o exemplo da maior qualidade que alguém pode ter em sua vida: honestidade. Obrigada por ter me direcionado até aqui.

À minha querida irmã, Isis Larissa, por ser meu exemplo de inteligência e por ter me dado a oportunidade de ter uma irmã presente, que em alguns momentos foi até alvo de discussões, mas que hoje é uma saudade diária e a certeza de que para estar junto não é preciso estar perto.

Às minhas avós Maria do Carmo (in memoriam) e Rita Limeira meus maiores exemplos de fé e abnegação, a elas toda a minha gratidão.

Ao meu namorado, Gabriel Petelinkar, a quem devo todo o apoio e entusiasmo que me foram decisivos nesta caminhada. A ele, pela dedicação e orgulho que expressa por fazer parte desta história, o meu amor. Agradeço também aos meus sogros Luís Geraldo e Eudete, como também a minha cunhada Giovana, que abriram as portas para que eu pudesse fazer parte desta família.

Aos meus grandes e verdadeiros amigos de uma longa jornada, que compreenderam a minha ausência durante a graduação e por todo esse tempo, permaneceram ao meu lado: Alana Moura, Suelen Duarte, Renata Medeiros, Zuyla Guimarães, Thayuanne Ribeiro e tantos outros...

À minha amiga Maísa Alves, por todo companheirismo diário, compartilhando alegrias e tristezas. E a todos os outros que fizeram esta trajetória mais bonita, em especial: Alysso Gurjão, Diego Alcoforado, José de Jesus, Natanael Félix, Fábio Júnior, Cely Raquel, Lis Ramalho, Fernanda Agnes; Aquele que precisou partir Ricardo Pereira (in memoriam) por compartilhar comigo de uma paixão em comum, a área da reprodução animal... Enfim, a toda a turma 2012.2, meu muito obrigada!

Aos mestres da Universidade Federal da Paraíba e aos veterinários e colaboradores da Clínica de Grandes Animais (UFPB), por todo acolhimento e crescimento profissional adquirido, em especial a Karla Malta que me acolheu e acreditou no meu potencial desde o início.

À minha orientadora, Isabella Barros, que me acompanhou durante essa trajetória, me proporcionando grandes aprendizados e contribuindo de forma fundamental para a conclusão dessa etapa. Agradeço também a minha co-orientadora, Sildivane Valcácia, sem ela esse trabalho não poderia ter sido desenvolvido e ao meu amigo Allan Gledson, que me incentivou na elaboração do mesmo, e que foi fundamental na execução do experimento.

ENFIM, OBRIGADA!

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonhos e outras ainda porque nos desafiam a construí-los”.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que maioria não faz”.

Bill Gates

MACÊDO, Iara Nóbrega, Universidade Federal da Paraíba, julho de 2017. **AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER EM GANHÕES QUARTO DE MILHA.** Orientadora: Isabella de Oliveira Barros. Co-orientadora: Sildivane Valcácia Silva.

RESUMO

Os testículos dependem de uma adequada perfusão sanguínea, onde qualquer alteração pode acarretar problemas em sua função. Assim, o diagnóstico através da ultrassonografia Doppler pode evidenciar problemas reprodutivos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as correlações entre a hemodinâmica testicular e a qualidade espermática, enfatizando a motilidade espermática. Foram utilizados seis ganhões da raça quarto de milha, sadios, em diferentes condições reprodutivas, situados no estado da Paraíba. Na avaliação ultrassonográfica modo Doppler, foram calculados os índices de pulsatilidade (PI) e resistividade (RI) através do modo Doppler espectral ou pulsado. O fluxo sanguíneo do plexo pampiniforme foi avaliado através do modo Power Doppler e o parênquima testicular através do modo color Doppler. Os ejaculados foram avaliados quanto ao vigor, volume, concentração, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, além da motilidade. Os dados foram analisados com o software JMP® 10.0.0 (Demo) e Microsoft Excel 2016. Foram explicitados os valores médios e o coeficiente de variação e realizou-se uma análise de correlação de Spearman's. Os ganhões apresentaram média de 44,6 ml de volume, 100×10^6 células de concentração espermática. As médias de motilidade foram 69,17, vigor 4, integridade da membrana plasmática 41,83 e funcionalidade da mesma 63. Os testes de eosina-nigrosina e host, demonstraram que quanto menor forem as patologias, melhor a motilidade. Foram encontradas relações entre motilidade e PI, quanto menor a PI melhor a motilidade espermática. Já o RI não apresentou diferença em relação a motilidade. A associação do exame andrológico ao Doppler compreende um diagnóstico mais seguro quanto a fertilidade do ganhão.

Palavras-chave: espermatozoide; motilidade; fluxo sanguíneo testicular; equino; testículo.

MACÊDO, Iara Nóbrega, Universidade Federal da Paraíba, July, 2017. **ANDROLOGICAL EVALUATION AND ULTRASSONOGRAPHY DOPPLER IN QUARTER HORSE.** Adviser: Isabella de Oliveira Barros. Co-adviser: Sildivane Valcácia Silva.

ABSTRACT

The testicles depend on an adequate blood perfusion, where any alteration can cause problems in their function. Thus, the diagnosis through Doppler ultrasonography can show reproductive problems. The aim of this study was to evaluate the correlation between testicular hemodynamics and sperm quality, emphasizing sperm motility. Six stallions of a quarter of a mile, healthy, were used in different reproductive conditions, located in the state of Paraíba. In the ultrasound evaluation Doppler mode, the indexes of pulsatility (PI) and resistivity (RI) were calculated using spectral or pulsed Doppler mode. The blood flow of the pampiniform plexus was evaluated through the Power Doppler mode and the testicular parenchyma through color Doppler mode. The ejaculates were evaluated for vigor, volume, concentration, integrity, plasma membrane functionality and motility. Data were analyzed using JMP® 10.0.0 (Demo) and Microsoft Excel 2016 software. The mean values and coefficient of variation were plotted and a correlation analysis of spearman's was performed. The stallions presented an average of 44.6 ml of volume, 100×10^6 cells of sperm concentration. Motility averages were 69.17, vigor 4, plasma membrane integrity 41.83 and functionality of the same 63. The eosin-nigrosin and host tests demonstrated that the lower the pathologies, the better the motility. Relationships between motility and PI were found, the lower the PI the better the sperm motility. On the other hand, RI had no difference in relation to motility. The association of andrological examination with Doppler comprises a more reliable diagnosis of the fertility of the stallion.

Keywords: Spermatozoa; Motility; Blood flow; Equine; Testicle

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Aproximação entre garanhão e égua-manequim para exposição do pênis e posterior higienização do mesmo, no município de Campina Grande, no estado da Paraíba – Brazil	29
Figura 2 – Representação esquemática da orientação do testículo, epidídimo, funículo espermático, além de estruturas ultrassonográficas importantes	31
Figura 3 – Esquematização do exame ultrassonográfico em varredura vertical, plano transversal. Nessa orientação foram avaliados testículos e epidídimo	31
Figura 4 – Esquematização de como o transdutor convexo foi colocado para varredura horizontal das estruturas, plano longitudinal. Nessa orientação foi possível observar o cordão espermático e a artéria testicular.....	32
Figura 5 – Esquematização de como o transdutor linear foi colocado na superfície dorso-lateral do testículo para avaliação do corpo do epidídimo, plano longitudinal	32
Figura 6 – Esquematização de como o transdutor linear foi colocado para avaliação da cauda do epidídimo, plano sagital	32
Figura 7 – Esquematização de como o transdutor linear foi colocado no testículo, possibilitando a visualização dos ramos da artéria testicular, plano longitudinal	33
Figura 8 – Testículo em plano longitudinal. Vasos testiculares visibilizados na porção central do testículo, através do modo color doppler (A). Os sinais coloridos são da artéria testicular do cordão espermático (CE). Observou-se a pulsatilidade do CE. Um cursor para ângulo de insonação foi usado apenas na imagem (B)	33

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Valores individuais de cinética e concentração espermática de garanhões submetidos ao exame clínico-andrológico no estado da Paraíba	34
Tabela 2 - Valores individuais dos parâmetros de integridade e funcionalidade da membrana espermática de garanhões submetidos ao exame clínico-andrológico no estado da Paraíba	36
Tabela 3 – Mensuração do fluxo sanguíneo testicular encontrados através da avaliação ultrassonográfica modo Doppler em garanhões Submetidos ao exame clínico-andrológico no estado da Paraíba	37
Tabela 4 – Correlação entre parâmetros de motilidade espermática, características seminais e exame ultrassonográfico de garanhões submetidos ao exame clínico-andrológico no estado da Paraíba	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
CASA Analyses)	Análise Espermática Assistida por computador (Computer Assisted Sperm
CE	Cordão espermático
cm/s	centímetros por segundo
EO	Teste eosina-nigrosina
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador das gonadotrofinas
H₂O	Água
HHG	Hipotalâmico – hipofisário – gonadal
HOST	Teste hiposmótico
Kg	Quilograma
LH	Hormônio Luteinizante
M	Média
MHz	Megahertz
mL	mililitros
mOsm	Milésima parte do osmol
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Índice de pulsatilidade
RI	Índice de resistividade
TE	Testículo esquerdo
VDF	Velocidade de pico diastólico
VPS	Velocidade de pico sistólico
μL	Unidade por litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Importância Econômica	16
3.2	Fisiologia Reprodutiva do Macho	17
3.3	Anatomia Testicular	19
3.3.1	Anatomia vascular	19
3.4	Célula Espermática	19
3.5	Testes Laboratoriais para a Avaliação Espermática	20
3.5.1	Volume, coloração e concentração	21
3.5.2	Motilidade espermática	21
3.5.3	Teste de integridade de membrana plasmática (eosina/nigrosina)	22
3.5.4	Teste de funcionalidade de membrana plasmática (hiposmótico)	22
3.6	Ultrassonografia Doppler	22
3.6.1	Princípios físicos da ultrassonografia Doppler	23
3.6.2	Doppler testicular	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Área e Local de Realização do Experimento	27
4.2	Exame Clínico-Andrológico e Ultrassonografia Com Doppler	27
4.3	Análise Estatística	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33

6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A criação e comercialização de equinos exerce importante papel em relação ao mercado mundial do agronegócio. Segundo dados de 2016, cedidos pelo MAPA junto a ESALQ/USP e FAJ, a equideocultura é uma atividade que movimenta anualmente R\$ 16 bilhões de reais. Devido à importância do cavalo, na prática de diversos esportes e lazer, e não mais apenas no transporte ou tração animal, é incontestável o crescimento mundial da equideocultura (MARIZ, 2008).

Segundo Barbosa (2006), dentre os esportes destinados a utilização de cavalos, a raça Quarto de Milha é a de predileção quando se trata de vaquejada, um esporte genuinamente nordestino, sendo considerada a raça mais crescente no Brasil, assim pode-se observar a importância desses animais na região Nordeste, inclusive no estado da Paraíba.

Com o avanço da equideocultura, fica evidente a relevância da reprodução equina, pois é através dela que esse mercado se desenvolve, sendo responsável pelo melhoramento genético e pelo número de produtos durante o ano.

De acordo com Ginther (1992), a espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo. Nesse aspecto é válido ressaltar a relevância do garanhão na reprodução equina, sendo ele o responsável por produzir um grande número de produtos por ano através de um único ejaculado e fecundar várias éguas quando utilizadas modernas biotecnologias.

Ortega-Ferrusola et al. (2014) realizaram um estudo em que afirmam que o uso da ultrassonografia Doppler na reprodução equina é uma técnica indispensável, porém ainda com pouco uso no garanhão. Sabendo-se que a fertilidade do macho está ligada diretamente aos testículos, devido a ser o local de produção de testosterona e espermatozoides, identificar qualquer perturbação no fluxo sanguíneo testicular é crucial para o diagnóstico correto de alguns problemas de fertilidade e seu monitoramento de tratamento terapêutico.

Estudos recentes em garanhões revelaram que os índices Doppler espectral, RI e PI, podem ser utilizados na prática como indicadores clínicos de disfunção testicular em garanhões (POZOR et al., 2014).

O presente trabalho faz um estudo sobre a importância da qualidade espermática, analisando de maneira rápida as características seminais através de técnicas de rotina e da ultrassonografia Doppler, com o intuito de verificar a eficiência reprodutiva de garanhões da raça quarto de milha, situados no estado da Paraíba, reduzindo possíveis prejuízos financeiros futuros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar avaliação andrológica e ultrassonografia Doppler testicular em garanhões da raça Quarto de Milha no estado da Paraíba.

2.2 Objetivos Específicos

- Efetuar exame clínico-andrológico nos garanhões para avaliação da qualidade espermática;
- Realizar exame ultrassonográfico Doppler da região testicular do garanhão;
- Correlacionar características espermáticas com a hemodinâmica testicular, dando ênfase à motilidade espermática.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importância Econômica

A relação entre o homem e os equinos está entremeada na história da humanidade, pois estes animais sempre serviram ao homem de múltiplas maneiras, sejam elas como meio de transporte, força e tração, trabalho, companhia, lazer, serviço militar, ou atividades esportivas. Mesmo com o crescimento e evolução do homem e uma conseqüente diminuição das atividades, essa espécie continua fazendo parte da rotina de uma parte significativa da sociedade. (ESCODRO et al., 2010)

A atividade equestre se destaca na agropecuária nacional e movimenta cifras milionárias através da criação, nutrição, melhoramento genético, reprodução, esporte, emprego, transporte, publicidade, entre outros (ESCODRO et al., 2010).

De acordo com os dados do Censo Agropecuário realizado pelo IBGE em 2015, o Brasil possuía uma tropa de mais de 5,5 milhões de equinos no respectivo ano, ainda segundo a Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do IBGE, a Paraíba seria responsável por 52.683 cabeças desse total. Através desses dados pode-se ter uma dimensão do tamanho do complexo agronegócio do cavalo no Brasil e na Paraíba.

Segundo Faina Duarte (2011), a raça que mais tem crescido no Brasil é a Quarto de Milha, devido a vaquejada consistir na prática esportiva mais popular na região nordeste, provavelmente pela questão cultural, visto que esta modalidade é originalmente nordestina e surgiu a partir da lida com o gado. O plantel de equinos Quarto de Milha no Brasil contém mais de 358 mil animais registrados, com valor em torno de US\$ 785,5 milhões, que são divididos entre criadores, proprietários e associados. Os criadores são responsáveis por investir em torno de 25,2 milhões de dólares. Neste seguimento, existem animais considerados exemplares e estes, são responsáveis por mais de 80% do plantel de cavalos direcionados a esta prática (BARBOSA, 2006; BRITO FILHO, 2014).

Em virtude disso, pode-se imaginar que em uma determinada propriedade exista um garanhão com baixos índices de fertilidade, porém o proprietário não tem conhecimento disso, o animal então, aumentará os custos de manutenção com éguas que não irão produzir potros, onde muitas vezes a primeira suspeita do proprietário é de que o problema de fertilidade esteja relacionado as fêmeas, isso acaba por gerar custos que desestimulam o criador, influenciando negativamente no lucro de seu negócio, esses custos estão relacionados ao transporte, as coberturas desnecessárias, ao auxílio veterinário e inclusive a tratamentos que venham a ser receitados. É importante salientar

que a capacidade de um garanhão gerar potros auxilia na lucratividade de uma produção (BLANCHARD, 1997).

3.2 Anatomia Testicular

O sistema genital do garanhão é composto pelo pênis, prepúcio, uretra peniana, testículos (gônadas masculinas), e ainda escroto e epidídimo (SAMPER, 2000).

As gônadas masculinas ou testículos situam-se no escroto, uma estrutura semelhante a uma bolsa que se posiciona horizontalmente. Elas se desenvolvem no abdome (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O tamanho médio do testículo equino é de 10-12 cm de comprimento, 6 a 7 cm de altura e 5 cm de largura, pesando em torno de 200 a 300 g, o testículo esquerdo é maior que o direito e também menos retrátil. A consistência do testículo é dura e elástica durante a fase de maturidade e macia durante a puberdade e idade avançada (MARTÍNEZ, 2006). O testículo está fixado na parede do processo vaginal, ao longo da linha da sua junção com o epidídimo. (HAFEZ; HAFEZ, 2002). São envolvidos por uma cápsula resistente de tecido conjuntivo de 1 a 2 mm de espessura, denominada túnica albugínea, que é composta de fibras de colágeno, onde existem vasos testiculares maiores com trajetos específicos. (KONIG; LIEBICH, 2004).

A túnica vaginal visceral está justaposta à túnica albugínea em torno do testículo, epidídimo e funículo espermático. A próxima camada externa é a túnica vaginal parietal que é a continuação do peritônio parietal. Entre estas duas camadas vaginais existe uma pequena quantidade de líquido peritoneal (Turner, 1998).

Os plexos ducto testiculares, os túbulos e ductos eferentes se conectam e formam o epidídimo, o ducto deferente e a glândula vesicular. A gônada vai migrando caudalmente dentro do abdome até o anel inguinal profundo, incluindo-se totalmente dentro do escroto através da orientação do gubernáculo testis, o gubernáculo vai ser responsável pela conexão entre o epidídimo (ligamento próprio do testículo) e o testículo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O ducto deferente apresenta-se no início, levemente enovelado e, depois, em linha reta, ao longo da superfície medial do testículo, sendo um dos constituintes do funículo espermático até o anel inguinal (KONIG; LIEBICH, 2004)

O epidídimo é dividido em cabeça, corpo e cauda (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Na cabeça do epidídimo, firmemente fixada no testículo, unem-se os ductos eferentes com o canal do epidídimo (KONIG e LIEBICH, 2004). Na cauda do epidídimo podem ser

encontrados em torno de 75% dos espermatozoides devido aos fatores que contribuem para uma maior habilidade de fertilização. Já as glândulas acessórias têm o papel de atuar no transporte dos espermatozoides, através do veículo líquido, constituindo assim o sêmen. (HAFEZ; HAFEZ, 2004)

3.2.1 Anatomia Vascular

Existe uma série de características vasculares que são essenciais para controlar a eficácia da produção espermática e estão envolvidas no processo de termorregulação da temperatura testicular, sendo fundamental para controlar a eficácia da produção espermática, dentre elas, destaca-se a artéria testicular, com estrutura convoluta que apresenta forma de cone, ela encontra-se na porção dorsal ou cranial do testículo (MCKERNS, 1969). O funículo espermático consiste da artéria testicular e veias testiculares que formam o plexo pampiniforme (GETTY, 1986).

Ela é originada da aorta dorsal, chegando aos testículos e após, se ramificando até o epidídimo. (HAFEZ; HAFEZ, 2002; BUDRAS et al., 2007). A migração do testículo para a bolsa escrotal é responsável por caracterizar a artéria marginal, tornando-a com paredes mais finas e de diâmetro interno maior (BUDRAS et al., 2007). Os envoltórios do testículo são vascularizados pela artéria e veia pudenda externas (KONING, 2005).

No cordão espermático a artéria testicular sofre uma incontável quantidade de giros densamente agrupados, estes giros da artéria testicular estão envoltos em todos os ramos da veia testicular, ou plexo pampiniforme, que tem a função de diminuir a temperatura do sangue arterial em seu caminho até o testículo. A veia testicular junta-se a veia cava caudal (KONIG; LIEBICH 2004). Essa junção vai dar origem a uma veia central ou profunda e outra superficial, distantes da gônada (GHEZZI, 2004).

Com o uso do Doppler é possível um maior entendimento da perfusão sanguínea testicular (DOGRA et al., 2003).

3.3 Fisiologia Reprodutiva do Macho

A função reprodutiva do macho está relacionada com a produção de espermatozoides e sua deposição no interior da fêmea. Os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos e são então transportados através da rede testis para os epidídimos, onde passam por um período de amadurecimento e onde serão armazenados. Ocorre então um processo contínuo de produção de espermatozoides e para que isso aconteça, é necessário que o eixo hipotalâmico – hipofisário – gonadal

(HHG) esteja trabalhando em sincronismo com os hormônios, para que eles sejam liberados de maneira eficaz. O hipotálamo é uma região cerebral localizada no diencefalo, responsável pela liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que vai trabalhar estimulando a liberação de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), esses, irão atuar nas gônadas, e estimular a produção de esteroides (testosterona e estrógeno), que participam da formação dos espermatozoides, promovendo a gametogênese (REECE, 1996; HAFEZ, 2004 e ROCHA et al., 2011).

Os hormônios que estão envolvidos na reprodução do macho, irão atuar nas células dos testículos (Sertoli e Leydig) regularizando a espermatogênese e a esteroidogênese (BERTOL, 2009), onde são liberados através da retroalimentação positiva ou negativa com o intuito de que haja uma produção espermática eficaz através dos níveis de concentração que são mantidos relativamente constantes. Essa produção pode ser estimulada ou inibida, de maneira a se manter nas concentrações adequadas para a plena produção espermática (PAPA, 2011).

Como citado anteriormente, há nos testículos a presença das células de Leydig, onde o LH vai atuar estimulando a produção de hormônios esteroides: testosterona, diidrotestosterona e estrogênios, estes são responsáveis pelo controle da espermatogênese, das glândulas acessórias e da manutenção da libido. A testosterona também vai atuar no mecanismo de feedback que ocorre no hipotálamo e hipófise (ALVARENGA, 2011; BERTOL, 2009).

Há também a presença das células de Sertoli, que regulam a produção da proteína ligadora de andrógenos, estrogênio, fatores de crescimento, inibina e ativina, todos componentes importantes para a produção de espermatozoides. A inibina promove uma maior ou menor liberação dos pulsos de GnRH, onde diminui ou aumenta a secreção do FSH afetando diretamente a produção da proteína ligadora de andrógeno e da própria inibina. A inibina e a ativina também estão relacionadas com o processo de retroalimentação do FSH, a regulação do fluido seminífero tubular, a manutenção da barreira hematotesticular e ainda, são responsáveis pelo desenvolvimento das células germinativas essenciais para espermatogênese (ALVARENGA, 2011; SAMPER, 2009).

Na espermatogênese vai ocorrer a transformação das células do epitélio germinativo em espermatozoide no túbulo seminífero e sofrerá diversos processos, entre eles fases de mitose e meiose, até apresentarem um número de cromossomos haploide. Na sua terceira fase, vai haver a diferenciação das espermátides em espermatozoides em

um processo chamado de espermiogênese (REECE, 1996; BERTOL, 2009; JOHNSON et al., 2000).

A espermiogênese é composta de uma variedade de transformações nucleares e citoplasmáticas como perda de grande parte do citoplasma, reorganização das organelas citoplasmáticas, formação do acrossomo e também de uma transformação de uma célula imóvel para uma célula potencialmente móvel, onde um flagelo foi formado. As espermátides maduras produzidas durante a fase final da espermiogênese são liberadas no interior do lúmen dos túbulos seminíferos como espermatozoides, sendo então liberadas em um lúmen tubular, ocorrendo um novo processo que seria a espermição (REECE, 1996).

É de grande importância o conhecimento deste mecanismo para um bom diagnóstico de alterações reprodutivas que possam vir a afetar o macho prejudicando sua função reprodutiva e qualidade espermática (PAPA et al., 2011).

De acordo com MOREL (2003), o órgão reprodutor masculino deve apresentar uma produção e um armazenamento de espermatozoides eficaz, pois sua fisiologia reprodutiva e anatômica é preparada para isso, inclusive para deposição desses espermatozoides na fêmea. SILVA et al. (1998) afirmam que para obtenção de uma eficiente taxa de fertilidade no rebanho, o garanhão deve apresentar boa capacidade reprodutiva e habilidade de fecundar, com presença de libido.

3.4 Célula espermática

Segundo Singh (2006), a célula espermática é dividida morfológicamente em cabeça, colo e cauda. Meyers (2009) relata que a célula espermática na espécie equina apresenta formato achatado semelhante a uma raquete, e possui as seguintes dimensões: 60-65 μm em seu comprimento total, sendo 40 μm correspondente a sua peça principal, 6-7 μm de cabeça (onde é considerada a porção mais larga da célula, é nela que fica localizado o acrossoma e o núcleo), 10 μm correspondente a peça intermediária e 4-5 μm a peça final.

O acrossoma é uma organela que foi desenvolvida através do complexo de Golgi e é composta por enzimas hidrolíticas em seu interior, essas enzimas por sua vez, vão sendo liberadas na reação acrossomal, com o intuito de haver penetração do espermatozóide no oócito (PESCH; BERGMANN, 2006).

A membrana plasmática recobre toda a célula espermática, possuindo agregados de lipídeos e proteínas com função de manter suas características químicas solúveis, e isso ocorre devido a semipermeabilidade. Ela atua ainda como uma barreira, mantendo então, em seu devido lugar, as composições do interior e do exterior da célula, evitando danos na estrutura no momento do ejaculado que possam causar perda da homeostase e morte celular (SILVA; GADELLA, 2006; AMMAN; PICKET, 1987). As alterações entre os meios podem estar relacionadas ao pH, a temperatura e a osmolaridade. Devido a isso, apenas um pequeno número de células, de bilhões que foram ejaculadas, chegarão ao oviduto (MORRIS et al., 2000).

Os espermatozoides ejaculados são incapazes de fecundar oócitos sem que antes sofram algumas modificações no trato reprodutivo feminino, esse processo é chamado de capacitação espermática (AMANN; GRAHAM, 1992). Eles precisam sofrer ainda uma reação acrossômica que se trata de um distúrbio que ocorre na membrana plasmática, ou seja, após a capacitação espermática, eles respondem ao estímulo que é desencadeado pela zona pelúcida, ocorrendo o processo de reação acrossômica (ASSUMPCÃO et al., 2002).

3.5 Testes laboratoriais para a avaliação espermática

Para que ocorra fertilização, é necessário que os espermatozoides apresentem características físicas e morfológicas adequadas. Através da avaliação do sêmen, o profissional pode realizar inferências sobre a qualidade dos espermatozoides, criando um conceito sobre o poder fecundante do sêmen analisado (SEVERO, 2009).

As análises realizadas para identificação das características seminais têm fundamental importância pois são responsáveis por precisar a eficiência reprodutiva do garanhão; inclusive, quando são utilizados vários testes combinados a capacidade de prever a fertilidade do animal aumenta consideravelmente (VARNER, 2008).

O que se objetiva numa análise de sêmen é apreciar indiretamente a produção qualitativa e quantitativa de gametas (AMANN, 1991). Ela é realizada para conhecer o número de células estruturais e normais, estando relacionadas com a capacidade fecundante do sêmen (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

As avaliações macroscópicas dos ejaculados mais utilizadas são o volume, o odor e a coloração. Elas são coadjuvantes essenciais na análise dos parâmetros seminais. No entanto, as avaliações microscópicas consistem, basicamente, na avaliação da morfologia,

concentração e motilidade espermáticas, recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

3.5.1 Volume, coloração e concentração

Ao coletar o sêmen, deve-se separar a fração gelatinosa do ejaculado da fração rica em espermatozoides, essa separação pode ser feita através de uma filtragem, com o acoplamento de um filtro ao copo coletor de sêmen ou realizada no momento da colheita, retraindo a fração gelatinosa e seus contaminantes. (SQUIRES et al., 1999). Em seguida, é feita a mensuração do sêmen quanto ao volume da fração rica em espermatozoides e a coloração. Em um garanhão, o normal é a coloração branca acinzentada, qualquer alteração pode indicar contaminação e outros (LOVE, 2007).

A maioria dos garanhões ejacula em média de 25 a 80 mL sem a fração gelatinosa, apenas a fração rica em espermatozoides (MCKINNON, 2007). Esse volume do ejaculado pode variar, pois depende de alguns fatores que estão relacionados a idade, época do ano, frequência de colheita de sêmen, estimulação sexual prévia, entre outros (LOVE, 2007).

A concentração do ejaculado varia de 100×10^6 a 200×10^6 de espermatozoides por mililitro, os aspectos que constituem essa variação são semelhantes aos que interferem no volume do ejaculado (MOREL, 1999).

3.5.2 Motilidade espermática

A avaliação da motilidade espermática acontece de forma subjetiva, através de microscopia óptica, com uma gota de espermatozoide entre lâmina e lamínula, ou seja, ela vai ser estimada por meio visual do examinador da amostra e é dada em porcentagem. Esse método também permite a avaliação do vigor do movimento espermático na amostra. Ainda que subjetiva, é uma técnica de grande relevância para identificar um sêmen de boa qualidade. (ARRUDA et al. 2011)

Atualmente, existe um método mais seguro para avaliação da motilidade que é realizado através de um sistema de análises computadorizada da motilidade espermática (Computer Assisted Sperm Analyses - CASA), onde os espermatozoides móveis são observados e é precisado o movimento de cada um, gerando resultados numéricos mais confiáveis (AMANN; KATZ, 2004).

De acordo com o CBRA (2013), o sêmen está dentro dos padrões desejáveis quando apresentar uma motilidade espermática maior ou igual a 60% e um vigor maior ou igual a 3, tratando-se de monta natural.

3.5.3 Teste de integridade de membrana plasmática (eosina/nigrosina)

Trata-se de um teste muito prático e acessível, podendo ser utilizado à campo no intuito de avaliar a integridade da membrana espermática (KUMI-DIAKA; BADTRAM, 1994).

São utilizados dois corantes nesse teste, a eosina e a nigrosina, a eosina é um corante que não é capaz de penetrar em células com membrana intacta, porém em células lesadas, as mesmas ficam coradas na cor rosa. A nigrosina vai atuar promovendo um contraste mais escuro de fundo da lâmina, permitindo a visualização dos espermatozoides que não foram corados. Este teste é recomendado por ser uma avaliação adicional e vem sendo bem utilizado (BRITO, 2007).

3.5.4 Teste de funcionalidade de membrana plasmática (hiposmótico)

O teste hiposmótico foi inicialmente desenvolvido por Jeyendran et al., (1984), sendo utilizado em sêmen humano. A medida que o tempo foi passando, outros pesquisadores realizaram trabalhos com animais, como: cães, equinos e pequenos ruminantes. O teste tem a função de avaliar a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide, que em meio hiposmótico possibilita a passagem da água e então entra no espermatozoide para que seja atingido o equilíbrio osmótico. Como consequência, a membrana se expande devido a um aumento de volume celular, causando o enrolamento da cauda, esse enrolamento é caracterizado como um processo fisiológico; mas, se a membrana estiver danificada, essa reação não ocorrerá. (CHAPON, 2011).

Para que o teste seja considerado válido, utiliza-se um microscópio de contraste de fase e são contabilizados um total de 100 espermatozoides (JEYENDRAN et al., 1984).

3.6 Ultrassonografia Doppler

A ultrassonografia Doppler é considerada uma ferramenta essencial na avaliação andrológica em seres humanos, no entanto, esse método ainda está pouco extenso na Medicina Veterinária. Apesar de já existirem vários estudos que demonstram sua

utilidade, ainda é uma técnica pouco explorada e utilizada devido aos altos custos dos aparelhos e a falta de especialização na área. A interpretação correta da ultrassonografia Doppler, requer entre outros fatores, o conhecimento dos parâmetros de normalidade e as alterações que podem ocorrer. (MIRÓ et al., 2015; CASTELLÓ et al., 2015; TORP-PEDERSEN; TERSLEV, 2008)

3.6.1 Princípios físicos da ultrassonografia Doppler

Para Carvalho et al. (2008) o conhecimento dos princípios básicos da ultrassonografia Doppler pode promover uma melhor compreensão da técnica. Torp-Pedersen e Terslev (2008) complementam que é importante dar a devida atenção aos possíveis artefatos, pois podem ocorrer devido a configurações inadequadas do Doppler, ou suas próprias limitações físicas.

O conhecimento acerca dos tipos de Doppler disponíveis, a anatomia vascular e topográfica e a destreza na utilização do Doppler, são fundamentais para um diagnóstico de qualidade (SILVA et al., 2012).

Na ultrassonografia convencional, de modo bidimensional (modo B), são utilizadas apenas informações sobre a amplitude no sinal que se dispersa de volta para então gerar a imagem, que com a força do eco de retorno, é formada em vários tons de cinza (NYLAND et al., 2005). Já a técnica do Doppler é fundamentada no efeito Doppler, que se baseia em alterações nas frequências das ondas emitidas ou refletidas por um objeto em movimento, em relação a um observador estático (GINTHER; UTT, 2004).

O Doppler associado à ultrassonografia convencional fornece informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos em diversos órgãos (CARVALHO et al., 2008). Esta ferramenta de avaliação não fornece apenas informações atuais da estrutura, como também pode ser capaz de prever condições futuras (GINTHER, 2007).

A técnica do Doppler colorido permite avaliar a presença ou ausência, a direção do fluxo sanguíneo inclusive dos pequenos vasos. E ainda é possível fazer uma diferenciação entre fluxos rápidos e lentos. Os sinais de movimentação do fluxo sanguíneo são codificados por cores na tela do equipamento sobre uma imagem em modo B, através do sentido de seu movimento em direção ao transdutor ou contrária a ele (CARVALHO et al., 2008); sendo cores que se diferem em tons de vermelho a amarelo e azul a verde (BOLLWEIN et al., 2016).

Na técnica do Doppler espectral, a detecção de desvio da frequência Doppler indica o movimento do alvo, que pode ser entendida na maioria das vezes como presença de fluxo. Seu sinal positivo ou negativo indica a direção, fluxo em direção ao transdutor é codificado como positivo (acima da linha de base), enquanto o fluxo em direção oposta ao transdutor é codificado como negativo (abaixo da linha de base) (CARVALHO et al., 2008). A diferença da frequência detectada pelo equipamento é projetada em um gráfico bidimensional em função do tempo e a onda Doppler é formada durante o ciclo cardíaco na avaliação do fluxo sanguíneo de artérias. Neste modo, alguns índices são calculados automaticamente pelo software (índices de resistência e pulsatilidade) e são úteis para se estimar a perfusão sanguínea no tecido irrigado pelo vaso avaliado (BOLLWEIN et al., 2016).

O índice de resistividade (RI), descrito por Pourcelot em 1974, relaciona o resultado da subtração entre as velocidades de pico sistólico e diastólico final sobre a velocidade de pico sistólico $RI = (VPS - VDF) / VPS$, e o índice de pulsatilidade (PI) descrito por Grosling e King em 1975, relaciona o resultado da subtração entre as velocidades de pico sistólico e diastólico final sobre a velocidade média $PI = (VPS - VDF) / M$, em que: M representa a média entre VPS e VDF (WOOD et al., 2010; CARVALHO, 2009).

Existe ainda o Power Doppler, que faz o mapeamento por amplitude, e tem mais sensibilidade ao detectar sinais fracos. Nele, a cor laranja com tonalidade de maior brilho vai indicar o fluxo sanguíneo de maior volume. (KING, 2006; CARVALHO, 2009). Ele permite mensurar a intensidade do fluxo sanguíneo e o número de células sanguíneas se movendo no vaso por unidade de tempo e a imagem apresenta coloração de diferentes tons seguindo a intensidade do fluxo em cada ponto da área (BOLLWEIN et al., 2016).

3.6.2 Doppler Testicular

Ortega-Ferrusola et al. (2014) conduziram um estudo onde houve uma avaliação da possibilidade de aplicação de exame ultrassonográfico Doppler nos testículos para diagnóstico de ginecologistas com problemas reprodutivos. Vale ressaltar que os testículos dependem de uma adequada perfusão sanguínea, onde qualquer alteração nesse fluxo pode acarretar problemas relacionados a sua função. Com isso, o diagnóstico através do Doppler pode evidenciar problemas testiculares, sendo então, uma técnica útil e com alto potencial para avaliação de exame andrológico. (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2014; REYES et al., 2012).

Embora o exame ultrassonográfico seja bem empregado no trato reprodutivo de fêmeas, este exame não é comumente utilizado em ganhões na avaliação de órgãos genitais e exame andrológico dos mesmos. (PAPA, 2011). Poucos veterinários a utilizam devido à falta de conhecimento das características ultrassonográficas do trato reprodutivo de ganhões (MONTEIRO, 2017). Porém, o estudo das características de imagem testicular, já vem sendo descrito em bovinos, equinos e pequenos ruminantes. Em equinos o índice de resistividade (RI) é um parâmetro importante na avaliação de possíveis enfermidades, esse índice indica a resistência do fluxo sanguíneo causado pelo leito microvascular distal ao local de medição. Inversamente, o índice de pulsatilidade (PI), vai quantificar a pulsatilidade na forma de onda (POZOR; MCDONNELL, 2004; PINGGERA et al., 2008).

O RI é um bom indicador para análise da funcionalidade do tecido testicular, além de identificar precocemente transtornos reprodutivos (POZOR et al., 2014). Segundo Ortega-Ferrusola et al. (2014), o aumento do RI e PI indica diminuição da perfusão do tecido distal. Em humanos, a ultrassonografia Doppler vem sendo utilizada para avaliação de fertilidade, onde os problemas de fertilidade idiopáticos, estão frequentemente ligados a comprometimentos vasculares (REYES et al., 2012; PINGGERA et al., 2008).

Segundo Zelli et al. (2013), em um estudo realizado com cães, os animais férteis, apresentavam os parâmetros entre VPS e VDF mais altos do que em animais inférteis. Porém quando eles eram mensurados na artéria marginal, apenas o VPS se mostrava maior, ou seja, segundo ela, a vascularização do testículo é mais eficaz na realização de suas funções fisiológicas.

Um estudo realizado por Ortega-Ferrusola et al. (2014) com possibilidade de uso da ultrassonografia Doppler na análise dos testículos de ganhões foi feito para identificar possíveis problemas reprodutivos. Nesse estudo, concluiu-se que se trata de uma ferramenta importante que pode vir a ser indispensável no exame andrológico da espécie equina.

A avaliação ultrassonográfica testicular tem sido utilizada para análise da qualidade e produção espermática, com o intuito de avaliar o potencial reprodutivo (BAILEY et al., 1998), porém, algumas limitações ainda são encontradas para o uso do Doppler na medicina veterinária, em destaque são a experiência do operador e a interpretação dos achados, bem como impedimento da avaliação ultrassonográfica correta, devido a presença de animais agitados durante a avaliação. Esses animais não

poderiam ser sedados antes do exame ser realizado pois a perfusão testicular poderia ser comprometida (VOLTA et al., 2014).

O uso da ultrassonografia Doppler ainda está praticamente restrito a pesquisa e aplicação clínica em grandes centros de referência e hospitais universitários; porém com a procura pela especialização na medicina veterinária e o crescimento de publicações e pesquisas relacionadas, espera-se um progresso por meio desta técnica, ao longo dos próximos anos (CASTELLÓ et al., 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área e Local de Realização do Experimento

O presente trabalho foi desenvolvido em parceria com o Centro de Ciências Veterinárias (UFPB/Campus II/Areia-PB), o Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBiotec/UFPB/Campus I/João Pessoa-PB) e o Laboratório de Biotecnologia aplicada à Reprodução Animal (UFRPE/Recife-PE). O estudo foi realizado com seis garanhões da raça quarto de milha, clinicamente sadios em diferentes condições reprodutivas. As colheitas de sêmen foram realizadas no mês de fevereiro de 2017, na cidade de Campina Grande (7° 15' 18" de latitude sul e 35° 55' 28" de longitude oeste), no estado da Paraíba. O presente experimento foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais sob protocolo nº 124/2016.

4.2 Exame Clínico-Andrológico e Ultrassonografia Com Doppler

Os animais selecionados para o estudo foram submetidos ao exame clínico-andrológico com análise de sêmen, com o intuito de detectar possíveis enfermidades que pudessem interferir no potencial reprodutivo dos mesmos. Para a colheita de sêmen dos animais, utilizou-se o método de vagina artificial. A vagina artificial foi revestida com uma mucosa de látex e preenchida com água aquecida, com temperatura em torno de 42°C para colheita, e o frasco coletor previamente aquecido a 37 °C em sua porção final, com filtro em sua boca para a separação da fração gelatinosa.

Na colheita, foram utilizadas éguas em estro como manequim. A égua-manequim foi devidamente contida para evitar acidentes. O garanhão era aproximado da fêmea para expor seu pênis e com isso, o órgão era higienizado (figura 1).



Figura 1. Aproximação entre garanhão e égua-manequim para exposição do pênis e posterior higienização do mesmo, no município de Campina Grande, estado da Paraíba - Brasil.

Fonte: Arquivos do autor.

Ao montar na égua, o garanhão tinha seu pênis desviado lateralmente e o mesmo era inserido na vagina artificial. Após a ejaculação, o pênis era retirado da vagina, enquanto o garanhão descia da égua-manequim. O ejaculado era imediatamente levado ao laboratório para se proceder as análises. As avaliações microscópicas eram realizadas pelo mesmo observador com o intuito de não haver divergências que pudessem interferir nos resultados do estudo.

Os ejaculados foram avaliados quanto aos parâmetros de volume e concentração espermática (diluição de 1:20 em solução formol-salina), foi também avaliada motilidade espermática, sendo feita de maneira subjetiva a campo e com o sistema CASA no laboratório, com parâmetros entre 0 a 100, para o vigor foi estabelecida uma escala de 0-5. Para avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizado o método de dupla coloração com os corantes eosina-nigrosina (CBRA, 2013), onde foram diluídos 20 μ L de sêmen de cada garanhão em solução contendo 20 μ L do corante e 20 μ L de solução fisiológica. Após a diluição, foi realizado o estiramento com 10 μ L de cada amostra e contadas 200 células, determinando-se a proporção entre células coradas e não coradas (células mortas e vivas, respectivamente).

Para o estudo da funcionalidade da membrana plasmática, (CBRA, 2013) foi diluído 10 μ L em 100 μ L de solução hiposmótica (50 mOsm/Kg H₂O), composta por citrato de sódio e água destilada. A solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação foram colocados 50 μ L de solução formol-salina para parar a reação osmótica dos espermatozoides. O HOST foi avaliado colocando 10 μ L de sêmen com solução entre lâmina e lamínula e observado através de microscopia ótica com aumento de 40x. Foram contadas 100 células, considerando funcionais aquelas com cauda enrolada e não-funcionais aquelas que permaneceram com a cauda esticada. O sêmen também foi analisado quanto à presença de patógenos.

Nestes mesmos animais foi realizada uma análise ultrassonográfica do fluxo sanguíneo testicular com uso do aparelho da marca SonoScape, modelo S2V, fabricado na China, com sistema tríplice mode (B+Flow+PW). Foram analisadas estruturas como testículo, epidídimo e funículo espermático (figura 2).

Cada reprodutor foi mantido em estação e contido em um brete, para realização do exame ultrassonográfico. Para avaliação, utilizou-se um transdutor de arranjo linear de frequência 7.5 MHz, para avaliação dos testículos e um transdutor convexo de frequência 4.0 MHz para avaliação do plexo, após a escolha do transdutor, aplicou-se gel de contato para obter um melhor contato entre o transdutor e a pele e com isso,

proporcionar uma melhor imagem. O examinador posicionou-se lateralmente ao animal, e empurrou o testículo contralateral dorsalmente. Após manter o testículo na posição ventral do escroto, o transdutor foi colocado e iniciou-se o escaneamento da região cranial para região caudal. Foram feitas varreduras de orientação vertical (figura 3), horizontal (figura. 4), dorso-lateral (figura 5), lateral (figura 6) e caudal (figura 7) realizando cortes longitudinais e transversais, de ambos os testículos de cada animal.

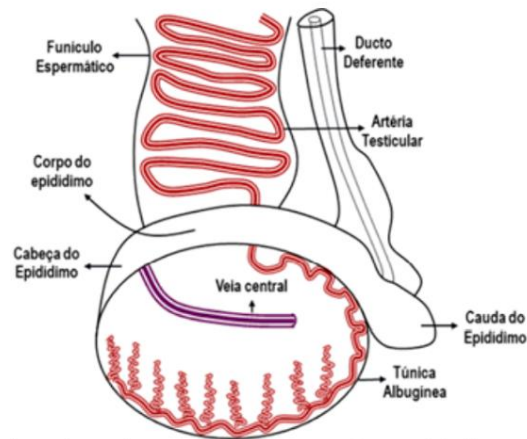


Figura 2. Representação esquemática da orientação do testículo, epidídimo, funículo espermático, além de estruturas ultrassonográficas importantes.
Fonte: MONTEIRO (2017).

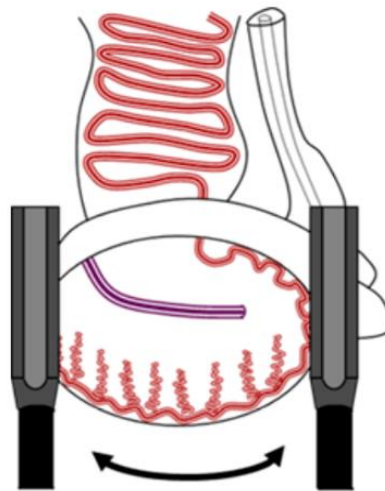


Figura 3. Esquematização do exame ultrassonográfico em varredura vertical, plano transversal. Nessa orientação foram avaliados testículos e epidídimo.
Fonte: MONTEIRO (2017).

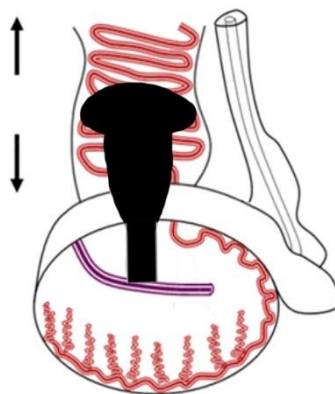


Figura 4. Esquematização de como o transdutor convexo foi colocado para varredura horizontal das estruturas, plano longitudinal. Nessa orientação foi possível observar o cordão espermático e a artéria testicular.
 Fonte: Adaptado de MONTEIRO (2017).

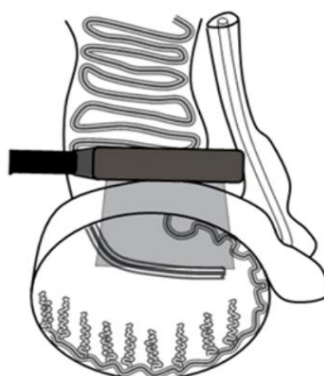


Figura 5. Esquematização de como o transdutor linear foi colocado na superfície dorso-lateral do testículo para avaliação do corpo do epidídimo, plano longitudinal.
 Fonte: MONTEIRO (2017).



Figura 6. Esquematização de como o transdutor linear foi colocado para avaliação da cauda do epidídimo, plano sagital.
 Fonte: MONTEIRO (2017).

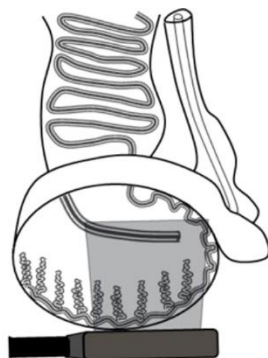


Figura 7. Esquemática de como o transdutor linear foi colocado no testículo, possibilitando a visualização dos ramos da artéria testicular, plano longitudinal.

Fonte: MONTEIRO (2017).

Na avaliação ultrassonográfica, foram calculados os índices de pulsatilidade (PI) e resistividade (RI) da artéria testicular através do modo Doppler espectral ou pulsado, esses índices foram mensurados. O fluxo sanguíneo do plexo pampiniforme foi avaliado através do modo Power Doppler e o parênquima testicular através do modo color Doppler.

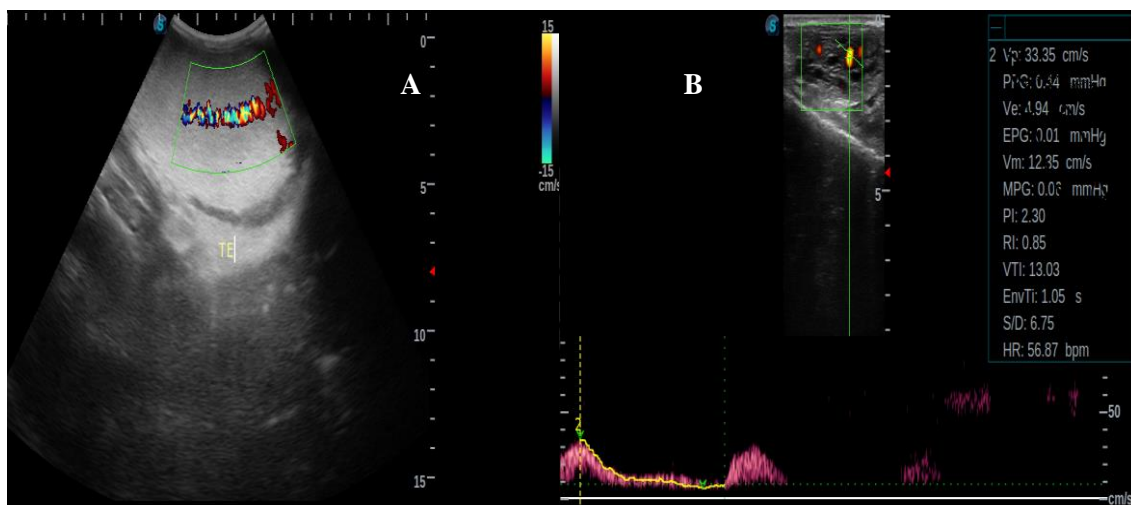


FIGURA 8. Testículo em plano longitudinal. Vasos testiculares visibilizados na porção central do testículo, através do modo color doppler (A). Os sinais coloridos são da artéria testicular do cordão espermático (CE). Observou-se a pulsatilidade do CE. Um cursor para ângulo de insonação foi usado apenas na imagem B. TE= testículo esquerdo

Fonte: Arquivos do autor

4.3 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o software JMP® 10.0.0 (Demo) e Microsoft Excel 2016. Representou-se os valores médios e o coeficiente de variação e foi realizada uma análise de correlação de spearman's.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente experimento foi realizado no mês de fevereiro para evitar uma considerável queda na qualidade espermática nos meses de inverno, seguindo os preceitos de Lucena et al., (2014), que afirma que em épocas em que o tempo de luminosidade do dia é menor quando comparado com os meses de verão, há maior liberação de melatonina, e esse hormônio por sua vez bloqueia os hormônios envolvidos na reprodução e consequentemente há uma queda na qualidade seminal (LUCENA et al., 2014).

No exame andrológico pode-se observar (tabela 1) que os garanhões avaliados em relação ao vigor espermático apresentaram o mesmo percentual progressivo individual nas seis amostras analisadas, gerando uma média no valor de 4 (0-5). Segundo critérios propostos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), o vigor espermático apresentou média satisfatória em relação a velocidade com que o espermatozoide se desloca, pois, seu valor ideal deve ser igual ou maior que 3.

Tabela 1. Valores individuais de cinética e concentração espermática de garanhões submetidos ao exame clínico-andrológico no estado da Paraíba

ANIMAL	VIGOR	CONCENTRAÇÃO (*10 ⁶)	VOLUME (mL)	MOTILIDADE (%)	
				Campo	Laboratório
1	4	114	45	70	66,6
2	4	36	20	75	52,4
3	4	120	20	75	67,9
4	4	186	58	70	53,2
5	4	95	80	60	53,7
6	4	52	45	65	45,6
MÉDIA	4	100	44,67	69,17	56,57
GERAL					
C.V (%)	0	53,43	51,48	8,45	15,54

C.V (%) = Coeficiente de variação

Fonte: Elaborado pelo autor

A concentração espermática apresentou uma média de 100×10^6 células espermáticas por mL, enquanto o volume espermático apresentou uma média de 44,67 mL. Segundo Morel (1999), a concentração do ejaculado varia de 100×10^6 a 200×10^6 de espermatozoides por mililitro de ejaculado na maioria dos garanhões, estando então na média estabelecida para a espécie equina, porém se avaliados individualmente, alguns

garanhões ficaram abaixo do valor estabelecido. O valor da concentração menor que o preconizado pode estar relacionado ao fato explicado por Morel (1999) que afirma que a concentração espermática pode variar devido a alguns fatores relacionados a idade, frequência de colheita e excitação. Como os animais avaliados possuem um alto valor zootécnico, a colheita de sêmen nestes animais é constante, podendo este fator ter causado interferência nas amostras com valor de concentração abaixo do esperado.

De acordo com o estudo de Mckinnon (2007), foram considerados ejaculados ideais para este estudo aqueles que apresentaram padrões físicos mínimos entre 25 a 80 mL de volume. Alguns reprodutores não atingiram o padrão ideal, porém os aspectos que constituem essa variação são semelhantes aos que interferem na concentração do ejaculado, segundo Love (2007). De acordo com a média geral, os reprodutores encontram-se dentro dos parâmetros estabelecidos como ideais.

Em relação a motilidade observada no campo 69,17%, já no laboratório 56,57 %. De acordo com o CBRA (2013), o sêmen está dentro dos padrões desejáveis quando apresenta uma motilidade espermática maior ou igual a 60%. Esses valores foram observados na avaliação da motilidade realizada a campo, porém nos dados coletados pelo CASA no laboratório de Biotecnologia aplicada à Reprodução Animal, na Universidade Federal Rural de Pernambuco, os valores encontram-se um pouco abaixo do padrão.

Isto pode ser justificado pelo tempo de transporte até o laboratório podendo ter sido mal acondicionado e a influência da refrigeração sobre as células. Segundo Nunes (2006), a temperatura e o tempo de armazenamento do sêmen têm efeito sobre as características de motilidade espermática. Amann e Graham (1993) também reportaram esse fato dizendo que quando a membrana plasmática é acometida pelo frio da refrigeração, ela pode vir a sofrer mudanças na sua permeabilidade, sucedendo em alterações funcionais e metabólicas que danificam a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides, o que se evidenciou no presente estudo, tendo como reflexo a diminuição da motilidade.

Apesar disso, os valores da motilidade espermática observados a campo através de avaliação subjetiva obtidos no presente experimento, são similares aos resultados encontrados no sistema CASA, e mesmo estando superestimados, não foram verificadas diferenças tão significativas entre os padrões. Isso comprova a acurácia da avaliação subjetiva, mesmo que estudos reportem que essa análise é imprecisa, apresentando uma boa relação com a avaliação da qualidade seminal.

Quanto aos parâmetros observados na Tabela 2, que estão relacionados a integridade da membrana plasmática, esses animais apresentaram uma média de 41,83 de membranas íntegras, e no teste do HOST para avaliação de funcionalidade da membrana plasmática a média ficou em 63,00 de membranas funcionais.

Tabela 2. Valores individuais dos parâmetros de integridade e funcionalidade da membrana espermática de garanhões submetidos ao exame clínico-andrológico no estado da Paraíba

ANIMAL	EO	HOST
1	65	104
2	45	85
3	46	29
4	29	77
5	45	50
6	21	33
MÉDIA GERAL	41,83	63,00
C.V (%)	36,61	48,07

EO= Teste eosina/nigrosina

HOST = Teste hiposmótico

C.V (%) = Coeficiente de variação

Fonte: Elaborado pelo autor

O percentual de espermatozoides não corados no teste de eosina-nigrosina foi inferior aos valores de espermatozoides reativos ao HOST, comprovando a importância desses testes para avaliação da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática dos espermatozoides, porém preservando os resultados descritos por Rodrigues-Martinez (2003) e Kirk et al. (2005) que demonstraram que nenhum teste de maneira isolada é capaz de prever a fertilidade, dada a complexidade da célula espermática. Os valores resultantes do exame ultrassonográfico realizados nos garanhões estão explicitados na Tabela 3.

A avaliação ultrassonográfica da região escrotal é uma técnica eficiente na obtenção de medidas precisas do testículo do garanhão, segundo estudos de Pozor (2005). Três medidas diferentes do parênquima testicular foram obtidas para cálculo da dimensão: largura, altura e comprimento. Nesse aspecto os garanhões apresentaram valores bem similares e mantiveram uma média padrão.

Tabela 3. Mensuração do fluxo sanguíneo testicular encontrados através da avaliação ultrassonográfica modo Doppler em garanhões Submetidos ao exame clínico-andrológico no estado da Paraíba

cm/s			
ANIMAL	RI	PI	DIMENSÃO
1	1,45	0,69	23,24
2	2,04	0,84	21,39
3	2,50	0,83	23,49
4	1,97	0,76	25,87
5	0,71	1,38	22,29
6	0,58	0,88	23,07
MÉDIA GERAL	1,54	0,89	23,22
C.V (%)	49,97	27,66	6,49

RI = Índice de resistividade PI = Índice de pulsatilidade C.V (%) = Coeficiente de variação
 Fonte: Elaborado pelo autor

Como afirma Papa (2011), o método de avaliação reprodutiva do garanhão através da ultrassonografia Doppler ainda não está tão difundido na Medicina Veterinária, portanto, mediante as limitações de estudos, foi realizada uma correlação da motilidade espermática com os índices de RI e PI, além de outras características seminais, como pode ser observado na Tabela 4.

TABELA 4. Correlação entre parâmetros de motilidade espermática, características seminais e exame ultrassonográfico de garanhões submetidos ao exame clínico-andrológico no estado da Paraíba

Variável: MOTILIDADE LABORATÓRIO											
VARIÁVEL	CORRELAÇÃO	SIGNIF PROB	-,8 -,6 -,4 -,2 0 ,2 ,4 ,6 ,8								
RI	0,5712	0,2364									
PI	-0,3117	0,5477									
EO	0,7860	0,0638									
HOST	0,1905	0,7178									
CONCENTRAÇÃO	0,3750	0,4638									
VOLUME	-0,3199	0,5365									

RI= Índice de resistividade PI= Índice de pulsatilidade EO= Teste eosina/nigrosina Host= Teste hiposmótico
 Fonte: Elaborado pelo autor

Pozor et al. (2014) verificaram que os índices de RI e PI em garanhões possuem correlação negativa com a motilidade. No presente estudo, os índices relacionados a RI

apresentaram correlação positiva, diferindo do estudo de Pozor et al. (2014), porém similar em relação ao PI. Isso pode ser explicado pelas relações encontradas entre a motilidade espermática e o índice de pulsatilidade (PI), ou seja, quanto menor o PI, maior será a motilidade espermática. Já em relação ao índice de resistividade (RI), não foram apresentadas diferenças quando correlacionadas com a motilidade espermática.

Os testes de integridade e funcionalidade de membrana (eosina-nigrosina e HOST), demonstraram que quanto menor for a presença de alterações espermáticas, sejam elas associadas a integridade ou a funcionalidade da membrana plasmática, melhor será sua motilidade. Se tomarmos por base um grande número de publicações, pode-se observar de uma forma geral que a relação entre a morfologia espermática e a motilidade, ligada diretamente com a fertilidade apresenta desde baixa até muito alta correlação (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

Foi possível observar ainda a relação entre o volume espermático e sua motilidade, que apresentam valores inversamente proporcionais, ou seja, quanto menor se apresentar este volume, maior será sua motilidade. Isto pode direcionar que o plasma seminal, nestes ganhões, interfere negativamente na motilidade espermática. Isso pode ser explicado pelo estudo de Picket et al. (1975), onde foi observado que uma alta quantidade de plasma seminal pode apresentar efeito deletério para a célula espermática. A concentração espermática tem relação direta com a motilidade, pois quanto maior sua concentração, maior será a motilidade espermática.

É visível no estudo que o índice de pulsatilidade e o volume de plasma seminal interferem diretamente na motilidade espermática de ganhões, sendo ela, um dos principais métodos indicador de qualidade da célula espermática (FOSTER, 2011).

6 CONCLUSÃO

Baseado no exposto, conclui-se que o exame andrológico para avaliação de qualidade espermática é imprescindível para evitar prejuízos financeiros que possam ocorrer futuramente. A associação da ultrassonografia Doppler nessa avaliação, é um eficiente recurso complementar na avaliação das características seminais de garanhões, ajudando em um diagnóstico mais seguro de fertilidade do animal.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.715-745.
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, p.317-325, 2004.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011. Disponível em www.cbra.org.br
- ASSUMPTÃO, M. E. O. D. ; LIMA, K. H. A. S.; MELLO, M. R. B.; OLIVEIRA L. J.; OLIVEIRA, V. P.; TAVARES, L. M. T.; VISINTIN, J. A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.39, n.3, São Paulo. 2002. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/5978> Acesso em: 15 de junho de 2017.
- BAILEY, T. L.; HUDSON R. S.; POWE T. A.; RIDDELL M. G.; WOLFE D. F.; CARSON R. L. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, v.49, p.581-594, 1998.
- BARBOSA, E. L. **Valeu boi! O negócio da vaquejada**. Teresina: EDUFPI, 2006.
- BERTOL, M. A. F. **Estágio curricular supervisionado em reprodução animal**. Trabalho apresentado para conclusão de curso de medicina veterinária da Universidade Federal do Paraná. 2009.
- BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. **Evaluating breeding soundness in stallions. 5. Predicting potential fertility**. Vet Med Sept, 815-818, 1997.
- BRITO FILHO, F. R. M. **PERFIL DA CRIAÇÃO DE EQUINOS COMPETIDORES DE VAQUEJADA**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2014.
- BRITO, L. F. C. **Evaluation of stallion sperm morphology**. Clin Techn Equine Pract, v.6, p.249-264, 2007.

BOLLWEIN, H.; HEPPELMANN, M.; LÜTTGENAU, J. Ultrasonographic Doppler Use for Female Reproduction Management. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v.32, p.149-164, 2016.

BUDRAS, K. D.; MCCARTHY, P. H.; FRICKE, W.; RICHTER, R. **Anatomy of the Dog**. 5.ed. London, UK: Manson, 2007.p.68-70.

CARVALHO, C. F. **Ultrassonografia Doppler em pequenos animais**. São Paulo: Roca, p. 274, 2009.

CARVALHO, C. F.; CHAMMAS, M. C.; CERRI, G. G. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n. 3, p. 872-879, 2008.

CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, CBRA, 1998. www.cbra.org.br, acesso em maio de 2017.

CHAPON, F.P. **Teste hiposmótico**. In: Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 28p. 2011.

CHALHOUB, M.; CARVALHO, G.; FILHO, J. M. S.; FILHO, A. L. R.; OLIVEIRA, J. V. L. Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen equino diluído, resfriado a 20°C e transportado a diferentes momentos da ovulação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 1996.

DOGRA, V. S.; GOTTLIEB, R. H.; OKA, M.; RUBENS, D. J. **Sonography of the scrotum**. **Radiology**, v.227, p.18-36, 2003.

ESCODRO, P. B; TONHOLO, J.; FERNANDES, T.J.; OLIVEIRA, C. F.; BERNARDO, J. O.; OLIVEIRA, A. S.; ESCODRO, L. O. Empreendedorismo e inovação no ensino de medicina veterinária e potencial multidisciplinar – Resultados preliminares. PROJETO CARROCEIRO EM ALAGOAS. **Brazilian Journal of Equine Medicine**. Ano 5, nº 30. p. 26. 2010.

FAINA, D. O. **Quarto de Milha no Brasil**. In: simpósio de equideocultura, 3, 2011, Viçosa, Minas Gerais. Anais. Viçosa: UFV

FOSTER, M. L.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K.; TEAGUE, S.; LACAZE, K.; BLANCHARD, T. L. Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. **Theriogenology**. 75(8): 1499-1505. 2011.

GETTY, R. Sisson/Grossman: **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1134. 1986.

GHEZZI, M. **Anatomía Funcional Aparato genital Masculino**. Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. 2004.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects**. 2th ed. Equiservices Publishing, Cross Plains. 642p. 1992.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-doppler ultrasonography**: Book4, cap 4, Producing spectral graphs. p.61-81. 2007.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in Equine Reproduction: Principles, Techniques and Potencial. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24 (12), p.516-526, 2004.

GUERRA, P; MEDEIROS S. A. F. SETOR EQUINO MOVIMENTA R\$ 7,3 BILHÕES POR ANO. **Revista Agroanalysis**. 2006. Disponível em: <http://www.manera.feis.unesp.br/pdf/uso%20do%20cavalo.pdf>. Acesso em: 12 de abril de 2017.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Editora Manole. p.279-281, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Editora Manole. p.03-11, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Editora Manole. p.530, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reproducción e inseminación artificial em animales, **Editorial Mc Graw Hill**. 7. ed. México D.F. 2002.

HAMMES, A. M.; PIMENTEL, C. A., FERNANDES, C. E. Fertilidade em garanhões avaliada através do exame andrológico. **Ciência Rural**, v.26, n.2., p.277-283, 1996.

IBGE Banco de dados agregados/IBGE sistema IBGE de recuperação automática-SIDRA. Disponível em: <http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=22> Acesso em: 20 de maio de 2017.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZPELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

KIRK, E.S.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.64, p.1422-1439, 2005.

KONIG, H. E.; LIEBICH, H. G., **Anatomia dos Animais Domésticos**. Órgãos e sistemas. Vol. 2. – Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 119.

KUMI-DIAKA, J.; BADTRAM, G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. **Theriogenology**, v.41, p.1355-366, 1994.

LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view>. Acesso em 21 de maio de 2017.

LOVE, C. C. Reproductive examination of the stallion: evaluation of potential breeding soundness. In: YOUNGQUIST, R. S.; THARELFALL, W. R. Current therapy in large animal. **Theriogenology**. 2nd. ed. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2007. p. 10-14.

LUCENA, C. A. O.; MAIA, M. S.; MAIA, J. J. A.; SILVA, G. F.; SOUSA, T. M. L.; MOURA, C. E. B. Influência da época do ano sobre os parâmetros seminais de garanhões pôneis. **Acta Veterinária Brasilica**. V.8. supl.2. 2014.

MARIZ, T. M. A.; ANJOS, A. G.; FLOR, J. M.; FLOR, L. M. A. M.; LIMA, C. B.; GIVISIEZ, P. E. N.; AZEVEDO, P. S. Influências do clima sobre a atividade reprodutiva de éguas da Raça Mangalarga Machador no Estado de Sergipe. **Acta Veterinaria Brasilica** v.3, n.4, p.132-140, 2009.

MARTÍNEZ, M.R., **Emasculación en equinos**. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia Michoacán, México. 2006.

MCKERNS, KENNETH W. **The Gonads**. 2ed. New York: Ed.Appleton-CenturyCrofts, 1969.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction. **Anatomy, Physiology and Endocrinology**. Ed. Lea e Febiger. Cap. 76, p. 645-658, 1993.

MEYERS, S. A. Sperm Physiology. In: SAMPER, J.C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 2nd. Ed. Missouri: Saunders Elsevier, cap. 05, p. 47-55, 2009.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4. Ed. Porto Alegre: Livraria Sulina editora, p. 463-513, 1975.

MIRÓ, J.; VILÉS, K.; ANGLADA, O.; MARÍN, H.; JORDANA, J.; CRISCI, A. Color Doppler provides a reliable and rapid means of monitoring luteolysis in female donkeys. **Theriogenology**, Bellaterra, v. 83, p. 485-490, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.007>. Acesso em: 23 de maio de 2017.

MONTEIRO, G.A., Ultrassonografia aplicada ao exame andrológico em garanhões. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.157-168, jan/mar. 2017. Disponível em: www.cbra.org.br. Acesso em: 01 de julho de 2017.

MOREL, D. **Equine artificial insemination. Production of spermatozoa**. CAB International, New York. Cap. 4 p78. –149. 1999.

MOREL, D. **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management**. 2. ed. Editora: CAB International. 2003.

MORRIS, L. H. A.; HUNTER, R. H. F.; ALLEN, W. R. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **Journal of Reproductive and Fertility**, v.118, p.95-100, 2000

NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; SILVA, E. V. C.; Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.30, n.1/2, p.42-56, jan./jun. 2006. Disponível em www.cbra.org.br. Acesso em: 09 de junho de 2017.

NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S.; HERRGESELL, E. J. Princípios físicos, instrumentação e segurança do diagnóstico por ultra-som. In: NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S. **Ultra-som diagnóstico em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2. ed., 2005. p. 1-20.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GRACIA-CALVO, L. A.; EZQUERRA, J.; PENA, F. J. Use of Colour and Spectral Doppler Ultrasonography in Stallion Andrology.

Reproduction of Domestic Animals, Cáceres, v. 49, n.4, p. 88–96, 2014. ISSN: 0936–6768.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M. A.; DELL’AQUA JR, J.A.; MONTEIRO, G. A.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; NETO, C. R. **BOTUPHARMA MANUAL DE ANDROLOGIA E MANIPULAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**. 2011. Disponível em: <http://www.botupharma.com.br/arq/Andrologia.pdf>. Acesso em: 19 de abril de 2017.

PESCH S., BERGMANN M.; **Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation**. *Micron*, v.37, p.597-612, 2006.

PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar-California, v.7, n.3, p. 145-173, 1987.

PICKETT, B. W.; SULLIVAN, J. J.; BYERS, W. W.; PACE, M. M.; REMMENG, E. E. **Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa**. *Fertil Steril* 1975;26(2);167-174.

PINGGERA, G. M.; MITTERBERGER, M.; BARTSCH, G.; STRASSER, H.; GRADL, J.; AIGNER, F.; PALLWEIN, L.; FRAUSCHER, F. **Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis**. *BJU Int*, v.101, p.722-726, 2008.

POZOR, M. A. How to evaluate a Stallion’s Scrotum Using Ultrasound. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP** – Seattle, Washington, USA, 2005.

POZOR, M. A. Evaluation of testicular vasculature in stallions. **Clinical Techniques in equine practice**. v 6, p 271-277, 2007.

POZOR, M. A.; NOLIN, M.; ROSER, J.; RUNYON, S.; MACPERSON, M.L.; KELLEMAN, A. Doppler index of vascular impedance as indicator of testicular dysfunction in stallions. **J Equine Vet Sci**, v.34, p.38-39, 2014.

RODRIGUES-MARTINEZ, H. Laboratory Sêmen Assessment and Prediction of Fertility: Still Utopia? **Reproduction of Domestic Animals**, v.38, p.312-318, 2003.

ROCHA, R. M. P.; MATOS, M. H. T.; LIMA, L. F.; SARAIVA, M. V. A.; ALVES A. M. C. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinária Brasília**, v.5, n.2, p.147-157, 2011.

SAMPER, J. C. Techniques for artificial insemination. In: YOUNGQUIST, R. S.; THREFFALL, W. R. **Current therapy in large animal theriogenology**. 2nd ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 37-42.

SAMPER, J. C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Philadelphia Saunders Elsevier, 306 p. 2000.

SEVERO, N. C.. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária**, Ano 28, nº 167, p.36 – 39, , janeiro/fevereiro/ 2009

SILVA, A. E. D. F.; INANIAN, M. M.; ESTEVES, S. N. Criação de Equinos: Manejo Reprodutivo e da Alimentação. Ed. Embrapa, Brasília – DF. 1998.

SINGH B. K. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda**. São Paulo: Andrei Editora, 2006. 331p.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

STANBENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON M. J.; REECE, W. O. Dukes – **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A.; 1996. Cap. 35, p. 603-614.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**. Colorado State university: College of veterinary medicine and biomedical Sciences, p11- 21, 1998.

TORP-PEDERSEN S. T.; TERSLEV L. **Settings and artefacts relevant in colour/power Doppler ultrasound in rheumatology**. **Annals of the Rheumatic Diseases, Nordre Fasanvej**, v. 67, p. 143-149, 2008. 67: 143-149. Disponível em: <http://ard.bmj.com>. Acesso em 28 de maio de 2017.

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

VOLTA, A.; MANFREDI, S.; VIGNOLI, M.; RUSSO, M.; ENGLAND, G. C. W.; ROSSIF.; BIGLIARDI, E.; DI IANNI, F.; PARMIGIANI, E.; BRESCIANI, C.; GNUDI, G. **Use of contrast-enhanced ultrasonography in chronic pathologic canine testes**. **Reprod Domest Anim**, v.49, p.202-209, 2014.

ZELLI, R.; TROISI, A.; ELAD NGONPUT, A.; CARDINALI, L.; POLISCA, A. Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. **Research in Veterinary Science**, v.95, p.632-637, 2013.