



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**MANIPULAÇÃO DO SÊMEN DE GARANHÕES COM DIFERENTES GRAUS DE
HEMOSPERMIA**

Luiz Roberto Pena de Andrade Junior

Botucatu – SP

22/09/2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**MANIPULAÇÃO DO SÊMEN DE GARANHÕES COM DIFERENTES GRAUS DE
HEMOSPERMIA**

LUIZ ROBERTO PENA DE ANDRADE JUNIOR

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre em Biotecnologia Animal, área Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Titular Frederico Ozanam Papa

Botucatu – SP

Setembro/2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Andrade Junior, Luiz Roberto Pena.

Manipulação do sêmen de garanhões com diferentes graus de homospermia / Luiz Roberto Pena Andrade Junior. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504002

1. Equino - Reprodução. 2. Homospermia. 3. Fecundidade. 4. Sêmen. 5. Coloides.

Palavras-chave: Coloide; Equino; Fertilidade; Homospermia.

Nome do autor: Luiz Roberto Pena de Andrade Junior

Título: MANIPULAÇÃO DO SÊMEN DE GARANHÕES COM DIFERENTES GRAUS DE HEMOSPERMIA

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP - Botucatu /SP

Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP - Botucatu /SP

Dr. Márcio Teoro do Carmo

Membro

Veterinário Autônomo - Botucatu /SP

Data da Defesa: 22 de setembro de 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua proteção durante todo o meu caminho até aqui percorrido.

A minha família, minha base de sustentação, meu pai Luiz Roberto, minha mãe Adalgisa e minha irmã Carolina, mesmo estando distantes durante toda minha caminhada, foram meus grandes incentivadores.

Ao meu HERÓI, meu pai, médico veterinário que sempre foi meus olhos, mãos e acima de tudo minha alma.

A minha namorada Camila, por todo o carinho a mim depositado.

Ao grande mestre e “pai” Prof. Papa, que me acolheu e sempre esteve presente durante todo o desenvolvimento do nosso projeto.

A Prof. Fabiana pois, sem seus auxílios durante toda minha carreira acadêmica nada disso teria acontecido.

Ao Prof. Nereu pelos conselhos, abraços e minutos de conversa que fizeram diferença para toda minha vida, ao Prof. Marco Alvarenga pelas oportunidades, considerações e conselhos, ao Prof. José Dell’Aqua pelas horas de discussão e incentivo.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelos ensinamentos.

Aos funcionários do departamento pelo apoio durante a execução do projeto, meu muito obrigado para Edilson, Edvaldo (cabeça), Camila Dell’Aqua, Felipe, D. Raquel.

A minha família Botucatuense Troncarelli pelo amor, por todos os momentos aqui vividos e apoio concedido.

Aos meus grandes amigos Luis, Endrigo, Sidnei, Bertiny, Felipe Dalanezi, Felipe Hartwig, João Alexandre, Gabriel Leite, Lorenzo, Patricia Papa, Priscilla Guasti, Marcio Teoro, Lucas Troncarelli, pela união e força para execução do projeto e desenvolvimento de um trabalho em equipe, entre irmãos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu-SP, pela oportunidade de cursar o Mestrado.

Agradeço aos haras parceiros que contribuíram para execução deste projeto: Haras Itapuã e Central Lub Breeding.

Finalizo agradecendo a todos que de alguma forma contribuíram para mais esta etapa de minha vida.

RESUMO

ANDRADE JUNIOR, L.R.P. MANIPULAÇÃO DO SÊMEN DE GARANHÕES COM DIFERENTES GRAUS DE HEMOSPERMIA . Botucatu – SP. 2017, p.44 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Métodos de processamento espermático são rotineiramente utilizados para otimização do sêmen de garanhões. As biotecnologias aplicadas a reprodução permitem que animais geneticamente superiores disseminem suas características. Apesar disso, mesmo em garanhões clinicamente sadios, o sêmen criopreservado possui taxas de fertilidade inferiores quando comparado ao sêmen fresco, em decorrência do estresse químico e físico gerados pela preservação através do frio. Tal, condição pode ser intensificada em animais que apresentam alterações no trato reprodutivo que comprometam a qualidade seminal, como por exemplo, a presença de sangue no ejaculado, denominado hemospermia. Esta afecção geralmente é observada em decorrência de lesões na uretra, processo uretral, pênis e vesícula seminal. O efeito dos componentes sanguíneos sobre a qualidade do sêmen ainda não está bem estabelecido. A manipulação do sêmen por meio da centrifugação com gradientes de densidade além de proporcionar a seleção das células espermáticas, possivelmente permite a separação das hemácias do ejaculado em casos de hemospermia. Em virtude da escassez de informações sobre a viabilidade do sêmen na presença do sangue, visto que os ejaculados com quadro de hemospermia são descartados e a possibilidade de separar as hemácias do ejaculado apresentam dificuldades no aproveitamento do sêmen, mais estudos são necessários acerca do assunto para minimizar as dúvidas da utilização ou não do ejaculado.

Palavras-chave: equino, hemospermia, coloide, fertilidade

ABSTRACT

ANDRADE JUNIOR, L.R.P. MANIPULATION OF STALLIONS SEMEN WITH DIFFERENT DEGREES OF HEMOSPERMIA - Botucatu – SP. 2017, p.51 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Sperm processing methods are routinely used for stall optimization of stallions. Biotechnology applied to reproduction allows genetically superior animals to be better harvested, to disseminate their characteristics through generations. Despite this, even in clinically healthy stallions, cryopreserved semen has lower fertility rates when compared to fresh semen, due to the stress generated by cryopreservation. Such a condition can be intensified in animals that present pathologies in the reproductive tract that compromise seminal quality, such as the presence of blood in the ejaculate, called hemospermia. This condition is usually seen as a result of injuries to the urethra, urethral process or penis. It is unknown what amount of blood in an ejaculate leads to subfertility. The manipulation of semen by centrifugation with density gradients in addition to providing the selection of the spermatic cells possibly allows the separation of the red blood cells from the ejaculate in cases of hemospermia. Due to the scarcity of information on the viability of semen in the presence of blood and the possibility of separating red blood cells from ejaculate more studies are needed on the subject.

Keywords: equine, hemospermia, colloid, fertility

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Anatomia do pênis do garanhão.....	10
FIGURA 2- Esquematização do tratamento de fístula uretral através de cauterização química.....	17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Anatomia do sistema reprodutor do macho.....	12
2.2. Anatomofisiologia da célula espermática	14
2.3. Hemospermia em garanhões	15
2.3.1. Etiopatogenia.....	16
2.3.2. Sinais Clínicos	17
2.3.3. Diagnóstico	17
2.3.3.1. Ultrassonografia	18
2.3.3.2. Endoscopia	18
2.3.3.3. Coleta fracionada	18
2.3.4. Tratamentos.....	19
2.3.5. Influência do sangue na qualidade do sêmen equino	21
2.4. Separação espermática por gradiente de densidade	22
2.4.1. Manipulação do sêmen na presença de sangue	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
HIPÓTESE	33
OBJETIVOS.....	33
ARTIGO I – Hemospermia em garanhões	35
ARTIGO II- Fertilidade do sêmen de garanhões com hemospermia.....	50

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O rebanho de equinos do Brasil está classificado como sendo o quarto maior do mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos, China e México, e movimentando anualmente mais de R\$ 7,0 bilhões e 642 mil empregos (GUERRA, 2015).

Há mais de meio século as biotecnologias de criopreservação do sêmen de bovinos são utilizadas comercialmente com êxito, proporcionando um grande avanço na espécie neste quesito. Na reprodução de equinos a seleção genética relacionada à qualidade dos espermatozoides, em especial, resistência destes ao processo de refrigeração e congelação, esteve ausente durante anos (AVANZI et al., 2011). Desta forma, faz-se necessário o aprimoramento das biotecnologias aplicadas ao sêmen do garanhão, a exemplo refrigeração e congelação, de modo a promover um avanço para equinocultura, otimizando a qualidade do ejaculado dos garanhões.

Na espécie equina a biotecnologia mais utilizada é a refrigeração, porém o uso do sêmen congelado vem crescendo cada vez mais, proporcionando a disseminação do material genético de animais superiores, sem interferência de localização, além de preservar as células espermáticas por tempo indeterminado (MILLER, 2008). Entretanto, durante o processo de criopreservação os espermatozoides sofrem danos em decorrência da preservação pelo frio, situação esta agravada em garanhões que possuam alguma enfermidade no trato reprodutivo, como a hemospermia, que é caracterizada pela presença de sangue no ejaculado.

As causas de hemospermia em garanhões estão relacionadas a presença de lesões no trato reprodutivo masculino, desde o epidídimo até o processo uretral. Lesões no processo uretral e uretra, e as enfermidades de carcinoma de células escamosas e vesiculite seminal podem ser apontadas como principais causas de hemospermia. A idade em que os animais apresentam o quadro clínico pode ser variável (MCKINNON, 1992). A presença de hemácias no ejaculado possivelmente não afetaria a cinética e morfologia espermática, no entanto, há redução da fertilidade de garanhões com hemospermia (TURNER et al., 2011).

Nos casos de garanhões que apresentam alto índice de células morfologicamente anormais é necessário o uso de biotecnologias que proporcionem

uma maximização das características seminais, a fim de obter resultados satisfatórios no momento da inseminação artificial nas éguas. Um protocolo utilizado por Miles et al. (2013), envolve a utilização do Equipure®, uma sílica como gradiente de seleção, que permite a separação de espermatozoides levando em consideração sua baixa motilidade, obtendo após a centrifugação uma alta taxa de espermatozoides móveis.

Desta forma a utilização de gradientes de densidade seria uma opção para permitir a separação de hemácias do ejaculado em casos de hemospermia, uma vez que a densidade dos eritrócitos ($1,07 \text{ gr/cm}^3$) e espermatozoides ($1,22 \text{ gr/cm}^3$) sejam diferentes e possivelmente o desenvolvimento de um gradiente com densidade $1,15 \text{ gr/cm}^3$ permita a sedimentação das células vermelhas acima e a passagem dos espermatozoides.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia do sistema reprodutor do macho

Para a formação e deposição do sêmen no trato reprodutor da fêmea é necessário uma interação entre as estruturas anatômicas do sistema reprodutor masculino (KLEIN, 2014). Dentre as partes que o compõe estão um par de testículos que se encontram dentro da bolsa testicular, músculo cremaster, epidídimos, ductos deferentes, pênis e glândulas sexuais acessórias compostas por ampolas dos ductos deferentes, vesículas seminais, próstata e bulbouretrais (MCKINNON; VOSS, 1992; KLEIN, 2014).

O pênis ou órgão copulador no garanhão possui a particularidade de ser do tipo músculo cavernoso, dividido em base, corpo e glande (AMANN & GRAHAM, 1993). Quando em ereção os espaços cavernosos, como corpo esponjoso da glande, corpo esponjoso do pênis, que envolve a uretra, aumentam de volume devido ao preenchimento por sangue carregado pelos estímulos nervosos através das vias eferentes dos ramos arteriais do pudendo e obturador (figura 1) (KLEIN, 2014; SAMPER, 2009; HAFEZ, 2004).

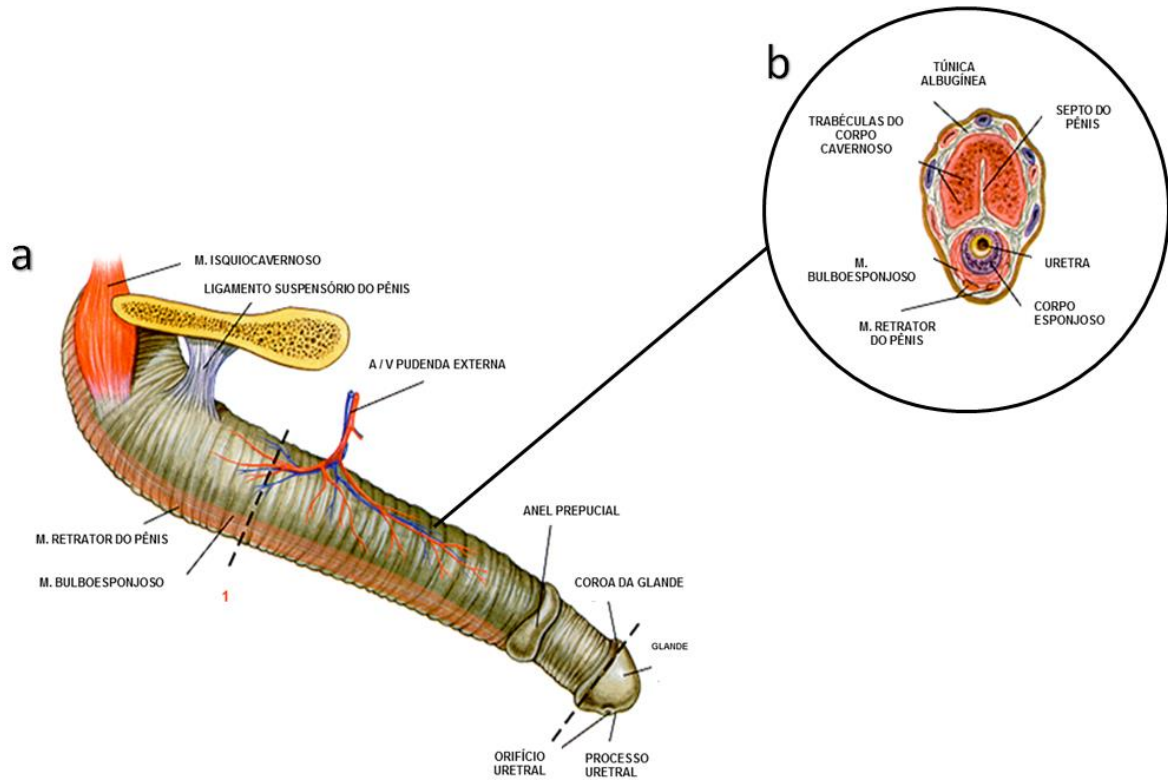


Figura 1. a: Anatomia do pênis do garanhão. **b:** Corte transversal do pênis do garanhão. (adaptado de RIEGEL & HAKOLA , 2004)

Os testículos são as gônadas masculinas, compostos pelo parênquima testicular formado por tecido intersticial (células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, tecido conjuntivo e nervos), túbulos seminíferos e “rete testis” (SENGER, 2005).

As células de Sertoli são encontradas no lúmen dos túbulos seminíferos, responsáveis pela espermatogênese e estimuladas pela ação do hormônio folículo estimulante (FSH) estas são conectadas pelas junções *gap* formando a barreira hematotesticular (SENGER, 2005; KLEIN, 2014).

As células espermáticas ao atingirem a cabeça do epidídimo, são encaminhadas para o corpo e posteriormente cauda do epidídimo por contrações do músculo liso. No epidídimo, as células são armazenadas e adquirem sua capacidade de fertilizar (MCKINNON; VOSS, 1992; KLEIN, 2014). Durante o processo de ejaculação, os espermatozoides passam pelos ductos deferentes que desembocam na uretra pélvica, sendo assim, os mesmos serão eliminados juntamente com as secreções das glândulas sexuais acessórias durante a ejaculação (KLEIN, 2014).

O conjunto de glândulas sexuais acessórias é composto por ampola do ducto deferente, vesículas seminais, próstata e bulbouretrais e são responsáveis pela produção de fluido que será eliminado juntamente com os espermatozoides durante a ejaculação (MCKINNON; VOSS, 1992).

A ligação entre bexiga e processo uretral é denominado de uretra, na qual é revestida pelo músculo bulboesponjoso, e através de suas contrações irá conduzir a urina bem como o sêmen durante a ejaculação (ENGLAND, 2005).

2.2. Anatomofisiologia da célula espermática

O espermatozoide é uma célula altamente especializada com função de fertilizar e transferir o genoma masculino (VARNER et al., 2015).

Na espécie equina a cabeça do espermatozoide possui formato oval e alongado, é responsável pelo armazenamento do material genético possui no seu interior a cromatina condensada composta de ácido desoxirribonucleico (DNA) (GADELLA et al., 2001; TOSHIMORI; ITO, 2003; RUIZ-PESINI et al., 2007).

O acrossoma consiste em revestimento de camada dupla responsável pela penetração do espermatozoide no oócito pela liberação de enzimas hidrolíticas. Na espécie equina, o acrossoma corresponde a 2/3 da dimensão da cabeça do espermatozoide (BRITO, 2007; VARNER et al., 2015).

A cauda é responsável pelo movimento da célula, e é dividida em peça principal e terminal. Sua porção inicial é composta pela bainha fibrosa na qual envolve 9 fibras densas, 9 pares de microtúbulos periféricos conectados por dineínas e um par central de microtúbulos. O movimento da célula é gerado pelo deslocamento dos microtúbulos, desencadeado pelo consumo energético das dineínas, energia esta gerada pela hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) (BRITO, 2007; RUIZ-PESINI et al., 2007).

A peça intermediária é responsável pela produção de energia para movimentação da célula espermática, e estruturalmente é semelhante a peça principal da cauda se diferenciando apenas pela ausência da bainha fibrosa e na presença de uma bainha mitocondrial, que contém mitocôndrias como unidades formadoras de energia (GADELLA et al., 2001; VARNER et al., 2015).

A célula espermática possui uma membrana que a reveste completamente (DOWSETT et al., 1984; PESCH; BERGMANN, 2006; VARNER et al., 2015), que dispõe de uma bicamada fosfolipídica, composta por ácidos graxos saturados e insaturados unidos a grupamentos fosfato (ROBERTSON, 1981). Esta disposição permite as células uma extremidade polar hidrofílica, assim como, um centro polar hidrofóbico, conferindo uma impermeabilidade à maioria dos solutos polares (OLIVEIRA et al., 2013; NELSON; COX, 2014).

As proteínas presentes nas membranas podem ser integrais ou periféricas, e desempenham algumas funções tais como, transporte de substâncias entre meio interno e externo, atividade metabólica com função enzimática, reconhecimento celular e permitem ligações entre as células (ROBERTSON, 1981; OLIVEIRA et al., 2013).

Num contexto geral, a membrana plasmática é responsável pela manutenção da homeostase celular e suas organelas, requisito essencial para a sobrevivência e manutenção do potencial de fertilização das células espermáticas, sendo a integridade funcional das membranas dos espermatozoides considerada imprescindível para os processos de capacitação, reação acrossomal e adesão ao oócito (FLESCH; GADELLA, 2000).

2.3. Hemospermia em ganhões

A hemospermia é definida como presença de sangue no ejaculado e é consequência de uma afecção originada de qualquer local do trato reprodutor masculino (TURNER et al., 2016). A origem do sangue no sêmen dos ganhões pode se apresentar em diversos locais, comumente decorrente das lesões do processo uretral, uretra e em casos de vesiculite seminal crônica levando aumento da vascularização da glândula devido ao processo inflamatório e, conseqüentemente no momento da ejaculação, haverá presença de sangue (TURNER et al., 2011).

Apesar de casos de hemospermia não serem usuais, esta enfermidade tem sido relatada por diversos autores (BEDFORD et al., 2000; ANDRADE JR et al., 2016; TURNER et al., 2016).

2.3.1. Etiopatogenia

Para uma avaliação de um garanhão, ou seja, realização de um exame andrológico afim de diagnosticar alguma enfermidade, é necessário que se saiba a localização, forma e tamanho de cada órgão do sistema reprodutor do garanhão (SAMPER & TIBARY, 2006).

Em alguns casos há comunicação entre os corpos esponjosos do pênis e o lúmen uretral no momento da ejaculação o sangue será transferido para a uretra e liberado juntamente ao sêmen (SCHUMACHER et al., 1995). As principais causas de hemospermia incluem epididimite, vesiculite seminal, fissuras no processo uretral, na glândula do pênis, fístulas uretrais, estenose uretral, neoplasias, lesões provocadas pelo *Habronema spp* e obstrução das ampolas dos ductos deferentes (BLANCHARD, 1987; SOJKA et al., 1985; BEDFORD et al., 2000).

Dentre os locais mais comuns para ocorrência de lesões traumáticas destaca-se o processo uretral principalmente no momento da cópula, na qual pode ocorrer laceração do mesmo pelo fio de crina da cauda da fêmea (VARNER et al., 2000).

Animais que possuem lesões provocadas por habronemose cutânea apresentam um quadro secundário de processo inflamatório principalmente na região da glândula do pênis, o que propicia o aumento da vascularização durante a ejaculação e a eliminação de sangue no ejaculado de garanhões (LOVE et al., 1992). Em casos de obstrução das ampolas dos ductos deferentes, a presença do sangue no ejaculado pode ser subsequente à desobstrução das glândulas podendo ser resultado de lesão do órgão (MCKINNON, 1992).

As causas infecciosas de hemospermia são: vesiculite seminal bacteriana, uretrite e epididimite (VARNER et al., 1991; LOVE et al., 1992; VOSS & PICKETT, 1975). Essas enfermidades podem levar a lesões ulcerativas da pele do pênis e causar sangramentos durante a cópula, sendo os agentes infecciosos mais comumente encontrados em casos de uretrite e vesiculite seminal bacteriana: *Streptococcus spp*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (SULLINS et al., 1988). Além disso o Herpesvírus equino pode provocar lesões na superfície da pele do pênis e sangrar facilmente durante a cópula ou coleta do sêmen com vagina artificial (GALOSI et al., 1998).

2.3.2. Sinais Clínicos

A hemospermia é consequência de alguma enfermidade do trato reprodutor do garanhão e para determinar a causa é necessário que se utilize ferramentas que permitam investigar todas as prováveis suspeitas. Na sua grande maioria os garanhões não apresentam dor durante a ereção e/ou na ejaculação (SULLINS et al., 1988), entretanto em alguns casos de vesiculite seminal podem ocorrer distúrbios ejaculatórios (SANCLER-SILVA, 2014).

A gravidade da lesão depende da causa inicial, e a presença de sangue pode variar entre os ejaculados, sendo assim, há a necessidade de múltiplas coletas de sêmen para detectar o problema (SCHUMACHER et al., 1995). Desta forma, o tempo de avaliação do garanhão deve ser levado em consideração, uma vez que animais que se encontram em repouso e/ou descanso sexual podem mascarar a alteração devido à ausência de sangue nas primeiras ejaculações, sendo necessárias coletas repetidas em um intervalo curto de dias (TURNER, 2011).

2.3.3. Diagnóstico

Caso haja suspeita de hemospermia o sêmen deverá ser coletado por vagina artificial e examinado de acordo com a coloração. Tanto a hemospermia severa, como a moderada, são diagnosticadas pelo aspecto da amostra, entretanto para hemospermia leve é necessário um exame microscópico para identificar a presença de células vermelhas entremeadas às células espermáticas. Devido a homogeneidade entre as células espermáticas e hemácias é necessário realizar uma coloração descrita por (SEGABINAZZI et al., 2015) para identificação das hemácias nos ejaculados.

2.3.3.1. Ultrassonografia

Quando as lesões externas não são identificadas como fonte do sangramento é necessário lançar mão de técnicas de diagnóstico que permitam a visualização do trato reprodutor masculino interno (TURNER, 2011). A palpação e a ultrassonografia dos testículos, epidídimo e funículo espermático podem revelar importantes alterações nos órgãos em questão (MALMGREN ; SUSSEMILCH, 1992). Do mesmo modo, a palpação transretal e a ultrassonografia permitem um exame profundo das glândulas sexuais acessórias e identificação de possíveis alterações, como por exemplo obstrução das glândulas ampolares, assim como processo inflamatório nas glândulas vesiculares (BLANCHARD & VARNER,1992).

2.3.3.2. Endoscopia

Videoendoscópios flexíveis ou de fibra óptica podem ser utilizados para exame completo do trato urogenital de garanhões (TIBARY, 2007; SCHUMACHER & VARNER, 2008; CHENIER, 2009; MENZIES-GOW, 2011), podendo identificar uretra peniana, pélvica, glândula vesicular e bexiga urinária (BALL, 2008).

A mucosa uretral se apresenta de coloração rósea pálida, contém dobras longitudinais e sua aparência é semelhante à do esôfago (BERTONE, 1998).

2.3.3.3. Coleta fracionada

A ejaculação e ereção no garanhão são controladas pelas vias aferentes e eferente provenientes da inervação da medula espinhal. A ereção ocorre a partir do relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos e esponjosos em associação com o aumento do fluxo sanguíneo arterial para o pênis (MCDONNEL, 1992). Durante a cópula há aumento da atividade da musculatura regulado por estímulos nervosos do sistema nervoso autônomo parassimpático para corpos cavernosos e esponjosos e estímulos somáticos para isquiocavernoso e bulboesponjoso (SCHUMACHER;

RIDDELL, 1986). O processo ejaculatório no garanhão tem como característica a presença dos jatos divididos de acordo o momento da ejaculação, sendo eles, a porção da secreção das glândulas sexuais acessórias bulbouretrais e próstata, epidídimo e ampolas dos ductos deferentes e fração final das vesículas seminais (MCDONNELL, 1992).

Após a identificação de sangue no ejaculado de garanhões o exame físico da superfície externa do pênis, fossa uretral e processo uretral devem ser realizados no órgão antes e após a ereção. Caso não haja identificação das lesões, uma ferramenta útil para diagnosticar a causa do problema é a coleta do sêmen com o fundo da vagina artificial aberta, na qual a glândula do pênis irá se projetar e permitindo a visualização da mesma durante a ejaculação (VARNER et al., 2000). Outra alternativa corresponde a coleta fracionada descrita por Oliveira (2016), na qual permite a interrupção dos jatos e separação dos mesmos com auxílio de pinças durante a ejaculação. Portanto, se todos os jatos apresentarem coloração avermelhada é sugestivo de hemospermia por alterações na uretra e/ou testiculares, mas, se apenas a última fração das glândulas vesiculares estiverem na coloração avermelhada provavelmente um processo infeccioso sugestivo de hemospermia devido a vesiculite seminal.

2.3.4. Tratamentos

A abordagem para um tratamento adequado depende da origem do problema. Em alguns casos de hemospermia preconiza-se o repouso sexual do garanhão, como em lesões traumáticas de uretra e processo uretral. No entanto, o garanhão pode apresentar o quadro clínico no retorno à atividade reprodutiva. Além de que, alguns garanhões realizam a masturbação, que consiste na ereção e em movimentos consecutivos do pênis no abdômen (SULLINS et al., 1988). O método utilizado para impedir a masturbação em garanhões é agressivo; o emprego de tarraxas no abdômen, sendo assim, agravando o quadro clínico do animal principalmente em casos de alterações de processo uretral (MCDONNELL et al., 1991).

Em casos de fístula uretral e/ou uretrite é indicada a cauterização química da lesão de acordo com o tratamento proposto por Silva-Junior et al. (2016), que consiste na

endoscopia para se obter diagnóstico diferencial para vesiculite seminal. Após o diagnóstico da origem do sangramento, é realizado tratamento local com policresuleno a 4% em três aplicações de 100 mL com intervalo de 24 horas. Para acesso a uretra peniana, é utilizada uma pipeta flexível para inseminação de sêmen congelado, na qual é introduzida completamente e em seguida é administrado o volume do medicamento com a bispnaga para inseminação artificial, no momento de aplicação do fármaco a pipeta é retirada lentamente e o processo uretral é ocluído de forma manual para deixar o líquido em contato com a lesão por cinco minutos. Após esse período, o processo uretral é desocluído e líquido eliminado (figura 2).

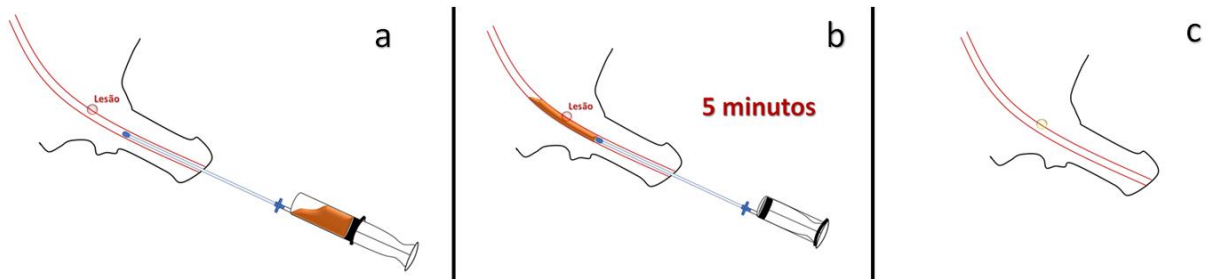


Figura 2. Esquematização do tratamento de fístula uretral através de cauterização química. **a:** Introdução da pipeta flexível até o local da lesão. **b:** Deposição do policresuleno a 4% na uretra e deixar agir por 5 minutos. **c:** Remoção do agente caustico. (Autoria própria).

Em lesões na uretra pélvica, o mesmo procedimento citado anteriormente é realizado, no entanto, utiliza-se o endoscópio para acessar o local da lesão. Uma outra alternativa corresponde ao método cirúrgico de uretrotomia subisquial que consiste em realizar uma fístula temporária na uretra de 4 semanas, podendo se estender até 6 semanas com a finalidade de diminuir a pressão do corpo esponjoso no momento final da ejaculação (SCHUMACHER et al., 1995; SULLINS et al., 1988; LAVERTY et al., 1992). Segundo Blanchard (1987), em garanhões que apresentam grau de hemospermia leve e estão em época de estação de monta é indicada a introdução de diluente a base de leite desnatado no útero das éguas previamente a monta, com intuito de diminuir a contaminação, entretanto, em casos de hemospermia severa, a diluição do sêmen no útero não reduz o grau de contaminação.

Em relação ao tratamento para vesiculite seminal, devem-se levar em consideração alguns fatores que são cruciais para o sucesso, tais como, a biodisponibilidade dos fármacos e baixa vascularização das glândulas vesiculares dificultando que a maioria dos antibióticos atinjam o órgão acometido com uma concentração inibitória mínima adequada para debelar o agente etiológico (SAMPER & TIBARY, 2006; CHENIER, 2009; MIRAGAYA et al., 2011; TIBARY & RODRIGUEZ, 2011; VARNER et al., 2011). De acordo com Varner e Schumacher (2011), a lavagem direta do lúmen glandular e infusão de antimicrobianos é o tratamento de eleição, entretanto são necessárias repetições diárias de no mínimo cinco dias consecutivos.

Sancler-Silva (2014) realizou o tratamento local da vesiculite seminal e avaliou a influência deste na qualidade seminal, e foi relatado que a conduta terapêutica adotada melhorou os parâmetros seminais de cinética e integridade de membrana plasmática no sêmen fresco, refrigerado e congelado após uma semana do tratamento, mas o mesmo não foi observado após um mês do início do tratamento, devido a recidiva da enfermidade.

2.3.5. Influência do sangue na qualidade do sêmen equino

Os prejuízos no programa de reprodução assistida devido a hemospermia são altos, uma vez que os garanhões acometidos apresentam queda na fertilidade ou infertilidade (TURNER et al., 2016).

Em humanos (ELEY et al., 2005; SATTA et al., 2006; VIGNERA et al., 2011) e equinos (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009; FENNEL et al., 2010), a presença de bactérias e leucócitos proporcionam o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS) e produção de citocinas pró-inflamatórias, afetando a integridade de membranas, função mitocondrial e integridade de DNA, levando ao aumento de marcadores de apoptose na célula espermática, redução da motilidade e consequentemente queda na taxa de fertilidade.

Os mecanismos pelo qual a presença do sangue afeta a qualidade seminal e por consequência as taxas de concepção não estão elucidados. Em um estudo realizado por Turner et al. (2016), no qual comparou-se as taxas de fertilidade do ejaculado na

presença de sangue contendo 5%, 50% v/v e na ausência de sangue, foi verificada a redução das taxas de concepção para o grupo 50 %, tal fato pode ser justificado pela formação de coágulos e aglutinações dos espermatozoides, impedindo a movimentação dos mesmos no trato reprodutor da fêmea.

De acordo com Voss (1976), o responsável pela queda na fertilidade é a série vermelha do sangue. Neste estudo 50% das éguas inseminadas com o ejaculado acrescido da série branca do sangue (soro) ficaram gestantes em contrapartida, apenas 7,7% das éguas inseminadas com sêmen na presença de sangue total obtiveram o concepto. Andrade Jr et al. (2016) demonstraram que ejaculado contaminado com até 5% v/v de sangue total não há influência nas taxas de fertilidade.

2.4. Separação espermática por gradiente de densidade

Nos casos em que garanhões apresentam um alto índice de células morfológicamente anormais é necessário o uso de tecnologias que proporcionem uma maximização do uso do sêmen, com objetivo de obter resultados satisfatórios no momento da inseminação artificial. Um protocolo recente utilizado por (MILES et al., 2013), envolve a utilização de uma sílica como gradiente de seleção o Equipure™, que permite a retenção de espermatozoides com anormalidades morfológicas, obtendo uma população de células morfológicamente normais.

De acordo com Maziero et al. (2012), a centrifugação do sêmen equino em Equipure™ proporcionou aumento das taxas de motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos após 24 horas de refrigeração, o mesmo foi observado por Papa et al. (2012) quando utilizado sêmen descongelado.

Morrell et al. (2014) estudaram a diminuição da carga bacteriana no ejaculado de garanhões após a centrifugação em Androcoll, e observaram redução de até 90% das bactérias. No entanto, foi observado que a centrifugação em colóide reduz mas, não elimina a contaminação do ejaculado sendo necessário a adição de antibióticos ao diluente.

Papa et al. (2013) observaram que após a centrifugação do sêmen de garanhões com baixas taxas de recuperação embrionária em gradiente de densidade Equipure™

houve aumento no número de embriões (70%) para o grupo de seleção espermática em relação ao grupo controle (33%), mostrando que, a seleção de uma população de espermatozoides utilizando gradiente de densidade se mostrou uma técnica eficiente para o aumento da qualidade seminal assim como nos índices de fertilidade, para sêmen fresco e refrigerado.

2.4.1. Manipulação do sêmen na presença de sangue

Em alguns casos de hemospermia há recidivas e/ou quadro crônico da lesão, sendo assim, necessário utilização de técnicas alternativas para manipulação do sêmen destes ganhões.

Em estudo realizado por Ramires-Neto et al. (2013), foi demonstrado que o uso de uma membrana hidrofóbica sintética de 2µm de diâmetro (Sperm Filter[®]) e posterior centrifugação em gradiente de densidade (Equipure[™]), no processamento do sêmen de um ganhão com alta carga leucocitária devido a vesiculite seminal, obteve bons resultados no programa de inseminação artificial. Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, foi relatada superioridade dos valores de integridade da membrana plasmática para o sêmen filtrado em Sperm Filter[®] em relação ao não filtrado após 24 horas de refrigeração. Além disso, no mesmo estudo, o número de unidades formadoras de colônias foi menor para o grupo de sêmen diluído e filtrado na membrana hidrofóbica em relação ao sêmen diluído e puro, demonstrando que a membrana hidrofóbica foi eficaz na redução da carga bacteriana no primeiro grupo.

De acordo com Parrish et al. (1995) a execução da técnica “swin up” que consiste em selecionar células que estejam sem movimento se mostrou eficiente para separação de espermatozoides mortos e possivelmente para hemácias uma vez que, devido à ausência da mobilidade eritrocitária as mesmas ficariam sedimentadas e em contrapartida os espermatozoides móveis se encontravam na região superior.

Para Turner et al. (2016), em situações de altas concentrações de sangue no ejaculado de ganhões a fertilidade é comprometida devido a formação de coágulos e aglutinação dos espermatozoides, havendo a necessidade de adição de anticoagulantes na diluição.

Referências Bibliográficas

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J. L. Equine reproduction. Philadelphia: Saunders. 1993:715-745.

ANDRADE JUNIOR, L. R. P.; ANDRADE, L. R. P.; ARAUJO, E. A. B.; OLIVEIRA, S. N.; SILVA, L. F. M. C.; DALANEZI, F. M.; CARNEIRO, J. A. M.; GUASTI, P. N.; RODRIGUES, L. T.; SOUZA, F. F.; PAPA, P. M.; FREITAS DELL'AQUA, C. P.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Fertility of blood-contaminated stallion semen prepared by density gradient centrifugation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF STALLION REPRODUCTION, 7th.; Urbana, Illinois: Elsevier, 2016 p. S75.

AVANZI, B. R.; RAMOS, R. S.; NICHI, M.; FIORATTI, E. G.; DELL'AQUA JR, J. A.; WECHSLER, F. S.; PAPA, F. O. Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.2, p.226-238, 2011.

BALL, B. A. Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: A Review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.11, p.650-655, 2008.

BEDFORD, S. J.; MCDONNELL, S. M.; TULLENERS, E.; KING, D.; HABECKER, P.; Squamous cell carcinoma of the urethral process in a horse with hemospermia and self-mutilation behavior. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, p.216-551, 2000.

BERTONE, J. J. Urinary Tract Endoscopy of Horse. In: **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v.44, p.298-299, 1998.

BLANCHARD, T. L. Use of a semen extender containing antibiotics to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Theriogenology**, v.28, p.541, 1987.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Stallion management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.8, p.205-218, 1992.

BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.249-264, 2007.

CHENIER, T. S. Anatomy and physical examination of the stallion, In: **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**, J. SAMPER, W. B. 2nd Ed. Saunders, Philadelphia, 2009.

ELEY, A.; HOSSEINZADEH, S.; HAKIMI, H.; GEARY, I.; PACEY, A. A. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by coincubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. **Human Reproduction**, v.20, p.2601–2607, 2005.

ENGLAND, G. C. (2005): The normal stallion. In.: *Fertility & Obstetrics in the Horse*. Blackwell, Oxford, p.200- 225.

FENNEL, L. C; MCKINNON, A. O; SAVAGE, C. J. Cryopreservation of semen from a stallion with seminal vesiculitis. **Equine Veterinary Education Equine**, v.22, n.5, p.215-219, 2010.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.197-235, 2000.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F.; STOUT, T. A.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249-265, 2001.

GALOSI, C. M.; ECHEVERRÍA, M. G.; VILA ROZA, M. V.; CID DE LA PAZ, V.; OLIVA, G. A.; ETCHEVERRIGARAY, M. E. Virus herpes equino tipo 1 (ehv-1): Patrones de estricción de adn, perfiles proteicos y estudio de patogenicidad en ratones. **Analecta Veterinaria**, v.18, p.35-40, 1998.

GUERRA, P. J. Brasil tem o quarto maior rebanho equino do mundo, com 5,8 milhões de cabeça. Notícia 16/03/2010. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/portal/noticia.php?cod=606>. Acesso em: 04 de janeiro de 2017.

HAFEZ, E. S. **Reprodução Animal**, 7.ed., São Paulo: Manole, 2004. 513p.

KLEIN, B. G. Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, 451p.

LAVERTY, S.; PASCOE, JR.; LING, G. V.; LAVOIE, J. P.; RUBY, A. L. Urolithiasis in 68 horses. **Veterinary Surgery**, v.21, p.56–62, 1992.

LOVE, C. C.; RIERA, F. L.; ORISTAGLIO, R. M. Sperm occluded (plugged) ampullae in the stallion. In: PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1992, p.117–125.

MALMGREN, L.; SUSSEMILCH, B. I. Ultrasonography as a diagnostic tool in a stallion with seminal vesiculitis: A case report. **Theriogenology**, v.37, n.4, p.935-938. 1992.

MAZIERO, R. R. D.; PAPA, P. M.; HARTWIG, F. P.; LISBOA, F. P.; DELL AQUA JR, J. A.; ALVARENGA, M. A.GUASTI, P. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PAPA, F. O.

Effects of single layer density gradient centrifugation on cooled-stored stallion semen In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF STALLION REPRODUCTION, 6th.; Viena: Elsevier, 2012 p.496.

MCDONNELL, S. M.; HENRY, M.; BRISTOL, F.; Spontaneous erection and masturbation in equids. In: Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Reproduction, 1991, p.664–665.

MCDONNELL, S. M. Ejaculation physiology and dysfunction. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.81, n.11, 1992.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction, Lea and Febiger, Philadelphia, London. 1992.

MENZIES-GOW, N. Diagnostic endoscopy of the urinary tract of the horse. **Equine Practice**, v.29, p.208-213, 2011.

MILLER, C. D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. **Theriogenology**, v.70, p.463-468, 2008.

MILLES, J. I.; AMSTALDEN, M.; GOLDING, M. C.; VOGELSANG, M. M. Use of Equipure with semen from subfertile stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.321-399, 2013.

MIRAGAYA, M. H.; PINTO, M. R.; NEILD, D. M. Muestreo y lavage de glândulas vesiculares en el padrillo. In: **II Congress on Equine Reproduction**, p.71-72, 2011.

MORREL, J. M.; KLEIN, C.; LUNDEHEIM, N.; EROL, E.; TROEDSSON, M. H. T. Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. **Animal Reproduction Science**, v.145, p.47-53, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios da Bioquímica**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, p.1298.

OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, B. M. M.; CALEGHINI, E. C. C.; FERNANDES, C. B.; MATTOS, C. B. Criopreservação do semen equino: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, p.23-28, 2013.

OLIVEIRA, S. N. Efeito da colheita fracionada sobre a cinética e viabilidade espermáticas do sêmen refrigerado e congelado de garanhões. 2016. 103 f. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal, Botucatu, 2016.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; MURIEL, A.; MACIAS-GARCIA, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; ALONSO, J. M.; PENA, F. J. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.518–522, 2009.

PAPA, F. O.; CARMO, M. T.; PAPA, P. M.; DELL AQUA JR, J. A.; ALVARENGA, M. A. Effect of density gradient selection on embryo recovery rates of fresh and cooled stallion semen In: INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY, 39th ; Hannover, 2013 p. 227.

PAPA, P. M.; MAZIERO, R. R. D.; HARTWIG, F. P.; LISBOA, F. P.; DELL AQUA JR, J. A.; ALVARENGA, M. A.; GUASTI, P. N.; PAPA, F. O. Effect of density gradient on sperm parameters of stallion frozen semen In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF STALLION REPRODUCTION, 6th.; Viena: Elsevier, 2012 p. 505.

PARRISH, J. J; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, p.860-869, 1995.

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

RAMIRES-NETO, C. R.; MONTEIRO, G. A.; SOARES, R. F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA, J. A; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Effect of removing seminal plasma using a sperm filter on the viability of refrigerated stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.40-43, 2013.

RIEGEL, R. J.; HAKOLA, E. S. The Illustrated Atlas of Clinical Equine Anatomy and Common Disorders of the Horse, **Equistar Publications**, v.2, Marysville, Ohio, 2004.

ROBERTSON, J. D. Membrane structure. **The Journal of Cell Biology**, v.91, p.189-204, 1981.

RUIZ-PESINI, E.; DIEZ-SANCHEZ, C.; LOPEZ-PEREZ, M. J.; ENRIQUEZ, J. A. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? **Current Topics in Developmental Biology**, v.77, p.3-19, 2007.

SANCLER-SILVA, Y. F. R. Efeito do tratamento local de vesiculite seminal sobre a qualidade e longevidade do sêmen equino. 2014. 124 f. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal, Botucatu, 2014.

SACK, W. O; HACKETT, M. S. **Rooney's Guide to the Dissection of the Horse**, Veterinary Textbooks, New York, 2001.

SAMPER, J.; TIBARY, A. Disease transmission in horses. **Theriogenology**. v.66, p.551-559, 2006.

SAMPER, J. C. Equine Breeding Management and Artificial Insemination. 2nd. Ed. Missouri: Saunders, 2009, 212p.

SATTA, A.; STIVALA, A.; GAROZZO, A.; MORELLO, A.; PERDICHIZZI, A.; VICARI, E.; ALMERI, M.; CALOGERO, A. E. Experimental Chlamydia trachomatis infection causes apoptosis in human sperm. **Human Reproduction**, v.21, p.134–137, 2006.

SCHUMACHER, J.; RIDDELL, M. G. Collection of stallion semen without a mount . **Theriogenology**, v.26, n.2, 1986.

SCHUMACHER, J.; VARNER, D. D.; SCHMITZ, D. G.; BLANCHARD, T. L. Urethral defects in geldings with hematuria and stallions with hemospermia. **Veterinary Surgery**, v.24, p.250–254, 1995.

SCHUMACHER, J. J; VARNER, D. D. Surgery of the penis and prepuce. In: **Equine Reproduction**, MCKINNON, A. O; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. 2nd, Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, PA. 2008.

SEGABINAZZI, L. G.; SILVA, L. F. M. C.; ARAUJO, E. A. B.; OLIVEIRA, S. N.; ANDRADE JUNIOR, L. R. P.; DALANEZI, F. M.; DELL'AQUA, C.P.F; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Modificación de la técnica por panoptico para la evaluación morfológica de espermatozoides equinos. In: Primer Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal, 1°. Buenos Aires: Solara, 2015 p. 517-520.

SENGER, P. L. Pathways to Pregnancy and parturition. 2nd. Ed. Pullman: Current Conceptions, 2005. 373 p.

SILVA-JUNIOR, E. R.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; CAMPOS, G. A.; SOUZA, A. K.; NAKASATO, N. G.; PINTO, B. M.; PAPA, F. O. Uretrite em um Garanhão - Relato de Caso. In: XVII CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 17^o.; Campos do Jordão, 2016 p. 437.

SOJKA, J. E.; CARTER, G. K. Hemospermia and seminal vesicle enlargement in a stallion. **Compendium Continuing Education Practising Veterinarian**, v.7, p.587–588, 1985.

SULLINS, K. E.; BERTONE, J. J.; VOSS, J. L.; PEDERSON, S. J. Treatment of hemospermia in stallions: A discussion of 18 cases. **Compendium Continuing Education Practising Veterinarian**, v.10, p.1396–1403, 1988.

TIBARY, A. Endoscopy of the reproductive tract in the stallion. In: **Current Therapy in Equine Reproduction**. SAMPER, J. C; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. 1st Ed, Saunders, Philadelphia, PA. 2007.

TIBARY, A.; RODRIGUEZ, J. S. Causas e Manejo de lãs subfertilidad em padrillos. In: **II Congresso on Equine Reproduction**, p.55-69, 2011.

TOSHIMORI, K.; ITO, C. Formation and organization of the mammalian sperm head. **Archives of Histology and Cytology**, v.66, p.383-396, 2003.

TURNER, R. M. O. Abnormalities of the ejaculate. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2nd. Ed Willey-Blackwell, 2011, cap.108, p.1119-1129.

TURNER, C. E.; WALBORNN, S. R.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; BRINSKO, S. P.; LACAZE, K. A.; TEAGUE, S. R.; LOVE, C. C. The effect of two levels of hemospermia on stallion fertility. **Theriogenology**, v.86, p.1399-1402, 2016.

VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; BLANCHARD, T.; JOHNSON, L. DISEASES AND MANAGEMENT OF BREEDING STALLIONS. Goleta, CA: American Veterinary Publications, 1991.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; TAYLOR, T. S.; JOHNSON, L. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. **Animal Reproduction Science**, p.493–509, 2000.

VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J. Abnormalities of the accessory sex glands. In: **Equine Reproduction**. MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. 2nd Ed. Willey-Blackwell, 2011, cap.107, p.1113-1118.

VARNER, D. D.; TAYLOR, T. S.; BLANCHARD. T. L. Seminal Vesiculitis. In: **Equine Reproduction**. MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. 2nd Ed. Willey-Blackwell, 2011.

VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v.47, p.16-24, 2015.

VIGNERA, S.; VICARI, E.; CONDORELLI, R. A.; D'AGATA, R.; CALOGERO, D. A. E. Male accessory gland infection and sperm parameters (review). **International Journal of Andrology**, v.34, p.330–347, 2011.

VOSS, J. L.; PICKETT B. W. Diagnosis and treatment of hemospermia in the stallion. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.23, p.151–154, 1975.

VOSS, J. L.; PICKETT, B. W.; SCHIDELER, R. K. The effect of hemospermia on fertility in horses. **Proceedings of 8th ICAR**, v.1, p.271, 1976.

HIPÓTESE

A manipulação do sêmen com hemospermia pode ser utilizado em programas de reprodução assistida.

OBJETIVOS

- . Avaliar in vitro a viabilidade espermática do ejaculado refrigerado na presença de sangue total ou manipulado pela centrifugação com gradientes de densidade.
- . Avaliar a taxa de fertilidade das amostras na presença de sangue total ou manipulado pela centrifugação com gradientes de densidade para sêmen fresco e refrigerado.
- . Avaliar o efeito da diluição sobre a cinética e a fertilidade das amostras com alta concentração de sangue total.

CAPÍTULO 2

ARTIGO I – HEMOSPERMIA EM GARANHÕES

Artigo submetido à Revista Veterinária e Zootecnia ISSN 0102-5716, ranqueada como B3 pelo QUALIS – CAPES de 2015.

RESUMO

Métodos de processamento espermático são rotineiramente utilizados para otimização do sêmen de garanhões. As biotecnologias aplicadas a reprodução permitem que animais geneticamente superiores disseminem suas características. Apesar disso, mesmo em garanhões clinicamente saudáveis, o sêmen criopreservado possui taxas de fertilidade inferiores quando comparado ao sêmen fresco, em decorrência do estresse químico e físico gerados pela preservação através do frio. Tal condição pode ser intensificada em animais que apresentam alterações no trato reprodutivo que comprometam a qualidade seminal, como por exemplo, a presença de sangue no ejaculado, denominado hemospermia. Esta afecção geralmente é observada em decorrência de lesões na uretra, processo uretral, pênis e vesícula seminal. O efeito dos componentes sanguíneos sobre a qualidade do sêmen ainda não está bem estabelecido. Diante disso objetivou-se com o presente estudo referenciar as principais causas assim como, tratamentos e efeitos da presença do sangue no ejaculado de garanhões.

Palavras-chave: equino, sangue, ejaculado, sêmen

HEMOSPERMIA IN STALLIONS

ABSTRACT

Sperm processing methods are routinely used for stall optimization of stallions. Reproductive biotechnology allows genetically superior animals to disseminate their characteristics. Nevertheless, even in clinically healthy stallions, cryopreserved semen has lower fertility rates when compared to fresh semen, due to the chemical and physical stress generated by cold preservation. This condition may be intensified in animals that present changes in the reproductive tract that compromise seminal quality, such as the presence of blood in the ejaculate, called hemospermia. This condition is usually observed due to lesions in the urethra, urethral process, penis and seminal vesicle. The effect of blood components on semen quality is still not well established. In view of this, the present study aimed to identify the main causes as well as treatments and effects of the presence of blood in the ejaculate of stallions.

Keywords: equine, blood, ejaculate, semen

HEMOSPERMIA EN SEMENTAL

RESUMEN

Los métodos de procesamiento espermático se utilizan rutinariamente para optimizar el semen de sementales. Las biotecnologías aplicadas a la reproducción permiten que los animales genéticamente superiores diseminen sus características. A pesar de ello, incluso en los sanos clínicamente sanos, el semen criopreservado tiene tasas de fertilidad inferiores en comparación con el semen fresco, debido al estrés químico y físico generado por la preservación a través del frío. Esta condición puede ser intensificada en animales que presentan alteraciones en el tracto reproductivo que comprometen la calidad seminal, como por ejemplo, la presencia de sangre en el eyaculado, denominado hemospermia. Esta afección generalmente se observa como consecuencia de lesiones en la uretra, proceso uretral, pene y vesícula seminal. El efecto de los componentes sanguíneos sobre la calidad del semen todavía no está bien establecido. Ante esto se objetivó con el presente estudio referenciar las principales causas así como, tratamientos y efectos de la presencia de la sangre en el eyaculado de sementales.

Palabras claves: equino, sangre, eyaculación, semen

INTRODUÇÃO

O rebanho de equinos do Brasil está classificado como sendo o quarto maior do mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos, China e México, e movimenta anualmente mais de R\$ 7,0 bilhões e 642 mil empregos (1).

Há mais de meio século as biotecnologias de criopreservação do sêmen de bovinos são utilizadas comercialmente com êxito, proporcionando um grande avanço na espécie neste quesito. Na reprodução de equinos a seleção genética relacionada à qualidade dos espermatozoides, em especial, resistência destes ao processo de refrigeração e congelamento, esteve ausente durante anos (2). Desta forma, faz-se necessário o aprimoramento das biotecnologias aplicadas ao sêmen do garanhão, a exemplo refrigeração e congelamento, de modo a promover um avanço para equinocultura, otimizando a qualidade do ejaculado dos garanhões.

Na espécie equina a biotecnologia mais utilizada é a refrigeração, porém o uso do sêmen congelado vem crescendo cada vez mais, proporcionando a disseminação do material genético de animais superiores, sem interferência de localização, além de preservar as células espermáticas por tempo indeterminado (3). Entretanto, durante o processo de criopreservação os espermatozoides sofrem danos em decorrência da preservação pelo frio, situação esta agravada em garanhões que possuam alguma enfermidade no trato reprodutivo, como a hemospermia, que é caracterizada pela presença de sangue no ejaculado.

As causas de hemospermia em garanhões estão relacionadas a presença de lesões no trato reprodutivo masculino, desde o epidídimo até o processo uretral. Lesões no processo uretral e uretra, e as enfermidades de carcinoma de células escamosas e vesiculite seminal podem ser apontadas como principais causas de hemospermia. A idade em que os animais apresentam o quadro clínico pode ser variável (4). A presença de hemácias no ejaculado possivelmente não afetaria a cinética e morfologia espermática, no entanto, há redução da fertilidade de garanhões com hemospermia (5). O objetivo do presente estudo é revisar as causas de hemospermia em garanhões, assim como, possíveis tratamentos de acordo com a lesão apresentada.

REVISÃO DE LITERATURA

Anatomia do sistema reprodutor do macho

Para a formação e deposição do sêmen no trato reprodutor da fêmea é necessário uma interação entre as estruturas anatómicas do sistema reprodutor masculino (6). Dentre as partes que o compõe estão um par de testículos que se encontram dentro da bolsa testicular, músculo cremaster, epidídimos, ductos deferentes, pênis e glândulas sexuais acessórias compostas por ampolas dos ductos deferentes, vesículas seminais, próstata e bulbouretrais (4,6).

O pênis ou órgão copulador no garanhão possui a particularidade de ser do tipo músculo cavernoso, dividido em base, corpo e glande (7). Quando em ereção os espaços cavernosos, como corpo esponjoso da glande, corpo esponjoso do pênis, que envolve a uretra, aumentam de volume devido ao preenchimento por sangue carregado pelos estímulos nervosos através das vias eferentes dos ramos arteriais do pudendo e obturador (figura 1) (6,8,9).

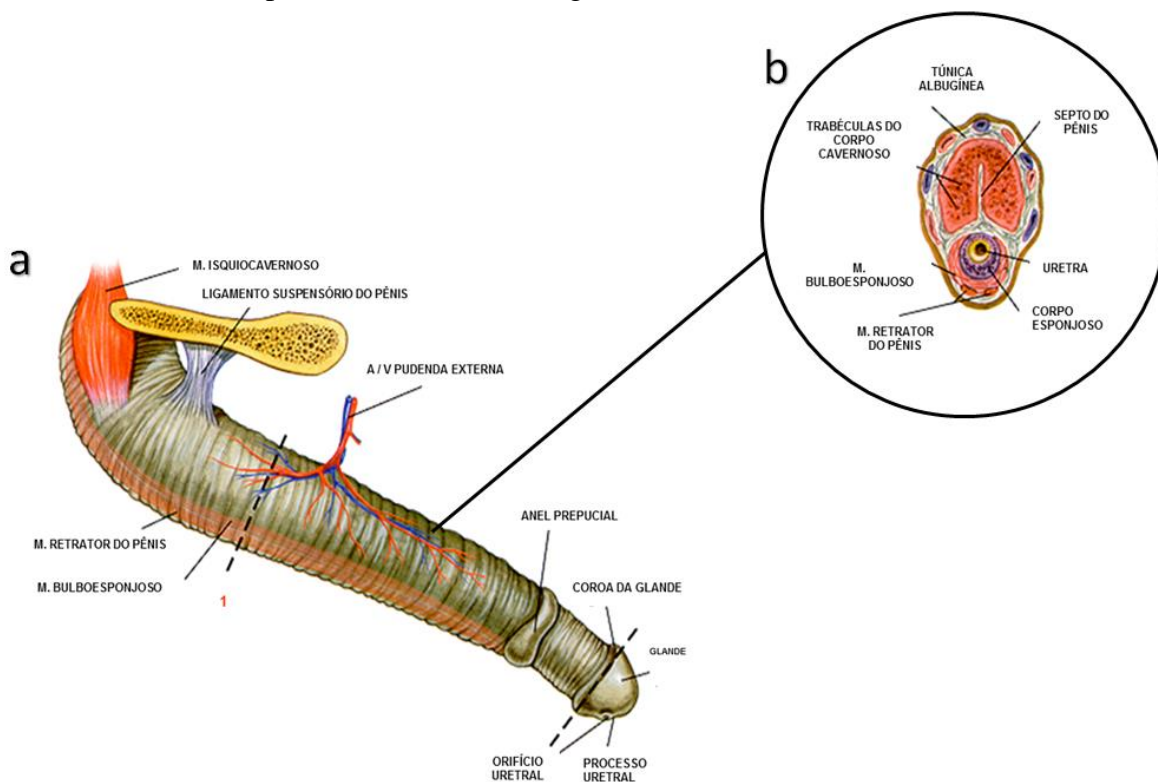


Figura 1. a: Anatomia do pênis do garanhão. **b:** Corte transversal do pênis do garanhão. (adaptado de RIEGEL & HAKOLA , 2004)

Os testículos são as gônadas masculinas, compostos pelo parênquima testicular formado por tecido intersticial (células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, tecido conjuntivo e nervos), túbulos seminíferos e “rete testis” (10).

As células de Sertoli são encontradas no lúmen dos túbulos seminíferos, responsáveis pela espermatogênese e estimuladas pela ação do hormônio folículo estimulante (FSH) estas são conectadas pelas junções *gap* formando a barreira hematotesticular (6,10).

As células espermáticas ao atingirem a cabeça do epidídimo, são encaminhadas para o corpo e posteriormente cauda do epidídimo por contrações do músculo liso. No epidídimo, as células são armazenadas e adquirem sua capacidade de fertilizar (4,6). Durante o processo de ejaculação, os espermatozoides passam pelos ductos deferentes que desembocam na uretra pélvica, sendo assim, os mesmos serão eliminados juntamente com as secreções das glândulas sexuais acessórias durante a ejaculação (6).

O conjunto de glândulas sexuais acessórias é composto por ampola do ducto deferente, vesículas seminais, próstata e bulbouretrais e são responsáveis pela produção de fluido que será eliminado juntamente com os espermatozoides durante a ejaculação (4).

A ligação entre bexiga e processo uretral é denominado de uretra, na qual é revestida pelo músculo bulboesponjoso, e através de suas contrações irá conduzir a urina bem como o sêmen durante a ejaculação (11).

Anatomofisiologia da célula espermática

O espermatozoide é uma célula altamente especializada com função de fertilizar e transferir o genoma masculino (12).

Na espécie equina a cabeça do espermatozoide possui formato oval e alongado, é responsável pelo armazenamento do material genético possui no seu interior a cromatina condensada composta de ácido desoxirribonucleico (DNA) (13-15).

O acrossoma consiste em revestimento de camada dupla responsável pela penetração do espermatozoide no oócito pela liberação de enzimas hidrolíticas. Na espécie equina, o acrossoma corresponde a 2/3 da dimensão da cabeça do espermatozoide (12,16).

A cauda é responsável pelo movimento da célula, e é dividida em peça principal e terminal. Sua porção inicial é composta pela bainha fibrosa na qual envolve 9 fibras densas, 9 pares de microtúbulos periféricos conectados por dineínas e um par central de microtúbulos. O movimento da célula é gerado pelo deslocamento dos microtúbulos, desencadeado pelo consumo energético das dineínas, energia esta gerada pela hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) (15,16).

A peça intermediária é responsável pela produção de energia para movimentação da célula espermática, e estruturalmente é semelhante a peça principal da cauda se diferenciando apenas pela ausência da bainha fibrosa e na presença de uma bainha mitocondrial, que contém mitocôndrias como unidades formadoras de energia (12,13).

A célula espermática possui uma membrana que a reveste completamente (12,17,18), que dispõe de uma bicamada fosfolipídica, composta por ácidos graxos saturados e insaturados unidos a grupamentos fosfato (18). Esta disposição permite as células uma extremidade polar hidrofílica, assim como, um centro polar hidrofóbico, conferindo uma impermeabilidade à maioria dos solutos polares (19,20).

As proteínas presentes nas membranas podem ser integrais ou periféricas, e desempenham algumas funções tais como, transporte de substâncias entre meio interno e externo, atividade metabólica com função enzimática, reconhecimento celular e permitem ligações entre as células (18,19).

Num contexto geral, a membrana plasmática é responsável pela manutenção da homeostase celular e suas organelas, requisito essencial para a sobrevivência e manutenção do potencial de fertilização das células espermáticas, sendo a integridade funcional das membranas dos espermatozoides considerada imprescindível para os processos de capacitação, reação acrossomal e adesão ao oócito (21)

Hemospermia em garanhões

A hemospermia é definida como presença de sangue no ejaculado e é consequência de uma afecção originada de qualquer local do trato reprodutor masculino (22). A origem do sangue no sêmen dos garanhões pode se apresentar em diversos locais, comumente decorrente das lesões do processo uretral, uretra e em casos de vesiculite seminal crônica levando aumento da vascularização da glândula devido ao processo inflamatório e, conseqüentemente no momento da ejaculação, haverá presença de sangue (5).

Apesar de casos de hemospermia não serem usuais, esta enfermidade tem sido relatada por diversos autores (22-24).

Etiopatogenia

Para uma avaliação de um garanhão, ou seja, realização de um exame andrológico afim de diagnosticar alguma enfermidade, é necessário que se saiba a localização, forma e tamanho de cada órgão do sistema reprodutor do garanhão (25).

Em alguns casos há comunicação entre os corpos esponjosos do pênis e o lúmen uretral no momento da ejaculação o sangue será transferido para a uretra e liberado juntamente ao sêmen (26). As principais causas de hemospermia incluem epididimite, vesiculite seminal, fissuras no processo uretral, na glândula do pênis, fístulas uretrais, estenose uretral, neoplasias, lesões provocadas pelo *Habronema spp* e obstrução das ampolas dos ductos deferentes (23,27,28).

Dentre os locais mais comuns para ocorrência de lesões traumáticas destaca-se o processo uretral principalmente no momento da cópula, na qual pode ocorrer laceração do mesmo pelo fio de crina da cauda da fêmea (29).

Animais que possuem lesões provocadas por habronemose cutânea apresentam um quadro secundário de processo inflamatório principalmente na região da glândula do pênis, o que propicia o aumento da vascularização durante a ejaculação e a eliminação de sangue no ejaculado de garanhões (30). Em casos de obstrução das ampolas dos ductos deferentes, a presença do sangue no ejaculado pode ser subsequente à desobstrução das glândulas podendo ser resultado de lesão do órgão (6).

As causas infecciosas de hemospermia são: vesiculite seminal bacteriana, uretrite e epididimite (30-32). Essas enfermidades podem levar a lesões ulcerativas da pele do pênis e causar sangramentos durante a cópula, sendo os agentes infecciosos mais comumente encontrados em casos de uretrite e vesiculite seminal bacteriana: *Streptococcus spp*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (33). Além disso o Herpesvírus equino pode provocar lesões na superfície da pele do pênis e sangrar facilmente durante a cópula ou coleta do sêmen com vagina artificial (34).

Sinais Clínicos

A hemospermia é consequência de alguma enfermidade do trato reprodutor do garanhão e para determinar a causa é necessário que se utilize ferramentas que permitam investigar todas as prováveis suspeitas. Na sua grande maioria os garanhões não apresentam dor durante a ereção e/ou na ejaculação (33), entretanto em alguns casos de vesiculite seminal podem ocorrer

distúrbios ejaculatórios (35).

A gravidade da lesão depende da causa inicial, e a presença de sangue pode variar entre os ejaculados, sendo assim, há a necessidade de múltiplas coletas de sêmen para detectar o problema (26). Desta forma, o tempo de avaliação do ganhão deve ser levado em consideração, uma vez que animais que se encontram em repouso e/ou descanso sexual podem mascarar a alteração devido à ausência de sangue nas primeiras ejaculações, sendo necessárias coletas repetidas em um intervalo curto de dias (5).

Diagnóstico

Caso haja suspeita de hemospermia o sêmen deverá ser coletado por vagina artificial e examinado de acordo com a coloração. Tanto a hemospermia severa, como a moderada, são diagnosticadas pelo aspecto da amostra, entretanto para hemospermia leve é necessário um exame microscópico para identificar a presença de células vermelhas entremeadas às células espermáticas. Devido a homogeneidade entre as células espermáticas e hemácias é necessário realizar uma coloração descrita por (36) para identificação das hemácias nos ejaculados.

Ultrassonografia

Quando as lesões externas não são identificadas como fonte do sangramento é necessário lançar mão de técnicas de diagnóstico que permitam a visualização do trato reprodutor masculino interno (5). A palpação e a ultrassonografia dos testículos, epidídimo e funículo espermático podem revelar importantes alterações nos órgãos em questão (37). Do mesmo modo, a palpação transretal e a ultrassonografia permitem um exame profundo das glândulas sexuais acessórias e identificação de possíveis alterações, como por exemplo obstrução das glândulas ampolares, assim como processo inflamatório nas glândulas vesiculares (38).

Endoscopia

Videoendoscópios flexíveis ou de fibra óptica podem ser utilizados para exame completo do trato urogenital de ganhões (39-42), podendo identificar uretra peniana, pélvica, glândula vesicular e bexiga urinária (43).

A mucosa uretral se apresenta de coloração rósea pálida, contém dobras longitudinais e sua aparência é semelhante à do esôfago (44).

Coleta fracionada

A ejaculação e ereção no ganhão são controladas pelas vias aferentes e eferentes provenientes da inervação da medula espinhal. A ereção ocorre a partir do relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos e esponjosos em associação com o aumento do fluxo sanguíneo arterial para o pênis (45). Durante a cópula há aumento da atividade da musculatura regulada por estímulos nervosos do sistema nervoso autônomo parassimpático para corpos cavernosos e esponjosos e estímulos somáticos para isquiocavernoso e bulboesponjoso (46). O processo ejaculatório no ganhão tem como característica a presença dos jatos divididos de acordo com o momento da ejaculação, sendo eles, a porção da secreção das glândulas sexuais

acessórias bulbouretrais e próstata, epidídimo e ampolas dos ductos deferentes e fração final das vesículas seminais (45).

Após a identificação de sangue no ejaculado de garanhões o exame físico da superfície externa do pênis, fossa uretral e processo uretral devem ser realizados no órgão antes e após a ereção. Caso não haja identificação das lesões, uma ferramenta útil para diagnosticar a causa do problema é a coleta do sêmen com o fundo da vagina artificial aberta, na qual a glândula do pênis irá se projetar e permitindo a visualização da mesma durante a ejaculação (29). Outra alternativa corresponde a coleta fracionada descrita por Oliveira (47), na qual permite a interrupção dos jatos e separação dos mesmos com auxílio de pinças durante a ejaculação. Portanto, se todos os jatos apresentarem coloração avermelhada é sugestivo de hemospermia por alterações na uretra e/ou testiculares, mas, se apenas a última fração das glândulas vesiculares estiverem na coloração avermelhada provavelmente um processo infeccioso sugestivo de hemospermia devido a vesiculite seminal.

Tratamentos

A abordagem para um tratamento adequado depende da origem do problema. Em alguns casos de hemospermia preconiza-se o repouso sexual do garanhão, como em lesões traumáticas de uretra e processo uretral. No entanto, o garanhão pode apresentar o quadro clínico no retorno à atividade reprodutiva. Além de que, alguns garanhões realizam a masturbação, que consiste na ereção e em movimentos consecutivos do pênis no abdômen (33). O método utilizado para impedir a masturbação em garanhões é agressivo; o emprego de tarraxas no abdômen, sendo assim, agravando o quadro clínico do animal principalmente em casos de alterações de processo uretral (48).

Em casos de fístula uretral e/ou uretrite é indicada a cauterização química da lesão de acordo com o tratamento proposto por Silva-Junior et al. (49), que consiste na endoscopia para se obter diagnóstico diferencial para vesiculite seminal. Após o diagnóstico da origem do sangramento, é realizado tratamento local com policresuleno a 4% em três aplicações de 100 mL com intervalo de 24 horas. Para acesso a uretra peniana, é utilizada uma pipeta flexível para inseminação de sêmen congelado, na qual é introduzida completamente e em seguida é administrado o volume do medicamento com a bispaga para inseminação artificial, no momento de aplicação do fármaco a pipeta é retirada lentamente e o processo uretral é ocluído de forma manual para deixar o líquido em contato com a lesão por cinco minutos. Após esse período, o processo uretral é desocluído e líquido eliminado (figura 2).

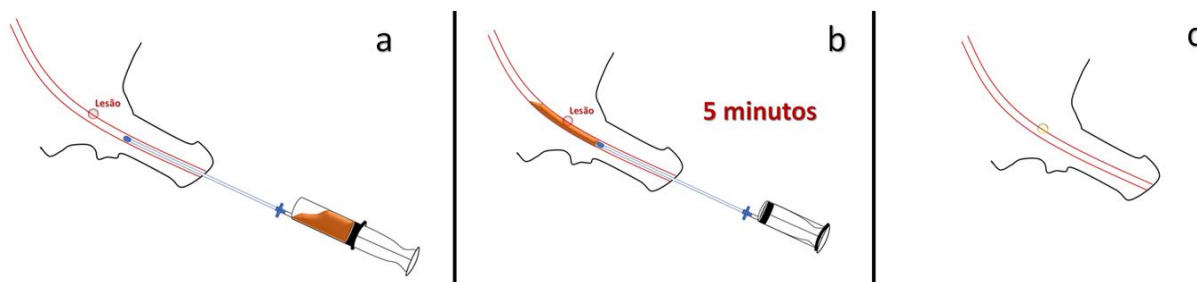


Figura 2. Esquematização do tratamento de fístula uretral através de cauterização química. **a:** Introdução da pipeta flexível até o local da lesão. **b:** Deposição do policresuleno a 4% na

uretra e deixar agir por 5 minutos. **c:** Remoção do agente caustico. (Autoria própria).

Em lesões na uretra pélvica, o mesmo procedimento citado anteriormente é realizado, no entanto, utiliza-se o endoscópio para acessar o local da lesão. Uma outra alternativa corresponde ao método cirúrgico de uretrotomia subisquial que consiste em realizar uma fístula temporária na uretra de 4 semanas, podendo se estender até 6 semanas com a finalidade de diminuir a pressão do corpo esponjoso no momento final da ejaculação (50,33,51). Segundo Blanchard (27), em garanhões que apresentam grau de hemospermia leve e estão em época de estação de monta é indicada a introdução de diluente a base de leite desnatado no útero das éguas previamente a monta, com intuito de diminuir a contaminação, entretanto, em casos de hemospermia severa, a diluição do sêmen no útero não reduz o grau de contaminação.

Em relação ao tratamento para vesiculite seminal, devem-se levar em consideração alguns fatores que são cruciais para o sucesso, tais como, a biodisponibilidade dos fármacos e baixa vascularização das glândulas vesiculares dificultando que a maioria dos antibióticos atinjam o órgão acometido com uma concentração inibitória mínima adequada para debelar o agente etiológico (25,43,52,53,54). De acordo com Varner e Schumacher (55), a lavagem direta do lúmen glandular e infusão de antimicrobianos é o tratamento de eleição, entretanto são necessárias repetições diárias de no mínimo cinco dias consecutivos.

Sancler-Silva (35) realizou o tratamento local da vesiculite seminal e avaliou a influência deste na qualidade seminal, e foi relatado que a conduta terapêutica adotada melhorou os parâmetros seminais de cinética e integridade de membrana plasmática no sêmen fresco, refrigerado e congelado após uma semana do tratamento, mas o mesmo não foi observado após um mês do início do tratamento, devido a recidiva da enfermidade.

Influência do sangue na qualidade do sêmen equino

Os prejuízos no programa de reprodução assistida devido a hemospermia são altos, uma vez que os garanhões acometidos apresentam queda na fertilidade ou infertilidade (22).

Em humanos (56-58) e equinos (59,60), a presença de bactérias e leucócitos proporcionam o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS) e produção de citocinas pró-inflamatórias, afetando a integridade de membranas, função mitocondrial e integridade de DNA, levando ao aumento de marcadores de apoptose na célula espermática, redução da motilidade e consequentemente queda na taxa de fertilidade.

Os mecanismos pelo qual a presença do sangue afeta a qualidade seminal e por consequência as taxas de concepção não estão elucidados. Em um estudo realizado por Turner et al. (22), no qual comparou-se as taxas de fertilidade do ejaculado na presença de sangue contendo 5%, 50% v/v e na ausência de sangue, foi verificada a redução das taxas de concepção para o grupo 50 %, tal fato pode ser justificado pela formação de coágulos e aglutinações dos espermatozoides, impedindo a movimentação dos mesmos no trato reprodutor da fêmea.

De acordo com Voss (61), o responsável pela queda na fertilidade é a série vermelha do sangue. Neste estudo 50% das éguas inseminadas com o ejaculado acrescido da série branca do sangue (soro) ficaram gestantes em contrapartida, apenas 7,7% das éguas inseminadas com sêmen na presença de sangue total obtiveram o conceito. Andrade Jr et al. (24) demonstraram que ejaculado contaminado com até 5% v/v de sangue total não há influência nas taxas de fertilidade.

Separação espermática por gradiente de densidade

Nos casos em que garanhões apresentam um alto índice de células morfologicamente anormais é necessário o uso de tecnologias que proporcionem uma maximização do uso do sêmen, com objetivo de obter resultados satisfatórios no momento da inseminação artificial. Um protocolo recente utilizado por MILES et al. (62), envolve a utilização de uma sílica como gradiente de seleção o EquipureTM, que permite a retenção de espermatozoides com anormalidades morfológicas, obtendo uma população de células morfologicamente normais.

De acordo com Maziero et al. (63), a centrifugação do sêmen equino em EquipureTM proporcionou aumento das taxas de motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos após 24 horas de refrigeração, o mesmo foi observado por Papa et al. (64) quando utilizado sêmen descongelado.

Morrell et al. (65) estudaram a diminuição da carga bacteriana no ejaculado de garanhões após a centrifugação em Androcoll, e observaram redução de até 90% das bactérias. No entanto, foi observado que a centrifugação em colóide reduz mas, não elimina a contaminação do ejaculado sendo necessário a adição de antibióticos ao diluente.

Papa et al. (66) observaram que após a centrifugação do sêmen de garanhões com baixas taxas de recuperação embrionária em gradiente de densidade EquipureTM houve aumento no número de embriões (70%) para o grupo de seleção espermática em relação ao grupo controle (33%), mostrando que, a seleção de uma população de espermatozoides utilizando gradiente de densidade se mostrou uma técnica eficiente para o aumento da qualidade seminal assim como nos índices de fertilidade, para sêmen fresco e refrigerado.

Manipulação do sêmen na presença de sangue

Em alguns casos de hemospermia há recidivas e/ou quadro crônico da lesão, sendo assim, necessário utilização de técnicas alternativas para manipulação do sêmen destes garanhões.

Em estudo realizado por Ramires-Neto et al. (67), foi demonstrado que o uso de uma membrana hidrofóbica sintética de 2µm de diâmetro (Sperm Filter[®]) e posterior centrifugação em gradiente de densidade (EquipureTM), no processamento do sêmen de um garanhão com alta carga leucocitária devido a vesiculite seminal, obteve bons resultados no programa de inseminação artificial. Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, foi relatada superioridade dos valores de integridade da membrana plasmática para o sêmen filtrado em Sperm Filter[®] em relação ao não filtrado após 24 horas de refrigeração. Além disso, no mesmo estudo, o número de unidades formadoras de colônias foi menor para o grupo de sêmen diluído e filtrado na membrana hidrofóbica em relação ao sêmen diluído e puro, demonstrando que a membrana hidrofóbica foi eficaz na redução da carga bacteriana no primeiro grupo.

De acordo com Parrish et al. (68) a execução da técnica “swin up” que consiste em selecionar células que estejam sem movimento se mostrou eficiente para separação de espermatozoides mortos e possivelmente para hemácias uma vez que, devido à ausência da mobilidade eritrocitária as mesmas ficariam sedimentadas e em contrapartida os espermatozoides móveis se encontravam na região superior.

Para Turner et al. (22), em situações de altas concentrações de sangue no ejaculado de garanhões a fertilidade é comprometida devido a formação de coágulos e aglutinação dos espermatozoides, havendo a necessidade de adição de anticoagulantes na diluição.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos diferentes achados em relação aos prejuízos relacionados a presença do sangue no ejaculado dos garanhões, os resultados ainda são inconsistentes. Ainda há controvérsia sobre os malefícios que o sangue promove no ejaculado da espécie em questão, necessitando-se de aprofundamento sobre as interações das substâncias presentes no sangue com a células espermática e suas possíveis consequências.

REFERÊNCIAS

1. Guerra, PJ. Brasil tem o quarto maior rebanho equino do mundo, com 5,8 milhões de cabeça. Notícia 16/03/2010. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/portal/noticia.php?cod=606>. Acesso em: 04 de janeiro de 2017.
2. Avanzi BR, Ramos RS, Nichi M, Fioratti EG, Dell'Aqua Jr JA, Wechsler FS, Papa FO Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas. Revista Veterinária e Zootecnia, v.18, n.2, p.226-238, 2011.
3. Miller CD. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. Theriogenology, v.70, p.463-468, 2008.
4. Mckinnon AO, Voss JL. Equine Reproduction, Lea and Febiger, Philadelphia, London. 1992.
5. Turner RMO. Abnormalities of the ejaculate. In: Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. Equine Reproduction. 2nd. Ed Willey-Blackwell, 2011, cap.108, p.1119-1129.
6. Klein BG. Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, 451p.
7. Amann RP, Graham JK. Spermatozoal function. In: Mckinnon AO, Voss JL. Equine reproduction. Philadelphia: Saunders. 1993:715-745.
8. Samper JC. Equine Breeding Management and Artificial Insemination. 2nd. Ed. Missouri: Saunders, 2009, 212p.
9. Hafez ES. Reprodução Animal, 7.ed., São Paulo: Manole, 2004. 513p.
10. Senger PL. Pathways to Pregnancy and parturition. 2nd. Ed. Pullman: Current Conceptions, 2005. 373 p.
11. England GC. (2005): The normal stallion. In.: Fertility & Obstetrics in the Horse. Blackwell,

Oxford, p.200- 225.

12. Varner DD, Gibb Z, Aitken RJ. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal*, v.47, p.16-24, 2015.
13. Gadella BM, Rathi R, Brouwers JF, Stout TA, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.249-265, 2001.
14. Toshimori K, Ito C. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Archives of Histology and Cytology*, v.66, p.383-396, 2003.
15. Ruiz-pesini E, Diez-Sanchez C, Lopez-Perez MJ, Enriquez JA. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Current Topics in Developmental Biology*, v.77, p.3-19, 2007.
16. Brito LFC. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v.6, p.249-264, 2007.
17. Pesch S, Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, v.37, p.597-612, 2006.
18. Robertson JD. Membrane structure. *The Journal of Cell Biology*, v.91, p.189-204, 1981.
19. Oliveira GC, Oliveira BMM, Caleghini ECC, Fernandes CB, Mattos CB. Criopreservação do semen equino: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.37, p.23-28, 2013.
20. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Princípios da Bioquímica*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, p.1298.
21. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1469, p.197-235, 2000.
22. Turner CE, Walbornn SR, Blanchard TL, Varner DD, Brinsko SP, Lacaze KA, Teague SR, Love CC. The effect of two levels of hemospermia on stallion fertility. *Theriogenology*, v.86, p.1399-1402, 2016.
23. Bedford SJ, McDonnell SM, Tulleners E, King D, Habecker P. Squamous cell carcinoma of the urethral process in a horse with hemospermia and self-mutilation behavior. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, p.216-551, 2000.
24. Andrade Junior LRP, Andrade LRP, Araujo EAB, Oliveira SN, Silva LFMC, Dalanezi FM, Carneiro JAM, Guasti PN, Rodrigues LT, Souza FF, Papa PM, Freitas Dell'Aqua CP, Dell'Aqua Junior JA, Papa FO. Fertility of blood-contaminated stallion semen prepared by density gradient centrifugation. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF STALLION REPRODUCTION*, 7th.; Urbana, Illinois: Elsevier, 2016 p. S75.
25. Samper J, Tibary A. Disease transmission in horses. *Theriogenology*. v.66, p.551-559, 2006.

26. Schumacher J, Varner DD, Schmitz DG, Blanchard TL. Urethral defects in geldings with hematuria and stallions with hemospermia. *Veterinary Surgery*, v.24, p.250–254, 1995.
27. Blanchard TL. Use of a semen extender containing antibiotics to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Theriogenology*, v.28, p.541, 1987.
28. Sojka JE, Carter GK. Hemospermia and seminal vesicle enlargement in a stallion. *Compendium Continuing Education Practising Veterinarian*, v.7, p.587–588, 1985.
29. Varner DD, Blanchard TL, Brinsko SP, Love CC, Taylor TS, Johnson L. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. *Animal Reproduction Science*, p.493–509, 2000.
30. Love CC, Riera FL, Oristaglio RM. Sperm occluded (plugged) ampullae in the stallion. In: *PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY*, 1992, p.117–125.
31. Varner DD, Schumacher J, Blanchard T, Johnson L. *DISEASES AND MANAGEMENT OF BREEDING STALLIONS*. Goleta, CA: American Veterinary Publications, 1991.
32. Voss JL, Pickett BW. Diagnosis and treatment of hemospermia in the stallion. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.23, p.151–154, 1975.
33. Sullins KE, Bertone JJ, Voss JL, Pederson SJ. Treatment of hemospermia in stallions: A discussion of 18 cases. *Compendium Continuing Education Practising Veterinarian*, v.10, p.1396–1403, 1988.
34. Galosi CM, Echeverría MG, Vila Roza MV, Cid De La Paz V, Oliva GA, Etcheverrigaray ME. Virus herpes equino tipo 1 (ehv-1): Patrones de estricción de ADN, perfiles proteicos y estudio de patogenicidad en ratones. *Analecta Veterinaria*, v.18, p.35-40, 1998.
35. Sancler-Silva YFR. Efeito do tratamento local de vesiculite seminal sobre a qualidade e longevidade do sêmen equino. 2014. 124 f. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal, Botucatu, 2014.
36. Segabinazzi LG, Silva LFMC, Araujo EAB, Oliveira SN, Andrade Junior LRP, Dalanezi FM, Dell'Aqua CPF, Papa FO, Alvarenga MA. Modificación de la técnica por panoptico para la evaluación morfológica de espermatozoides equinos. In: *Primer Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal*, 1^o.; Buenos Aires: Solara, 2015 p. 517-520.

37. Malmgren L, Sussemilch BI. Ultrasonography as a diagnostic tool in a stallion with seminal vesiculitis: A case report. *Theriogenology*, v.37, n.4, p.935-938. 1992.
38. Blanchard TL, Varner DD. Stallion management. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.8, p.205-218, 1992.
39. Tibary, A. Endoscopy of the reproductive tract in the stallion. In: *Current Therapy in Equine Reproduction*. Samper JC, Pycock JF, Mckinnon, AO. 1st Ed, Saunders, Philadelphia, PA. 2007.
40. Schumacher JJ, Varner DD. Surgery of the penis and prepuce. In: *Equine Reproduction*, Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. 2nd, Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, PA. 2008.
41. Chenier TS. Anatomy and physical examination of the stallion, In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, J. Samper, W. B. 2nd Ed. Saunders, Philadelphia, 2009.
42. Menzies-Gow N. Diagnostic endoscopy of the urinary tract of the horse. *Equine Practice*, v.29, p.208-213, 2011.
43. Ball BA. Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.28, n.11, p.650-655, 2008.
44. Bertone JJ. Urinary Tract Endoscopy of Horse. In: *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, v.44, p.298-299, 1998.
45. McDonnell SM. Ejaculation physiology and dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.81, n.11, 1992.
46. Schumacher J, Riddell MG. Collection of stallion semen without a mount . *Theriogenology*, v.26, n.2, 1986.
47. Oliveira SN. Efeito da colheita fracionada sobre a cinética e viabilidade espermáticas do sêmen refrigerado e congelado de garanhões. 2016. 103 f. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal, Botucatu, 2016.
48. McDonnell SM, Henry M, Bristol F. Spontaneous erection and masturbation in equids. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Reproduction*, 1991, p.664–665.
49. Silva-Junior ER, Sancler-Silva YFR, Campos GA, Souza AK, Nakasato NG, Pinto BM, Papa FO. Uretrite em um Garanhão - Relato de Caso. In: *XVII CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ*, 17^o .; Campos do Jordão, 2016 p. 437.

50. Schumacher J, Varner DD, Schmitz DG, Blanchard TL. Urethral defects in geldings with hematuria and stallions with hemospermia. *Veterinary Surgery*, v.24, p.250–254, 1995.
51. Laverty S, Pascoe JR, Ling GV, Lavoie JP, Ruby AL. Urolithiasis in 68 horses. *Veterinary Surgery*, v.21, p.56–62, 1992.
52. Miragaya MH, Pinto MR, Neild DM. Muestreo y lavage de glândulas vesiculares en el padrillo. In: II Congress on Equine Reproduction, p.71-72, 2011.
53. Tibary A, Rodriguez JS. Causas e Manejo de lãs subfertilidad em padrillos. In: II Congresso on Equine Reproduction, p.55-69, 2011.
54. Varner DD, Taylor TS, Blanchard TL. Seminal Vesiculitis. In: *Equine Reproduction*. Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. 2nd Ed. Willey-Blackwell, 2011.
55. Varner DD, Schumacher J. Abnormalities of the accessory sex glands. In: *Equine Reproduction*. Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. 2nd Ed. Willey-Blackwell, 2011, cap.107, p.1113-1118.
56. Eley A, Hosseinzadeh S, Hakimi H, Geary I, Pacey AA. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by coincubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Human Reproduction*, v.20, p.2601–2607, 2005.
57. Satta A, Stivala A, Garozzo A, Morello A, Perdichizzi A, Vicari E, Almeri M, Calogero A. E. Experimental *Chlamydia trachomatis* infection causes apoptosis in human sperm. *Human Reproduction*, v.21, p.134–137, 2006.
58. Vignera S, Vicari E, Condorelli RA, D'Agata R, Calogero DAE. Male accessory gland infection and sperm parameters (review). *International Journal of Andrology*, v.34, p.330–347, 2011.
59. Ortega-Ferrusola C, Gonzalez-Fernandez L, Muriel A, Macias-Garcia B, Rodriguez-Martinez H, Tapia JA, Alonso JM, Pena FJ. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, p.518–522, 2009.
60. Fennel LC, Mckinnon AO, Savage CJ. Cryopreservation of semen from a stallion with seminal vesiculitis. *Equine Veterinary Education Equine*, v.22, n.5, p.215-219, 2010.
61. Voss JL, Pickett BW, Schideler RK. The effect of hemospermia on fertility in horses. *Proceedings of 8th ICAR*, v.1, p.271, 1976.
62. Milles JI, Amstalden M, Golding MC, Vogelsang MM. Use of Equipure with semen from subfertile stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, p.321-399, 2013.

63. Maziero RRD, Papa PM, Hartwig FP, Lisboa FP, Dell Aqua Jr JA, Alvarenga MA, Guasti PN, Landim-Alvarenga FC, Papa FO. Effects of single layer density gradient centrifugation on cooled-stored stallion semen In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF STALLION REPRODUCTION, 6th.; Viena: Elsevier, 2012 p.496.
64. Papa PM, Maziero RRD, Hartwig FP, Lisboa FP, Dell Aqua Jr JA, Alvarenga MA, Guasti PN, Papa FO. Effect of density gradient on sperm parameters of stallion frozen semen In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF STALLION REPRODUCTION, 6th.; Viena: Elsevier, 2012 p. 505.
65. Morrel JM, Klein C, Lundeheim N, Erol E, Troedsson MHT. Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science*, v.145, p.47-53, 2014.
66. Papa FO, Carmo MT, Papa PM, Dell Aqua Jr JA, Alvarenga MA. Effect of density gradient selection on embryo recovery rates of fresh and cooled stallion semen In: INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY, 39th ; Hannover, 2013 p. 227.
67. Ramires-Neto CR, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'Aqua JA, Papa FO, Alvarenga MA. Effect of removing seminal plasma using a sperm filter on the viability of refrigerated stallion semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, p.40-43, 2013.
68. Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, v.44, p.860-869, 1995.

ARTIGO II- Fertilidade do sêmen de garanhões com hemospermia

Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2015.

Resumo

Hemospermia é definida como a presença de sangue no ejaculado. As causas pela qual a enfermidade leva a infertilidade ou subfertilidade não estão completamente elucidadas. O objetivo deste foi determinar qual a influência do sangue na qualidade do sêmen equino assim como na taxa de fertilidade. No experimento 1 cada ejaculado (n=15) foi dividido em 4 tratamentos: Controle (ejaculado 1:1 Botu-sêmen®) e H5 (C + 5% v/v de sangue autólogo), CT (C submetido a separação por gradiente de densidade/ressuspendido em Botu-sêmen®) e H5T (H5 submetido a separação por gradiente de densidade/ressuspendido em Botu-sêmen®). As amostras foram refrigeradas durante 24 horas a 5°C e avaliadas para cinética espermática, integridade de membranas e geração de superóxido. No experimento 2 cada ejaculado (n=60) foi dividido em 3 tratamentos distintos: S50 (50% de ejaculado + 50% v/v sangue autólogo), S25 (S50 + 1:1 de Botu-sêmen®) e S12,5 (S50 + 2:1 de Botu-sêmen®), as amostras foram avaliadas para cinética espermática, integridade de membranas, produção de superóxido e taxa de fertilidade. Em relação aos parâmetros motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos houve redução para os grupos na presença de sangue tanto no experimento 1 (H5), assim como no experimento 2 (S50). Para a avaliação do índice de fertilidade no experimento 2, as éguas inseminadas na presença do sangue sem adição de diluente (S50) para sêmen fresco não obtiveram conceito (0%), entretanto conforme a relação diluente e sêmen aumentou as taxas de fertilidade aumentaram para os grupos S25 (25%) e S12,5 (90%). Conclui-se que, a fertilidade é afetada de acordo com a proporção sangue/ejaculado, não a simples presença do sangue no ejaculado.

1. Introdução

A presença de sangue no ejaculado de garanhões denominada hemospermia, pode ocorrer de forma contínua ou intermitente, e é geralmente descrita como causa de infertilidade em cavalos [1]. As principais causas de hemospermia incluem epididimite, vesiculite seminal, fissuras no processo uretral, lesões na glândula do pênis, fístulas uretrais, estenose uretral, neoplasias, lesões provocadas pelo *Habronema spp* e obstrução das ampolas dos ductos deferentes [2-4].

Dentre os locais mais comuns para ocorrência das lesões traumáticas destaca-se o processo uretral, devido o fio de crina da cauda da fêmea promover lacerações durante a cópula [5]. Voss et al. [6] relataram que o responsável pela queda na fertilidade é a série vermelha do sangue. Neste estudo 50% das éguas inseminadas com soro sanguíneo adicionado no sêmen ficaram gestantes em contrapartida, apenas 7,7% das éguas inseminadas com sêmen na presença do sangue total obtiveram o conceito.

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi desenvolver uma técnica eficiente de separação entre sêmen e as hemácias a partir da utilização de gradientes de densidade durante a centrifugação, assim como, avaliar a taxa de fertilidade do sêmen na presença de altas concentrações de sangue e após sua diluição em diferentes proporções de meio diluidor.

2. Material e métodos

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) número do protocolo 50/2016, da Universidade Estadual Paulista- UNESP Botucatu, SP, Brasil

2.1. Animais

Foram utilizados 15 garanhões com idade entre 5 e 15 anos, clinicamente sadios e de diferentes raças (Quarto de Milha, PSI, Mangalarga Marchador, Mangalarga e Brasileiro de Hipismo). Os garanhões foram mantidos em estábulo recebendo como alimentação Tifton-85, ração e água *ad libitum*. Foram utilizadas 20 éguas com idade entre 10 e 18 anos, mantidas em

piquetes de 1200 m², com lotação de quatro animais por piquete, recebendo a mesma alimentação supracitada para os garanhões.

2.2. Coleta do sêmen

Foi utilizado 1 ejaculado de cada garanhão. Imediatamente após a coleta com vagina artificial modelo Botupharma® (Botupharma Ltda-Botucatu-Brasil), foi realizada uma análise inicial para estimar a qualidade do sêmen. Para isso foi empregado o método do sistema computadorizado de análise espermática – CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis* (HTM-IVOS 12 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA).

Após a realização da triagem inicial, foi determinada a concentração espermática através da contagem das células em câmara de Neubauer. Em seguida, cada ejaculado foi fracionado em seis alíquotas iguais, acrescido o diluente teste estipulado para cada experimento, sendo 4 amostras destinadas a refrigeração. Em seguida foi fixada concentração de (50×10^6) de espermatozoides por mililitro (mL) para refrigeração.

2.3. Delineamento Experimental

Dois experimentos distintos foram realizados (I, II). No experimento I cada amostra foi dividida em alíquotas e separadas em diferentes tratamentos: C (ejaculado + 1:1 Botu-Sêmen®), H5 (C + 5% v/v de sangue autólogo), CT (C submetido a separação por gradiente), e H5T (H5 submetido a separação por gradiente). Nos grupos tratados “T” foi utilizado tubo cônico plástico de 50 mL, adicionando 20 mL de EquipureTM, no fundo do tubo 1 mL do gradiente de densidade intermediária “hemo clean” (HC) e sobre estes 20 mL da amostra de sêmen referente a cada grupo (CT, H5T). Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 600 x g durante 20 minutos, recuperando-se em seguida o pellet formado abaixo da camada de hemácias resultante do processo de separação. Para as amostras no experimento I os grupos C e H5 após a diluição foram imediatamente submetidos a refrigeração a 5°C durante 24 horas enquanto que nos grupos CT e H5T foram ressuspensos em meio Botu-sêmen® e refrigerados como nos demais grupos. No experimento II cada amostra foi dividida em alíquotas e separadas em diferentes grupos: S50 (50% de ejaculado + 50% v/v sangue autólogo), S25 (S50 + 1:1 de Botu-sêmen®) e S12,5 (S50 +

2 Botu-sêmen® :1 sêmen) os grupos S50, S25 e S12,5 logo após a diluição foram utilizados para o ensaio da fertilidade in vivo para sêmen fresco.

2.4. Análises Esperáticas

2.4.1. Avaliação da cinética esperática

Cada amostra foi analisada por meio do equipamento HAMILTON THORNE RESEARCH-IVOS 12 (CASA), para mensuração da motilidade esperática total (MT), motilidade esperática progressiva (MP) e porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP). Para cada amostra seminal foram observados cinco campos aleatórios em câmara de Mackler contendo 10 µL da amostra, avaliando-se no mínimo 200 células por campo.

2.4.2. Avaliação por citometria de fluxo

As análises de integridade de membrana plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica e concentração de ROS, foram avaliadas com equipamento de citometria de fluxo BD LSR II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW e vermelho 640 nm, 40 mW. Os dados foram avaliados pelo programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v6.1.

2.4.3. Análise da integridade de membrana plasmática e acrossomal

Para mensuração de integridade de membrana plasmática e acrossomal foram utilizadas as sondas iodeto de propídio (IP; 28,707-5, Sigma), FITC-PSA (L-0770, Sigma) de acordo com protocolo desenvolvido por Arruda et al. (2003). Assim, numa amostra de 400 µL de sêmen diluído em meio TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL foram adicionados 2 µL de IP (0,02 mg/mL) e 4 µL de FITC-PSA (5 mg/mL), e então homogeneizados e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A citometria de fluxo foi realizada em 5 minutos.

2.4.4. Avaliação da peroxidação lipídica

Este ensaio foi realizado utilizando a sonda C11-BODYPY (D-3861;Molecular Probes), uma amostra do sêmen foi diluída em meio TALP a uma concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL com volume final de 499,5 μ L. Estas amostras foram coradas com 0,5 μ L da sonda C11BODYPY581/591 (1 mg/mL).

2.4.5. Avaliação da geração de superóxido

Para avaliação da produção de anion superóxido (O_2^-) na matriz mitocondrial, foi utilizada a associação de Hoechst 33342, SYTOX Green Dead Cell Stain (SG; para identificação das células com membrana plasmática lesada) e MitoSOXTM Red (MSR; para geração de anion superóxido na matriz mitocondrial). Assim, em uma alíquota de 493,7 μ L de sêmen diluído em TALP-PVA na concentração final de 5×10^6 , foi adicionado 5 μ L de Hoechst 33342 (concentração final de 7 μ M), 1 μ L de SG (0,05 μ M) e 0,3 μ L de MSR (2 μ M), então a amostra era incubada a 37°C por 15 minutos.

2.5. Estudo da fertilidade

Foram utilizados 60 ejaculados de um garanhão com fertilidade comprovada. Após a coleta, cada amostra foi diluída para concentração final de 1×10^9 de espermatozoides totais, em meio diluente Botu-Semen®. Os ejaculados foram divididos em três grupos: sêmen adicionado de sangue autólogo 50% v/v (S50), sêmen adicionado de sangue autólogo 50 % v/v e diluído na proporção 1:1 (diluente/sêmen) (S25) e sêmen adicionado de sangue autólogo 50 % v/v e diluído na proporção 2:1 (diluente/sêmen) (S12,5). As doses de sêmen para inseminação artificial (IA) foram preparadas a uma concentração final de 1×10^9 de espermatozoides totais para sêmen

fresco. Para o ensaio da fertilidade, 3 ciclos consecutivos de 20 éguas distribuídas aleatoriamente foram estudados para os grupos S50, S25 e S12,5. As éguas foram monitoradas diariamente por palpação transretal e ultrassonografia (Pie Medical Falco 100, Nutricell, Campinas, SP, Brazil), sendo que, quando um folículo dominante atingiu 35mm de diâmetro, a ovulação foi induzida com 1.0 mg de acetato de deslorelina, i.m. A IA foi realizada 24 horas após a indução da ovulação. O diagnóstico da gestação foi realizado 15 dias após a detecção da ovulação.

2.6. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados através do programa computacional Instant 5.0 (GraphPad Software Inc, USA), para as análises laboratoriais das características espermáticas dos grupos estudados foi efetuado a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey quando necessário. Para as análises do ensaio da fertilidade foi efetuado o teste de Fisher (LSD). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Experimento 1

Os resultados obtidos no experimento 1 tanto para sêmen fresco (T0) quanto pós refrigeração (T24) estão descritos nas tabelas 1 e 2 respectivamente. Foi possível observar que no tratamento CT e H5T houve aumento para os parâmetros de cinética espermática, tanto no momento T0 quanto no momento T24 em comparação com o grupo controle.

Tabela 1. Médias \pm desvio padrão da cinética espermática, integridade de membrana, peroxidação lipídica e produção de superóxido para os diferentes grupos no sêmen fresco (T0).

Variáveis	Grupos			
	C	H5	CT	H5T
MT	81,0 \pm 5,5 ^{ab}	59,5 \pm 14,2 ^b	82,0 \pm 5,2 ^a	66,1 \pm 12,1 ^{ab}
MP	29,7 \pm 5,3 ^{ab}	20,7 \pm 6,1 ^b	30,3 \pm 7,8 ^a	27,6 \pm 10,6 ^{ab}
RAP	72,8 \pm 6,1 ^{ab}	45,6 \pm 15,4 ^b	74,7 \pm 6,5 ^a	57,1 \pm 15,8 ^{ab}
IM	71,8 \pm 8,4	70,5 \pm 8,6	71,8 \pm 9,6	65,0 \pm 8,6
PER	21,5 \pm 9,8	18,2 \pm 14,6	19,4 \pm 7,2	23,6 \pm 10,3
O₂⁻	42,4 \pm 24,9	40,2 \pm 21,9	26,8 \pm 9,7	35,3 \pm 12,7

*Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$)

(MT) motilidade espermática total; (MP) motilidade espermática progressiva; (RAP) espermatozoides com movimento rápido; (IM) integridade de membrana; (PER) peroxidação lipídica; geração de superóxido (O₂⁻), C = controle, H5 = 5% sangue, CT = controle centrifugado, H5T = 5% sangue centrifugado.

Tabela 2. Médias \pm desvio padrão da cinética espermática, integridade de membrana, peroxidação lipídica e produção de superóxido para os diferentes grupos no sêmen após 24 horas de refrigeração (T24).

Variáveis	Grupos			
	C	H5	CT	H5T
MT	66,1 \pm 12,2 ^{ab}	54,2 \pm 13 ^b	71,9 \pm 10,4 ^a	60,3 \pm 16,2 ^{ab}
MP	28,3 \pm 9,3 ^{ab}	23,1 \pm 9,3 ^b	32 \pm 10,2 ^a	27,3 \pm 9,9 ^{ab}
RAP	54,2 \pm 13 ^{ab}	41,9 \pm 14,6 ^b	58,1 \pm 17,2 ^a	46,3 \pm 17,6 ^{ab}
IM	57,2 \pm 10,3	56,8 \pm 10,8	68,5 \pm 8,2	63,2 \pm 8,1
PER	38 \pm 16,5	32,9 \pm 11,5	34 \pm 10,1	33,2 \pm 9,6
O₂⁻	60,4 \pm 19,1	52,2 \pm 17,7	44,4 \pm 24	46,4 \pm 17,4

*Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$)

(MT) motilidade espermática total; (MP) motilidade espermática progressiva; (RAP) espermatozoides com movimento rápido; (IM) integridade de membrana; (PER) peroxidação lipídica; geração de superóxido (O₂⁻), C = controle, H5 = 5% sangue, CT = controle centrifugado, H5T = 5% sangue centrifugado.

3.2. Experimento 2

Os resultados obtidos no experimento 2 tanto para sêmen na ausência do diluente (S50), quanto para os grupos S25 (uma parte de diluente e uma parte de sêmen) e S12,5 (duas partes de diluente e uma parte de sêmen) estão descritos na tabela 4. Foi possível observar que nos tratamentos S25 e S12,5 (grupos após a adição de diluente a base de leite desnatado) houve aumento para os parâmetros de cinética espermática, assim como para as taxas de concepção.

Tabela 4: Médias \pm desvio padrão da cinética espermática, integridade de membrana, peroxidação lipídica, produção de superóxido e taxa de fertilidade (FERT).

Diluição	Sem Diluente	1:1	2:1
Proporção de sangue na amostra	S50	S25	S12,5
MT	22,3 \pm 3,2 ^c	44,5 \pm 6,6 ^b	65,8 \pm 8,6 ^a
MP	11,8 \pm 2,3 ^b	14,2 \pm 4,1 ^b	22,4 \pm 6,2 ^a
RAP	12,2 \pm 5,8 ^c	32,3 \pm 7,8 ^b	53,8 \pm 9,7 ^a
IMP	69,8 \pm 10,4	71,3 \pm 8,3	70,2 \pm 10,1
PER	22,4 \pm 23,5	18,3 \pm 22,8	21,6 \pm 24,6
O₂⁻	43,4 \pm 23,8	40,3 \pm 24,6	38,5 \pm 22,4
FERT	0% (0/20) ^c	25% (5/20) ^b	90% (18/20) ^a

*Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$)

(MT) motilidade espermática total; (MP) motilidade espermática progressiva; (RAP) espermatozoides com movimento rápido; (IM) integridade de membrana; (PER) peroxidação lipídica, geração de superóxido (O₂⁻), FERT (taxa de fertilidade) para os grupos S50, S25 e S12,5.

4. Discussão

As causas de homospermia em garanhões estão relacionadas a presença de lesões no trato reprodutor masculino, desde o epidídimo até o processo uretral. Alterações em processo uretral, uretra e enfermidades de carcinoma de células escamosas e vesiculite seminal podem ser apontadas como principais causas de homospermia. A presença das hemácias no ejaculado

possivelmente não afetaria a cinética e morfologia espermática, no entanto, há redução da fertilidade de garanhões com hemospermia [7].

Diante da variabilidade de concentrações de sangue utilizadas no ejaculado de garanhões referenciadas na literatura, o presente estudo, no experimento 1, avaliou o efeito da adição de 5% v/v de sangue autólogo e após a remoção das hemácias através da utilização de gradientes de densidade durante a refrigeração espermática na concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL de diluente. Embora não haja diferença significativa para integridade das membranas entre os tratamentos tanto para as amostras à fresco (T0) quanto para as amostras após a refrigeração (T24), foi observado que houve queda na cinética espermática para o grupo na presença de sangue total, constatando que na concentração de 5% v/v de sangue autólogo resultou em queda significativa para motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP) tanto no momento T0 quanto T24. Corroborando com os achados de Moller et al [8], que avaliando a adição de diferentes concentrações de sangue ao ejaculado de garanhões, no entanto a fresco, observaram redução nos valores de cinética espermática a medida em que a concentração de sangue na amostra foi aumentando.

A redução da motilidade espermática observada ao se elevar a concentração de sangue no ejaculado pode ser atribuída a barreira física causada pelas hemácias impedindo o movimento dos espermatozoides além de, semelhança entre as células sendo assim, a análise computadorizada (CASA) interpreta as hemácias como células estáticas, uma vez que o CASA considera espermatozoides e hemácias com dimensões semelhantes de $5 \mu\text{M}$, gerando um possível erro de interpretação por parte do aparelho.

Além disto, embora ainda não tenha se estabelecido o motivo pelo qual a presença do sangue no ejaculado de garanhões reduz a fertilidade, de acordo com Voss et al [6], éguas inseminadas com a sêmen na presença de soro sanguíneo obtiveram maiores taxas de conceito em relação àquelas inseminadas com sêmen na presença de sangue total, atribuindo a queda na fertilidade as hemácias. Corroborando com os dados obtidos por Voss et al. [6], em outro estudo realizado por Turner et al. [7], a presença de 50% de v/v de sangue autólogo na amostra causa infertilidade para as éguas inseminadas, isso se deve ao fato de que há formação de coágulo e aglutinação dos espermatozoides, impedindo-os de seguir pelo trato reprodutor da fêmea.

Portanto, por apresentar impacto negativo sob as taxas de fertilidade optou-se por utilizar amostras contendo 50% v/v de sangue autólogo no experimento subsequente.

Assim como no experimento anterior, no experimento 2 houve benefício sobre a cinética espermática (MT, MP e RAP) para os grupos S25 e S12,5. Independente do tratamento realizado (S25 ou S12,5), foi possível observar superioridade para os valores de MT, MP e RAP pois, conforme a relação diluente a base de leite desnatado Botu-Sêmen[®] e concentração de sangue na amostra aumentava, a barreira física promovida pelas hemácias ao movimento dos espermatozoides diminuía, permitindo assim, movimento livre das células para leitura no CASA. De acordo com Turner et al. [7], possivelmente altas concentrações de sangue nas amostras promovem a formação de coágulos e dificultar o transporte dos espermatozoides pelo útero. Em nosso estudo as éguas inseminadas com sêmen na presença de 50% v/v sangue autólogo não obtiveram concepto (0%). No entanto, para as fêmeas inseminadas com 1:1 e 2:1 proporção Botu-Sêmen[®] e sêmen as taxas de fertilidade aumentaram respectivamente em 25% e 90%. Esta descoberta pode estar atribuída a maior proporção de diluidor, bem como o efeito anticoagulante dos componentes do plasma seminal, a exemplo o ácido cítrico [9].

Referências

- [1] Turner RMO, Abnormalities of the ejaculate. In: McKinnon AO, Squires el, Vaala WE, Varner DD. Equine Reproduction. 2nd. Ed Willey-Blackwell, 2011, cap.108, p.1119-129.
- [2] Blanchard TL. Use of a semen extender containing antibiotics to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to pseudomonas aeruginosa. Theriogenology, 1987; 28: 541.
- [3] Bedford SJ, McDonnell SM, Tulleners E, King D, Habecker P. Squamous cell carcinoma of the urethral process in a horse with hemospermia and self-mutilation behavior. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2000: 216-551.
- [4] Sojka JE, Carter GK. Hemospermia and seminal vesicle enlargement in a stallion. Compendium Continuing Education Practising Veterinarian, 1985; 7: 587-88.
- [5] Varner DD, Blanchard TL, Brinsko SP, Love CC, Taylor TS, Johnson T. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. Animal Reproduction Science. 2000: 493-509.
- [6] Voss JL, Pickett BW, Schideler RK. The effect of hemospermia on fertility in horses. Proceedings of 8th ICAR, 1976; 1: 271.

- [7] Turner CE, Walbornn SR, Blanchard TL, Varner DD, Brinsko SP, Lacaze KA, Teague SR, Love CC, .The effect of two levels of hemospermia on stallion fertility. *Theriogenology*. 2016; 86: 1399-402.
- [8] Moller G, Azevedo LR, Trein CR, Neves, AP, Garbade P, Mattos RC. Efeccts of hemospermia on semen quality In: *International Symposium on Stallion Reproduction*, 4th ; Hannover, 2005 p. 264-267.
- [9] Mann T. Biochemistry of stallion semen. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1975; 23: 47–52.