

CENTRO UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

BÁRBARA STEDILE DA SILVA  
GRACIELLE ALVES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE SÊMEN DA ESPÉCIE EQUINA:  
UMA REVISÃO**

RECIFE/2023

BÁRBARA STEDILE DA SILVA  
GRACIELLE ALVES DA SILVA

## **AVALIAÇÃO DE SÊMEN DA ESPÉCIE EQUINA: UMA REVISÃO**

Monografia apresentada ao Centro  
Universitário Brasileiro – UNIBRA, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Medicina Veterinária

Professor Orientador: Dr. José Carlos  
Ferreira da Silva

RECIFE/2023

Ficha catalográfica elaborada pela  
bibliotecária: Dayane Apolinário, CRB4- 2338/ O.

S586a Silva, Bárbara Stedile da.  
Avaliação de sêmen da espécie equina: uma revisão / Bárbara Stedile da  
Silva; Gracielle Alves da Silva. - Recife: O Autor, 2023.  
26 p.

Orientador(a): Dr. José Carlos Ferreira da Silva.

Trabalho de Conclusão de curso (Graduação) - Centro Universitário  
Brasileiro – UNIBRA. Bacharelado em Medicina Veterinária, 2023.

Inclui Referências.

1. Espermograma. 2. Garanhão. 3. Qualidade espermática. I. Silva,  
Gracielle Alves da. II. Centro Universitário Brasileiro - UNIBRA. III. Título.

CDU: 619

BÁRBARA STEDILE DA SILVA  
GRACIELLE ALVES DA SILVA

## **AVALIAÇÃO DE SÊMEN DA ESPÉCIE EQUINA: UMA REVISÃO**

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, pelo Centro Universitário Brasileiro – UNIBRA, por uma comissão examinadora formada pelos seguintes professores:

---

Prof. Dr. José Carlos Ferreira da Silva

---

Professor(a) Examinador(a)

---

Professor(a) Examinador(a)

Recife, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.

NOTA: \_\_\_\_\_

Dedicamos este trabalho a  
Deus, aos animais, às nossas  
famílias e aos professores.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos nossa profunda gratidão a todos que nos ajudaram ao longo dessa jornada. Neste momento especial gostaríamos de dedicar nossos agradecimentos a três pilares fundamentais da nossa vida: A Deus, nossos pais e professores.

Em primeiro lugar, gostaríamos de agradecer a Deus, pela sua força, bênçãos e por nos ajudar a ultrapassar todos os obstáculos e nunca deixar que desistimos. Foi a sua fé e presença que nos deu coragem em momentos de incertezas, nos fortaleceu quando nos sentimos desanimados e nos lembrou de que, mesmo nos momentos mais difíceis, não estamos sozinhas.

Eu Bárbara agradeço a minha mãe Débora Luciane, ao meu pai Valdir Alexandre as minhas tias Márcia Schmitz e Carminha Hofstertter. Eu Gracielle agradeço a minha mãe Maria das Graças, meu pai Djalma Alves e ao meu irmão Djalma Alves Junior, cuja o amor incondicional, apoio constante e encorajamento, foram essenciais para chegarmos aqui. Seus sacrifícios, dedicação e incentivos foram combustíveis vitais para superarmos desafios e obstáculos que encontramos no caminho. Sem a presença e suporte de vocês não teríamos chegado a esse marco significativo em nossa jornada acadêmica.

Por fim, não podemos deixar de reconhecer o papel vital desempenhado pelos nossos professores, em especial José Carlos, Rafael Artur, Luciana Neves, pelas suas mentes brilhantes, experiência e dedicação em compartilhar conhecimento foram fundamentais para o nosso crescimento acadêmico. Agradecemos sinceramente ao nosso orientador José Carlos que nos guiou, ensinou, corrigiu e encorajou durante nossas pesquisas e redação do TCC. O seu apoio inestimável, paciência e motivação foram fundamentais para o nosso sucesso.

Gostaríamos de expressar nossa sincera gratidão aos Médicos Veterinários Eleticio de Melo Junior e Neto Machado pelo apoio inestimável que vocês nos proporcionaram durante o nosso curso de Medicina veterinária. Sua orientação e ensinamentos foram fundamentais para o nosso desenvolvimento profissional, gratidão pelo seu compromisso em compartilhar seus conhecimentos, suas experiências e habilidades. Suas dedicações e contribuição jamais serão esquecidas.

*“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo. Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas. Porque somos curiosos...e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos. Siga em frente.”*

*Walt Disney*

## **AVALIAÇÃO DE SÊMEN DA ESPÉCIE EQUINA: UMA REVISÃO**

Bárbara Stedile da Silva  
Gracielle Alves da Silva  
José Carlos Ferreira da Silva <sup>1</sup>

**Resumo:** A equinocultura é uma atividade econômica relevante que envolve a criação e uso de cavalos. No Brasil, movimentam bilhões de reais anualmente e abrange diversos setores do agronegócio equino. Com o avanço tecnológico, biotecnologias como a inseminação artificial e transferência de embriões são amplamente utilizadas para melhorar a reprodução equina. A qualidade do sêmen é essencial e avaliada por características físicas e morfológicas. A avaliação andrológica dos garanhões, que inclui o exame físico e comportamental, é fundamental para verificar a saúde reprodutiva. Além disso, exames complementares podem ser realizados. A avaliação do sêmen por meio do espermograma é essencial para garantir a qualidade do material reprodutivo. Testes de termoresistência e exames microbiológicos são opcionais. Ao selecionar um garanhão, critérios como libido, raça, sanidade e idade devem ser considerados. A equinocultura desempenha um papel significativo na economia e na sociedade. A avaliação andrológica, aliada às biotecnologias, impulsiona a melhoria dos processos reprodutivos nessa atividade.

**Palavras-Chave:** Espermograma. Garanhão. Qualidade espermática.

<sup>1</sup> Professor orientador UNIBRA. Doutorado. e-mail: jose.ferreira@grupounibra.com



## **EVALUATION OF EQUINE SPECIES SEMEN: A REVIEW**

**Abstract:** Equine farming is a relevant economic activity that involves the creation and use of horses. In Brazil, it moves billions of reais annually and covers several sectors of equine agribusiness. With technological advancement, biotechnologies such as artificial insemination and embryo transfer are widely used to improve equine reproduction. Semen quality is essential and evaluated by physical and morphological characteristics. The andrological evaluation of stallions, which includes physical and behavioral examination, is essential to verify reproductive health. In addition, complementary tests can be carried out. The evaluation of semen through the spermogram is essential to guarantee the quality of the reproductive material. Thermosistance tests and microbiological exams are optional. When selecting a stallion, criteria such as libido, breed, health and age must be considered. Equine farming plays a significant role in the economy and society. Andrological assessment, combined with biotechnologies, drives the improvement of reproductive processes in this activity.

**Keywords:** Spermogram. Stallion. Sperm quality.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2 METODOLOGIA.....</b>	<b>11</b>
<b>3 DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>12</b>
3.1 Equideocultura .....	12
3.2 Anatomia da reprodução.....	12
3.3 Fisiologia da reprodução.....	15
3.4 Comportamento reprodutivo, índole e bem estar do garanhão.....	17
3.5 Avaliação Andrológica .....	18
3.5.1 Avaliação do sêmen ou espermograma .....	19
3.5.2 Colheita de sêmen .....	20
3.5.3 Características físicas no sêmen.....	20
3.5.4 Características morfológicas e classificação das anormalidades.....	23
3.5.5 Exames complementares .....	25
3.6 Critérios para seleção de reprodutor.....	25
3.7 Critérios para seleção de sêmen .....	25
3.7.1 Morfologia espermática .....	26
3.7.2 Integridade da membrana plasmática.....	26
3.7.3 Viabilidade espermática .....	27
3.7.4 Integridade do acrossoma .....	27
3.7.5 Integridade mitocondrial .....	27
3.7.6 Integridade da cromatina.....	28
3.7.7 Coloração supravital.....	28
3.7.8 Atividade da acrosina .....	28
3.7.9 Expressão gênica.....	29
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os primeiros equídeos viviam livremente em grupos sociais hierárquicos e já em seus primeiros contatos com os humanos, iniciou-se o processo de domesticação. Essa relação foi importante para o avanço da “civilização” tendo em vista que os equídeos produziam carne e pele para utilização do homem. Além disso, esses animais também foram utilizados para transporte, trabalho agrícola e na guerra (PETRUCI; BECEGATTO, 2022).

O cavalo sempre exerceu papel de destaque na economia, na sociedade e na política mundial. Apesar de terem sido substituídos por veículos movidos a combustão na execução de algumas atividades, em outras continuam exercendo importante papel. Atualmente, os equinos além de continuarem sendo utilizados para o trabalho no campo, passaram a ser utilizados em atividades esportivas, educacionais, como a equoterapia, e no lazer (NASCIMENTO; NADIR JUNIOR, 2021).

A equinocultura brasileira movimenta bilhões de reais e de acordo com o IBGE (2023), o número de equinos em 2021 foi superior a cinco milhões de cabeças (5.777.046). O Estado de Minas Gerais detém o maior efetivo (811.705 cabeças), seguido pelo Rio Grande do Sul (501.435 cabeças), Pará (488.219 cabeças), Mato Grosso (455.541 cabeças) e Bahia (440.055 cabeças). O estado de Pernambuco conta com um efetivo de 130.127 cabeças e Petrolina com 38.127 é o município com maior efetivo.

Diante da importância dos equinos para a economia nacional, recentemente foi elaborado o estudo sobre o Complexo do Agronegócio do Cavalo. Esse estudo envolve diferentes atores do meio equestre como criadores, médicos veterinários, nutricionistas, indústrias farmacêuticas e laboratórios. Envolvendo ainda indústrias de produtos, serviços especializados, centros de treinamentos, transporte, bem como os centros de pesquisas. Nesse estudo constatou-se que os equinos são utilizados principalmente nas atividades voltadas ao trabalho no campo, esporte e lazer (NASCIMENTO; NADIR JUNIOR, 2021).

Diante desse cenário, as biotécnicas de reprodução assistida passaram a desempenhar um papel fundamental na área de reprodução animal. Essas biotécnicas têm permitido identificar problemas reprodutivos que comprometem a fertilidade, como baixas taxas de concepção e elevada mortalidade embrionária. Adicionalmente, têm proporcionado aumento na compreensão dos eventos fisiológicos. A inseminação artificial (IA) é a biotécnica mais utilizada nos equinos, seguida pela transferência de embriões (TE). Para tanto, faz-se necessário selecionar os reprodutores com base em avaliação andrológica que consta do histórico de fertilidade do reprodutor, do exame dos órgãos genitais e do exame de sêmen (OLIVEIRA; MORELLI; COUTINHO, 2019).

Nesse contexto, a fertilidade dos rebanhos é o fator primordial para o sucesso de uma criação. Ela define a taxa de reprodução e a capacidade de propagar

gerações, além de medir o potencial biológico do número de descendentes que podem ser obtidos durante a vida produtiva (TANGA *et al.*, 2021). De um modo geral, a fertilidade é influenciada pelo bom funcionamento do sistema reprodutivo. Nos machos, ela pode ser estimada a partir da interpretação dos parâmetros seminais (GONZALEZ-CASTRO, CARNEVALE, 2018).

Diante do que foi abordado, objetivou-se realizar uma revisão de literatura sobre o potencial reprodutivo do garanhão considerando aspectos do bem estar animal, aspectos anatômicos e fisiológicos, aspectos da avaliação do sêmen, aspectos do comportamento e da sazonalidade reprodutiva visando contribuir sobre os critérios mínimos necessários para aprovação do potencial reprodutivo do garanhão.

## **2 METODOLOGIA**

O procedimento técnico utilizado, para a construção do presente trabalho, foi a pesquisa bibliográfica por meio de consultas em livros de referência e bases eletrônicas de dados, como Google Acadêmico, Scientific Electronic Library online (SciELO) e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS)

Os descritores utilizados foram: equinocultura; anatomia e fisiologia da reprodução em equinos; comportamento e manejo reprodutivos; andrologia em equinos; exame andrológico; avaliação do sêmen equino; colheita de sêmen na espécie equina; manipulação, análise e envio do sêmen equino; biotécnicas aplicadas em equinos; reprodução em equinos;

O espaço temporal da pesquisa abordou, primordialmente, os últimos cinco anos (2018-2022), porém, pela maioria dos trabalhos serem compostos por trabalhos de conclusão de curso, esse intervalo foi ampliado para (2004-2023). Os idiomas utilizados foram inglês, espanhol e português.

O critério de exclusão incluiu a espécie, o tipo de documento consultado, sendo os trabalhos de conclusão de cursos de graduação um deles.

### **3 DESENVOLVIMENTO**

#### **3.1 Equideocultura**

A equinocultura surgiu a partir da domesticação do cavalo, que foi importante para o desenvolvimento das civilizações asiáticas e europeias em meados de 4 mil anos antes de Cristo. Inicialmente, os cavalos foram utilizados como fonte de alimento, mas com o tempo os seres humanos utilizaram tanto para transporte e batalhas quanto em competições esportivas e diversões. O progresso da humanidade foi impulsionado pela bem-sucedida parceria entre o homem e o cavalo e até o século XX foram alcançadas grandes conquistas com a ajuda desses animais (MADELLA-OLIVEIRA et al, 2015; NASCIMENTO, NARDI JUNIOR, 2021).

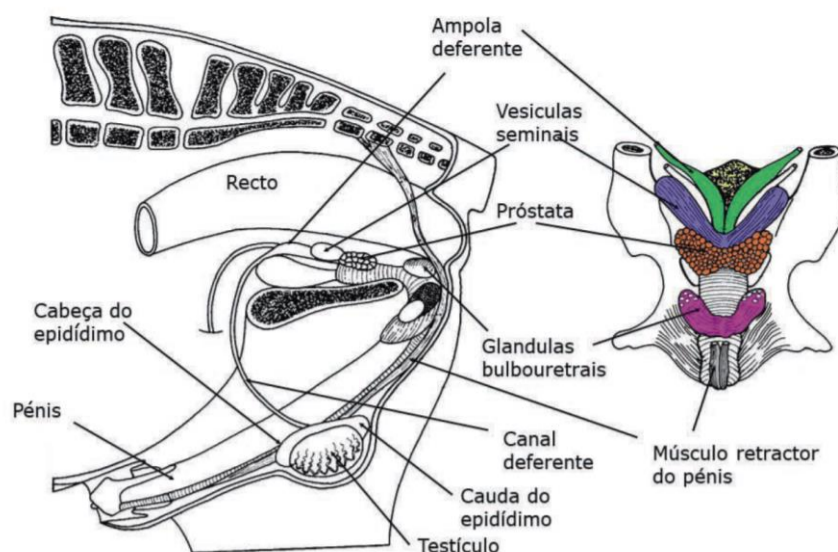
A partir da segunda metade do século XX, os cavalos passaram a exercer papel de destaque nas atividades relacionadas às artes, poesia, escultura, guerra e transporte. Eles possuem importância significativa tanto do ponto de vista sócio-cultural quanto econômico devido serem utilizados no desenvolvimento de trabalhos de tração. Entre outras atividades desses animais, a equoterapia avançou significativamente no tratamento de portadores de alterações cognitivas, psicomotoras e sócio-afetivas (DE ALMEIDA, SILVA, 2010).

De acordo com Vieira (2011), o Brasil tem reconhecimento mundial como potência no setor do agronegócio e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) classificou a equinocultura brasileira como parte essencial da atividade pecuária em consequência de sua importância econômica-social. Macedo e Rosanova (2013) trazem um estudo publicado em 2004, no qual evidenciam que a Confederação Nacional da Agricultura e da Câmara de Equideocultura do MAPA analisaram a realidade dessa atividade, historicamente vista como elitista.

Assim, percebe-se a importância de estudos e avanços tecnológicos na área de Reprodução Animal visando melhorias para a equinocultura. Para tanto, faz-se necessário entender os aspectos anatômico-fisiológicos e de comportamento reprodutivo que permitam o exame andrológico contribuir para uma seleção efetiva de cavalos com capacidade reprodutiva.

#### **3.2 Anatomia da reprodução**

A anatomia reprodutiva dos equinos é constituída por: dois testículos e seus respectivos cordão espermático e músculo cremaster externo, dois ductos deferentes, um par de glândulas vesiculares, uma glândula prostática, um par de glândulas bulbouretrais, pênis, uretra, músculo isquiocavernoso, bulboesponjoso e retrator do pênis. As glândulas acessórias são as glândulas vesiculares, bulbouretrais e prostática (figura 1) (HAFEZ, HAFEZ, 2004).



**Figura 1.** Anatomia do aparelho genital do garanhão (BETTENCOURT *et al.*, 2018).

O órgão conhecido como escroto encontra-se localizado abaixo da região pubiana e não é visível de forma lateral por se encontrar oculto pelas coxas. Possui uma forma geralmente arredondada, sendo assimétrico e dividido por uma linha externa que se estende para cima até o prepúcio e para baixo até o períneo. A pele que reveste o escroto é fina, flexível, possui poucos pelos e normalmente apresenta uma pigmentação acentuada, além de possuir um aspecto brilhante devido à presença de secreção sebácea. As camadas mais profundas da parede do escroto seguem a estrutura típica esperada (pele, túnica dartos, fáscia escrotal e túnica vaginal. Esta última é composta por dois folhetos, o parietal e o visceral (SOARES, 2009; DYCE, SACK, WENSING, 2010).

Os testículos possuem uma forma irregularmente elipsoide e são ligeiramente achatados de um lado para o outro. Geralmente eles se posicionam com seu eixo longo na horizontal, mas podem ficar quase verticais durante contrações intensas dos músculos cremaster, que estão ligados à túnica vaginal próxima aos polos cranianos. A túnica albugínea é menos espessa em comparação aos ruminantes e os testículos são suavemente comprimidos, no entanto, o parênquima de cor rosa-acinzentada é mantido sob uma certa pressão e se projeta quando há qualquer incisão na túnica. Os septos que se estendem internamente a partir da cápsula não se unem para formar um mediastino visivelmente evidente (HAFEZ, HAFEZ, 2004; BETTENCOURT *et al.*, 2018).

O epidídimo está localizado ao longo da margem dorsal e se projeta um pouco além dos polos do testículo, onde está firmemente fixado. Ele forma uma estrutura distintiva em formato de bolsa testicular, que se abre lateralmente. O ligamento da cauda do epidídimo é bastante espesso e deve ser cortado durante a castração pelo método "aberto". Crescimentos semelhantes a verrugas (apêndices testiculares) no testículo, perto da cabeça do epidídimo, são muito comuns, sendo remanente dos ductos paramesonéfricos (DYCE, SACK, WENSING, 2010; BETTENCOURT *et al.*, 2018).

O cordão espermático é amplo e fino na região de inserção no testículo, mas

se torna mais arredondado ao se dirigir em direção ao anel inguinal superficial. A parte vascular cranial é claramente distinta da parte caudal, onde o ducto deferente está localizado. Esses componentes seguem uma direção divergente em relação ao seu ingresso no abdome. Em seguida, o ducto deferente atravessa a face dorsal da bexiga urinária, ao lado da margem medial da glândula vesicular, antes de penetrar na próstata para alcançar a uretra (HAFEZ, HAFEZ, 2004; DYCE, SACK, WENSING, 2010).

Os ductos deferentes adentram a parede uretral próximo à origem da uretra na bexiga urinária. Cada um desses ductos se junta ao ducto da glândula vesicular adjacente, formando assim um único canal chamado ducto ejaculatório. Este ducto possui apenas alguns milímetros de comprimento e desemboca lateralmente na uretra, próximo ao espessamento dorsal conhecido como colículo seminal (BETTENCOURT *et al.*, 2018).

O pênis do cavalo é composto pela tríade de estruturas comuns e pertence ao tipo musculocavernoso. Os dois elementos dorsais, conhecidos como pilares do pênis, originam-se do arco isquiático, dobram-se para a frente entre as coxas e se unem em um único corpo cavernoso. Esse corpo cavernoso é dividido em sua porção proximal por um septo mediano, que reflete sua origem composta. Conforme o septo se estende em direção à ponta do pênis, ele se torna menos proeminente e, eventualmente, desaparece. O corpo cavernoso tem uma leve compressão lateral e apresenta um sulco ventral que acomoda o terceiro corpo erétil, conhecido como corpo esponjoso (HAFEZ, HAFEZ, 2004; DYCE, SACK, WENSING, 2010).

O prepúcio (ou bainha) do cavalo apresenta uma característica distintiva ao possuir uma dobra adicional chamada de prega prepucial, que permite um considerável aumento do tamanho do pênis durante a ereção. A abertura para essa bainha interna está localizada dentro do orifício prepucial. O revestimento interno do prepúcio contém várias glândulas e está constantemente impregnado por suas secreções, conhecidas como esmegma (HAFEZ, HAFEZ, 2004).

As glândulas vesiculares do cavalo, localizadas dentro da dobra genital, são também conhecidas como vesículas seminais devido à sua superfície lisa em forma de pera. Medem aproximadamente 12 cm de comprimento, com um amplo lúmen central (BETTENCOURT *et al.*, 2018).

A próstata, predominantemente retroperitoneal e completamente compacta, apresenta dois lobos laterais unidos por um istmo estreito que atravessa a superfície dorsal da uretra, próximo ao colo vesical. Cada lobo lateral está em contato direto com a margem da uretra e se estende cranialmente ao longo da margem caudolateral da glândula vesicular adjacente. Devido à sua consistência firme e lobulada, as duas glândulas podem ser facilmente distinguidas durante o exame retal. Numerosos ductos saem da próstata e se abrem na uretra por pequenas aberturas ao lado do colículo (BETTENCOURT *et al.*, 2018).

O par de glândulas bulbouretrais está localizado dorsolateralmente à uretra na saída pélvica. Elas são levemente envolvidas por músculo estriado



(bulboglandular), medem cerca de 4 cm de comprimento e têm suas extremidades caudais pontiagudas convergentes. Essas glândulas liberam secreções através de vários poros que se abrem na uretra, onde esta deixa a pelve (DYCE, SACK, WENSING, 2010).

### 3.3 Fisiologia da reprodução

A espermatogênese é um processo complexo que ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos. Na espécie equina, assim como ocorre nos mamíferos domésticos, a espermatogênese começa na puberdade e continua por toda a vida do garanhão. Do ponto de vista funcional, o testículo equino é dividido em lóbulos, cada um contendo de um a três túbulos seminíferos. Nos túbulos seminíferos as células germinativas se diferenciam e amadurecem formando os espermatozóides (FIGUEIRÓ *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2019).

A atividade reprodutiva dos garanhões não segue uma estação definida e é possível coletar sêmen ao longo de todo o ano. No entanto, observam-se variações sazonais consideráveis em diversas características do sêmen, como tempo de reação, número de montas por ejaculado, volume da fração sem gel, número total de espermatozóides por ejaculado, aglutinação espermática e motilidade, tanto no sêmen fresco quanto diluído. Dessa forma, os efeitos sazonais têm um impacto maior no plasma seminal do que nos espermatozóides (HAFEZ, HAFEZ, 2004).

Histologicamente, a espermatogênese é definida com um conjunto de divisões celulares cuja finalidade é a formação do gameta masculino. Sua duração é de aproximadamente 57 dias, sendo dividida em três etapas ou fases (JUNQUEIRA, 2008; SOARES, 2009; RUA *et al.*, 2014):

1. Espermatocitogênese (proliferativa): fase onde as espermatogônias sofrem mitose para produzir dois tipos de células filhas: espermatogônias tipo A e tipo B. As do tipo A fazem a autorrenovação, enquanto as do tipo B passam por divisão mitótica para formar os espermatócitos primários (Prófase I de meiose), que possui 46 cromossomos. Na fase púbere, a prófase I progride para meiose I, produzindo dois espermatócitos de segunda ordem, com 23 cromossomos, que se direciona para meiose II. Nessa meiose II, cada espermatócito de segunda ordem resulta em duas espermatídes haplóides;
2. Espermiogênese (diferenciação): fase onde cada espermatíde se transforma em espermatozoide, com modificações morfológicas e estruturais. O núcleo forma a cabeça do espermatozoide, o complexo de Golgi produz a vesícula acrossômica. O flagelo cresce a partir dos centríolos, concentrando as mitocôndrias na sua porção proximal. O

movimento do flagelo envolve a interação dos microtúbulos e as proteínas energéticas;

3. Espermição: fase onde os espermatozoides são liberados no lúmen do túbulo seminífero, finalizando seu processo de produção. A partir daqui, os espermatozoides são transportados para o epidídimo para posterior maturação e armazenamento (figura 2).

RUA et al (2014) aponta outra forma de subdivisões, que são fase mitótica, fase meiótica e fase de diferenciação. A espermição é separada da fase proliferativa propriamente dita.

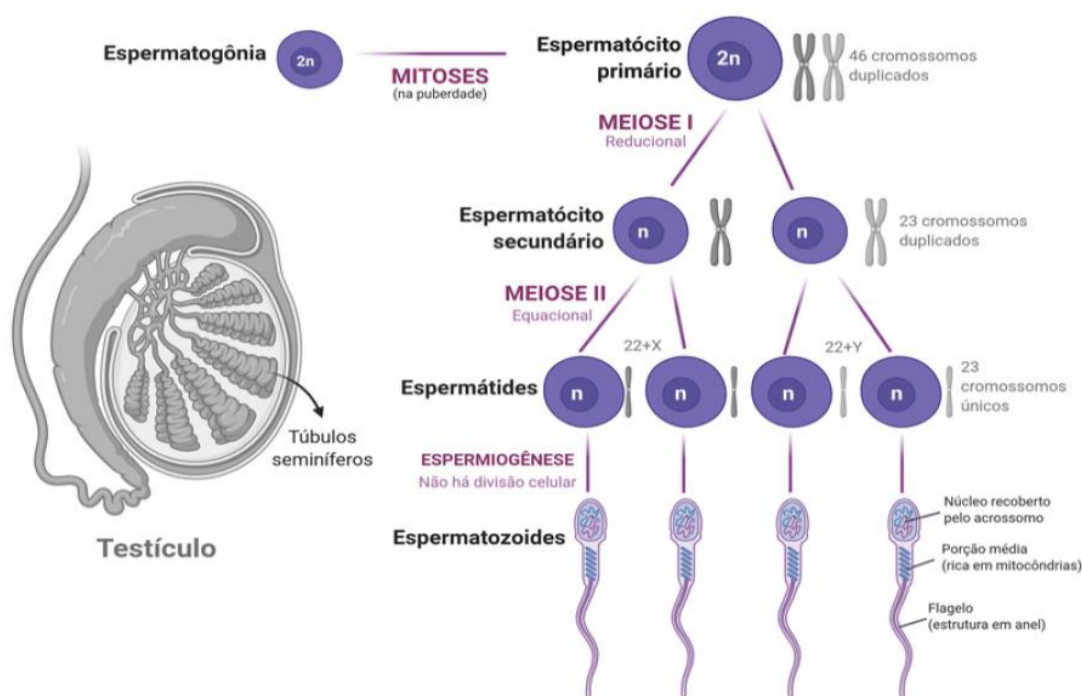


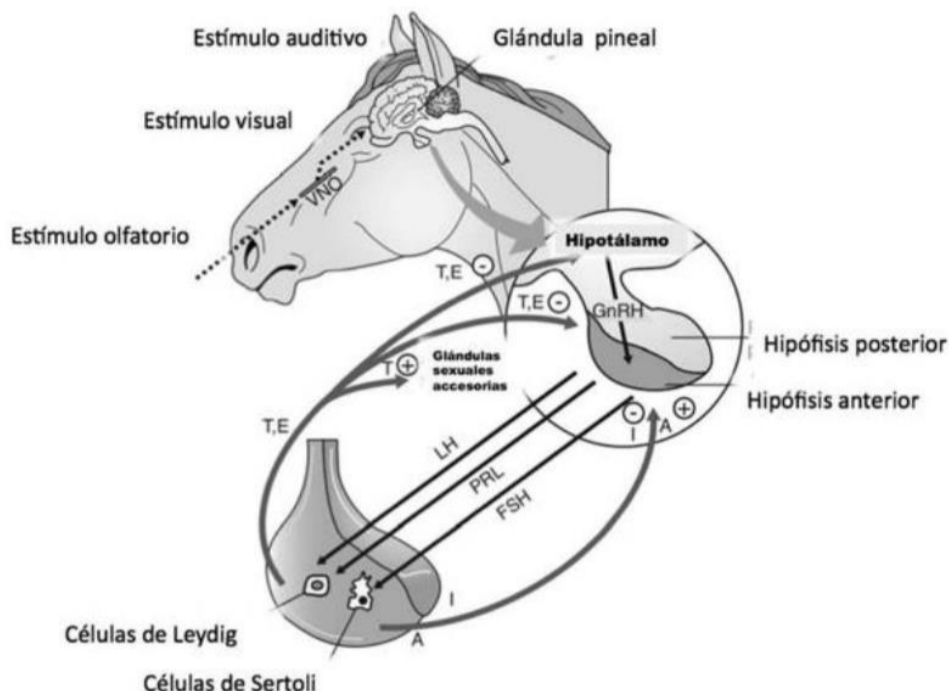
Figura 2. Espermatogênese (BARROS, 2021)

Vale salientar que a fase de capacitação dos espermatozoides ocorre durante sua passagem pelo epidídimo e possivelmente finalizada no trato reprodutor feminino para que ele consiga penetrar no óvulo. Esse efeito de capacitação envolve as condições do ambiente, como o contato com o estrógeno no sistema reprodutor da égua, permitindo a reação acrossômica (SOARES, 2009).

Estudos recentes têm contribuído para o aprofundamento da regulação da espermatogênese na espécie equina. Oliveira, Morelli e Coutinho (2019) descobriram que a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento e diferenciação de células germinativas foi regulada diferencialmente em garanhões com alta e baixa qualidade de sêmen. Isso sugere que a regulação da espermatogênese pode desempenhar um papel na determinação da qualidade do sêmen na espécie equina.

O controle hormonal inicia com o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), pelo hipotálamo, em pulsos, fazendo com que a adeno-hipófise libere o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). O LH atua nas células de Leydig para a produção de testosterona, enquanto o FSH atua nas células de Sertoli e células germinativas estimulando a espermatogênese que é

finalizada no espermátocito de segunda ordem. Esse processo de regulação hormonal envolve mecanismos de retroalimentação, de acordo com a concentração dos hormônios circulantes (figura 3) (BETTENCOURT *et al.*, 2018; OLIVEIRA, MORELLI, COUTINHO, 2019).



**Figura 3.** Eixo hipofise-hipotálamo-gonadal do macho (OLIVEIRA, MORELLI, COUTINHO, 2019).

A testosterona estimula o crescimento e a função dos órgãos reprodutores e acessórios responsáveis pelas características masculinas secundárias, libido e início da maturação espermática. Sua atuação é tanto parácrina quanto endócrina (BETTENCOURT *et al.*, 2018).

A sazonalidade reprodutiva em equinos sofre influência do fotoperíodo, sendo a melatonina o principal hormônio regulatório, cuja produção ocorre em períodos menos luminosos, atingindo o seu ápice no meio da noite. Sua descoberta foi há aproximadamente 50 anos atrás, sendo o principal produto da glândula pineal, no cérebro (LANÇONI, 2015).

A melatonina influencia a resposta reprodutiva dos equinos às condições do ambiente, assim como o ritmo circadiano. O fotoperíodo associado a outros sincronizantes (temperatura, alimentação, chuva, água, salinidade), bem como os fenômenos ambientais, possuem forte influência em moldar esses biorritmos. Dessa forma, o eixo hipofise-hipotálamo-gonadal é modulado pela melatonina, com a ativação de receptores próprios em diferentes locais, como os neurônios hipotaâmicos liberadores de GnRH, hipófise anterior, gonadotrofos e lactotrofos da hipófise posterior e testículos (NEVES, 2014; LANÇONI, 2015).

### 3.4 Comportamento reprodutivo, índole e bem estar do garanhão

Durante a avaliação do potencial reprodutivo de garanhões é importante observar o comportamento durante a cópula ou a coleta de sêmen. Vários fatores podem afetar o comportamento dos garanhões durante o cortejo e a cópula, fato

que pode comprometer sua capacidade reprodutiva (OLIVEIRA, MORELLI, COUTINHO, 2019).

O comportamento apresentado aponta sobre a organização social, cortejo, acasalamento, cuidados da mãe durante o parto, com sua prole e amamentação. O processo de domesticação contribuiu para essas alterações comportamentais, modificando suas condições genéticas, fisiológicas, ambientais e manejo. Nesse sentido, o tratador ou o profissional identificará possíveis distúrbios psicológicos ou emocionais que exijam atenção na hora de uma monta natural ou de coleta de sêmen (ALVES, 2015; PETRUCI, BECEGATTO, 2022).

Comparando-se garanhões de raças selvagens com os domesticados, observa-se que os domesticados se limitam às interações pré-cópula. Após a aproximação de uma égua no cio, o comportamento normal de um garanhão domesticado pode incluir vocalização, investigação olfatória e tátil, bem como o reflexo de flehmen. A maioria dos garanhões apresenta ereção em até 2 minutos e realiza a monta cerca de 5-10 segundos após a ereção. Normalmente, os garanhões ejaculam após a primeira monta, e a duração total do cortejo e cópula varia de 2 a 5 minutos (OLIVEIRA, 2014).

O garanhão possui uma postura altiva, imponente, com traços de agressividade quando na presença de uma égua no cio ou de um manequim artificial no momento da coleta de sêmen, comportamento este de sua natureza. A linguagem corporal permite avaliar a índole e a necessidade de contenções físicas mínimas, como baias e cabrestos (ALVES, 2015; DE OLIVEIRA, 2021).

### **3.5 Avaliação Andrológica**

A avaliação andrológica tem como principal objetivo avaliar a capacidade reprodutiva dos garanhões, verificando a qualidade do sêmen e outras características reprodutivas que indicam a saúde reprodutiva do animal. É recomendado realizar esse exame em todos os machos do plantel, incluindo animais jovens, como uma medida preventiva (WHINTER, 2014).

Muitas vezes, o exame andrológico é solicitado somente quando há uma falha reprodutiva do garanhão ou algum problema específico na genitália externa. No entanto, o ideal seria realizar o exame andrológico no início de cada temporada de monta de forma preventiva. Além disso é importante realizar o exame ao comprar ou vender um garanhão (WHINTER, 2014).

A Identificação consiste no registro básico do animal, como nome, microchip, idade, raça, tutor, criador e uma resenha. O histórico clínico envolve todo o histórico médico do paciente, como alimentação, vacinas aplicadas, ferrações, problemas em sistemas fisiológicos, cruzas e número de éguas que gestaram e foram bem sucedidas no parto, bem como medicações utilizadas (SOARES, 2009).

O exame físico geral, associado ao exame do sistema reprodutor masculino, envolve a observação da condição geral do animal, como frequência cardíaca,

respiratória, temperatura retal e hidratação. Além disso, deve-se realizar auscultação torácica e abdominal, identificar possíveis alterações do sistema músculo esquelético que possam afetar a monta, o sistema visual, e problemas hereditários. Exames complementares podem ser necessários, como hemograma, bioquímicos sanguíneos, urinálise e parasitológico de fezes (BETTENCOURT *et al.*, 2018).

A interação envolve um conjunto de comportamentos entre macho e fêmea no cio que estimula o macho ter ereção e realizar a cópula. Pelo manejo, algumas atitudes são consideradas desnecessárias na pré-cópula, o que levou a escolher garanhões mais rápidos em copular e com elevada libido. Por isso, passou-se a observar o tempo entre o contato com a fêmea e a ereção, monta e ejaculação para inferir o nível de libido dos garanhões (ALVES, 2015; PETRUCI, BECEGATTO, 2022).

A posição dos testículos está inclinada, com a região cranial localizada em plano discretamente superior a porção caudal. A largura escrotal é a medida mais adequada, para uma mensuração única. Além dessa, é interessante registrar o comprimento, a altura e a largura dos testículos, pois através desse conjunto de valores, pode-se inferir a produção espermática diária esperada. Essas medidas são influenciadas por diversos fatores, como condições fisiológicas (CBRA, 2013).

A cabeça do epidídimo se adere ao polo cranial do testículo e seu corpo segue na face latero-dorsal até o polo caudal. As ampolas dos canais deferentes podem variar de acordo com a idade e a raça, situando-se medialmente às glândulas vesiculares, lisa e com consistência tensa-elástica (CBRA, 2013).

As glândulas vesiculares são alongadas, lisas e simétricas, variando de acordo com o grau de estimulação sexual e idade. A próstata possui um corpo que se liga à uretra, sendo palpáveis as suas porções laterais. A bulbouretral está próxima ao esfíncter anal, sendo uma proeminência tensa-elástica em torno da uretra (CBRA, 2013).

### **3.5.1 Avaliação do sêmen ou espermograma**

Diante da importância de acelerar o melhoramento genético dos rebanhos e da necessidade de multiplicar animais de elevado mérito genético, as tecnologias de reprodução assistida na espécie equina têm sido amplamente utilizadas (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2018ab). No entanto, ainda existem desafios a serem superados, até mesmo na inseminação artificial (IA) que foi a primeira tecnologia de reprodução assistida aplicada na espécie equina (TANGA *et al.*, 2021).

Várias pesquisas utilizando testes laboratoriais cada vez mais precisos têm sido realizadas, objetivando prever o potencial de fertilidade do sêmen. Apesar de todos os avanços, a avaliação dos parâmetros seminais continua sendo uma tarefa desafiadora, tendo em vista que cada espermatozóide possui vários compartimentos com diferentes funções (FERREIRA *et al.*, 2018). Determinar o

verdadeiro número de espermatozóides capazes de fecundar um oócito requer a avaliação simultânea de várias características em cada espermatozóide (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

No Brasil, os critérios de avaliação do sêmen são preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, em seu Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, onde os principais aspectos a serem avaliados no sêmen são as características físicas e morfológicas (CBRA, 2013).

Assim, a partir da coleta, inicia-se a avaliação propriamente dita do sêmen envolvendo diversos parâmetros, como cor, odor, consistência, volume filtrado, pH, concentração, contagem em hemocitômetro motilidade, morfologia (CBRA, 2013).

### 3.5.2 Colheita de sêmen

A colheita de material sofre forte influência da libido e de fatores ambientais e comportamentais. O local da coleta deve ser limpo, amplo, silencioso e com piso antiderrapante. Os equipamentos que entram em contato com o sêmen devem ser aquecidos a 37° C. A forma mais comum de colher o sêmen equino é através da vagina artificial, utilizando-se um manequim artificial ou uma égua para o garanhão realizar a monta (figura 4) (OLIVEIRA, MORELLI, COUTINHO, 2019).



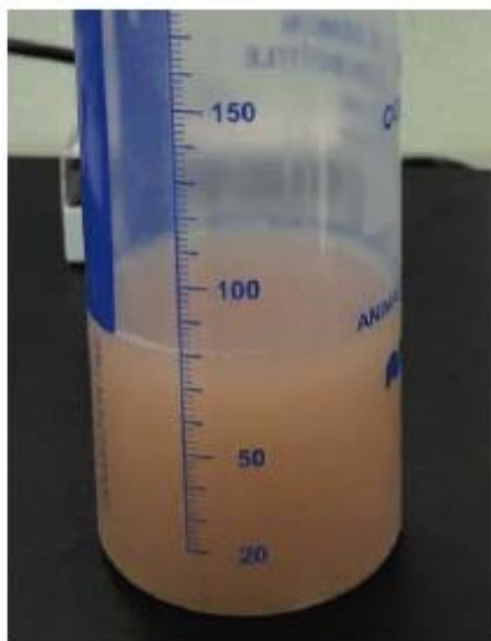
**Figura 4.** Coleta de sêmen em égua pareada e em manequim (BETTENCOURT *et al.*, 2018)

O garanhão deve ser preparado para a coleta antes da monta, seja para utilizar o sêmen na inseminação artificial ou monta natural. Inicialmente o pênis é higienizado com água morna para facilitar a remoção do esmegma aderido e posteriormente utiliza-se papel umedecido da base do pênis até a glândula. Essa prática tem como objetivo minimizar a contaminação e posterior infecção do trato reprodutor da égua. A secagem é realizada no sentido oposto, seguindo da fossa da glândula, glândula, corpo e base do pênis (BETTENCOURT *et al.*, 2018).

### 3.5.3 Características físicas no sêmen

No espermograma, o volume, expresso em mililitros depende do método de coleta utilizado, do tempo de excitação e do regime de serviços prévios.

Imediatamente após coleta, o sêmen é avaliado quanto a cor, que depende da concentração espermática, odor (*suis generis*) e aparência que pode ser cremosa, leitosa, opalescente, serosa ou aquosa. A cor pode variar se houver presença de sangue, celularidade, detritos, pus e urina (figura 5) (BARROS, 2021).



**Figura 5.** Coloração avermelhada indicativa de hemoespermia (BETTENCOURT *et al.*, 2018).

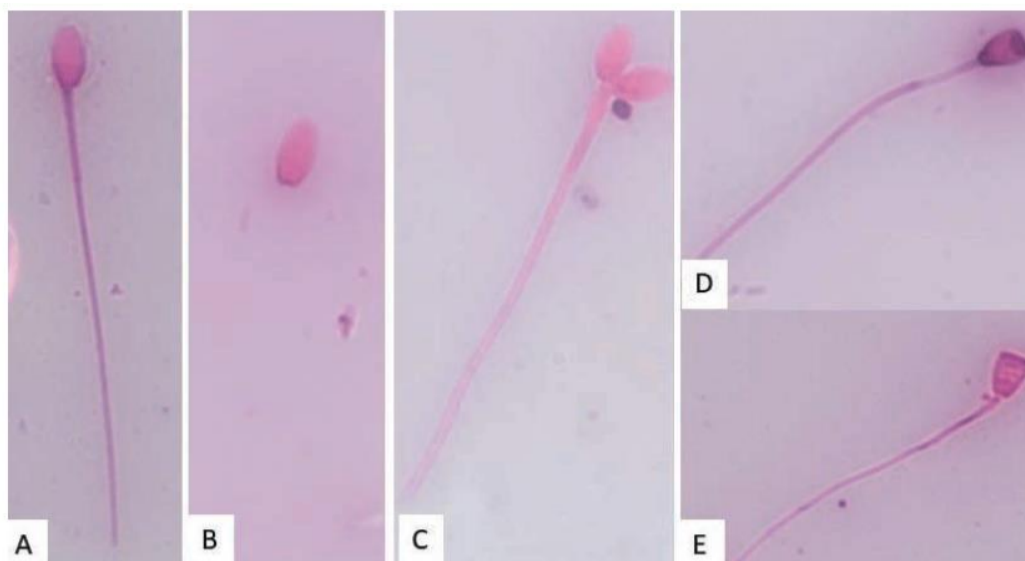
O turbilhonamento ou movimento de massa não é avaliado no sêmen de equinos porque o volume, média de 60 ml, é muito elevado em relação a concentração espermática média que é de  $9 \times 10^9$  (ARRUDA *et al.*, 2011).

O vigor envolve a força do movimento e a velocidade do espermatozoide, classificado entre zero e cinco. Para interpretação, o zero apresenta ausência de movimento progressivo e deslocamento de cauda lateral fraco, enquanto o cinco é um espermatozoide com movimento vigoroso e velocidade progressiva. Em equinos, o vigor médio deve ser igual ou maior que 3 (CBRA, 2013).

A motilidade espermática é um dos parâmetros mais utilizado para a avaliar a qualidade do sêmen independentemente da espécie (HARRIS *et al.*, 2023). Esse fato é justificado por ser um método prático e de baixo custo, tendo em vista que o percentual total de células móveis pode ser facilmente determinada em microscópio ótico comum (BUSS; AURICH; AURICH, 2019; HARRIS *et al.*, 2023).

Para tanto, o microscópio deve estar na objetiva entre 10x e 40x com lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C durante o processo. A motilidade de 70% é o ideal para utilização na reprodução, assim como a visualização de espermatozoides normais em 70%, com número de ejaculados por semana entre 3 e 10 (figura 6) (ARRUDA *et al.*, 2011).

Apesar de prático, continua sendo um método subjetivo e a sua eficiência está intimamente atrelada a experiência do avaliador. Por esse motivo, a avaliação automatizada da motilidade espermática começou a ser estudada em 1992 e alguns sistemas de análises computadorizados (CASA – Computer Assisted Sperm Analyses) têm sido pesquisados devido a importância da cinética espermática sobre o potencial da fertilidade dos espermatozoides (BUSS; AURICH; AURICH, 2019).

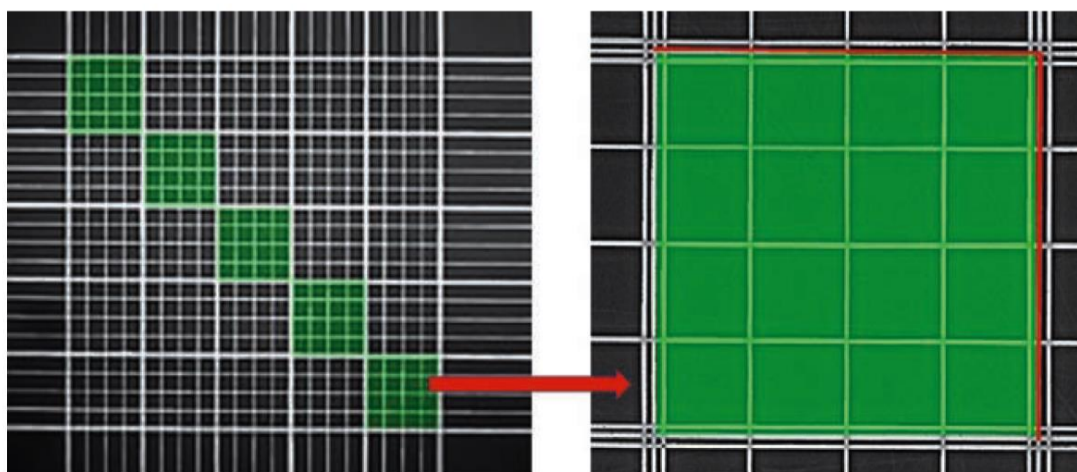


**Figura 6.** Alterações da morfologia dos espermatozoides. **A.** espermatozoide normal; **B.** cabeça destacada; **C.** cabeça dupla; **D** e **E.** anomalia do acrossoma (BETTENCOURT *et al.*, 2018)

A determinação da concentração espermática é um dos métodos mais importantes para prever a fertilidade de um reprodutor (TANGA *et al.*, 2021). Para avaliar a concentração, a diluição desejada é de 1:10 (ou seja, 0,1 ml de sêmen para 0,9 ml de formol citrato) a 1:100 (0,1 ml de sêmen para 9,9 ml de formol citrato), de acordo com seu aspecto. Nesse parâmetro, a concentração sofre influência de fatores extrínsecos (método de coleta, frequência de atividade e condicionamento) e intrínsecos (idade, tamanho e estado de higiene testicular), conforme sugerido por Arruda (2011).

Para a aprovação do ejaculado equino em vagina artificial é convencionalmente apresentar concentração espermática de 100 a 200  $\times 10^6$  /ml, motilidade maior do que 60% e espermatozoides normais superior a 70% (CBRA, 2013).

Rotineiramente, a determinação da concentração espermática utiliza hemocítmetro, conhecido também como câmara de Neubauer, sendo o método mais adotado (figura 7) (FREITAG *et al.*, 2020). Nesse tipo de avaliação uma fração do ejaculado é diluído, geralmente em formol salina tamponada, na proporção de 1:10 ou 1:100 a depender do aspecto do sêmen.



**Figura 7.** Câmara de Neubauer modificada. Contam-se os espermatozoides localizados na linha superior e direita (linhas vermelhas) (BETTENCOURT *et al.*, 2018).

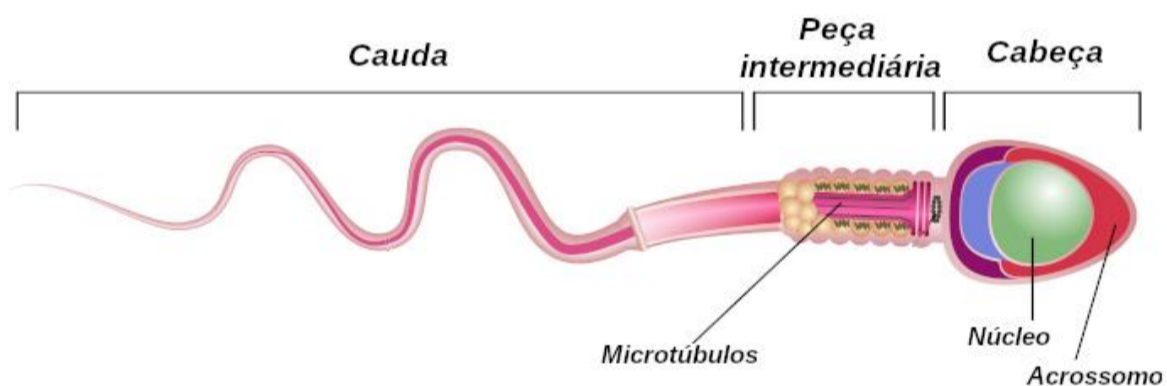


Após a diluição e homogeneização da amostra, uma fração do semen diluído é colocado na câmara de Neubauer, posteriormente com o auxílio microscópio óptico é realizada a leitura (CBRA, 2013). De um modo geral, fatores como o método e a frequência da coleta, bem como a idade e o tamanho testicular, podem influenciar na concentração (BARBOSA e MACHADO, 2005).

No entanto, existem outros equipamentos mais modernos como o sistema de análise computadorizado de sêmen (CASA). O CASA é um sistema computacional utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas (VALVERDE; BARQUERO; SOLER, 2020). Esse método fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (BUSS; AURICH; AURICH, 2019; VALVERDE; BARQUERO; SOLER, 2020).

### 3.5.4 Características morfológicas e classificação das anormalidades

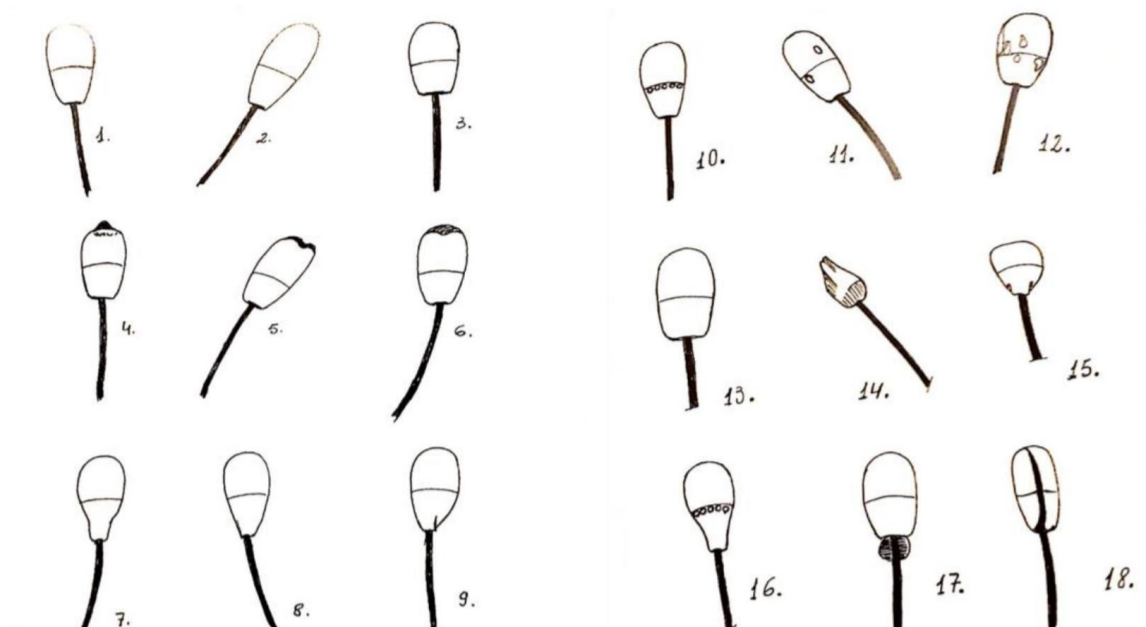
O espermatozoide, em sua morfologia, possui cabeça, peça intermediária e cauda (figura 8). A cabeça tem forma elíptica, contendo em seu interior o núcleo (guarda o código genético paterno, ocupando a maior parte do espaço), o acrossoma (material responsável por provocar reações durante a fecundação) e o citoplasma. Em seguida, existe o flagelo, dividido em colo, peça intermediária (contendo mitocôndrias para a realização do movimento), peça principal e peça terminal (SILVA *et al.*, 2017; BARROS, 2021).



**Figura 8.** Divisão do espermatozoide

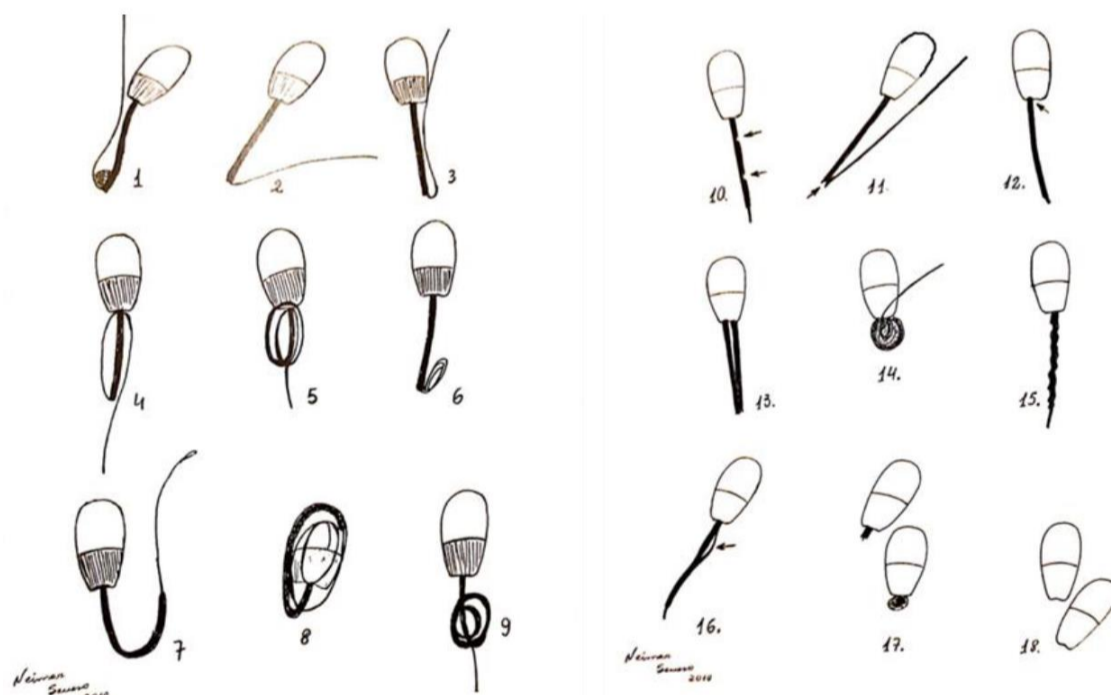
**Fonte.** <https://mundoeducacao.uol.com.br/biologia/espermatozoides.htm>

Os defeitos maiores ocorrem no início da espermatogênese, sendo responsável por maior impacto na capacidade fecundante do espermatozoide. Dentre elas são observadas cauda fortemente dobrada, cabeça piriforme, gotas citoplasmáticas proximais e espermatozoides subdesenvolvidos (figura 9) (OLIVEIRA, MORELLI, COUTINHO, 2019).



**Figura 9.** Representação dos defeitos espermáticos em cabeça: 1, 2 e 3 cabeças normal com suas variações; 4, 5 e 6 grânulos no acrossoma e suas variações; 7 piriforme; 8 e 9 estreitos na base e sua variação; 10, 11 e 12 aspecto de diadema, vacúolos e suas variações; 13 cabeça gigante; 14 e 15 cabeça pequena anormal; 16 cabeça piriforme com diadema; 17 gota citoplasmática proximal e 18 cabeça com crista nuclear (OLIVEIRA, MORELLI, COUTINHO, 2019)

Já os defeitos menores revelam que os problemas ocorrem na fase final da espermatogênese e/ou manipulação do material coletado, com pouco impacto na capacidade fecundante do espermatozoide. Os defeitos menores são gota citoplasmática distal, cauda levemente enrolada ou dobrada, cabeça gigante e cabeça pequena (figura 10) (OLIVEIRA, MORELLI, COUTINHO, 2019).



**Figura 10.** Representação dos defeitos espermáticos de cauda: 1 cauda dobrada com gota distal; 2 cauda dobrada simples; 3 cauda dobrada; 4 cauda fortemente dobrada; 5 cauda fortemente enrolada envolvendo a peça intermediária; 6 cauda dobrada na porção terminal; 7 peça intermediária encurvada; 8 cauda enrolada na cabeça; 9 peça intermediária fortemente enrolada; 10 aplasia segmental da peça intermediária; 11 peça intermediária fraturada; 12 implantação abaxial; 13 cauda dupla ou formas teratológicas; 14 defeito de Dag; 15 peça intermediária em saca-rolha; 16 pseudogota; 17 agenesia de peça intermediária e 18 cabeça isolada normal.

Os principais defeitos são localizados na cabeça e/ou cauda (peça intermediária, peça principal). Saliencia-se que a inserção abaxial no espermatozoide equino não é considerada anormalidade (SILVA *et al.*, 2017).

### 3.5.5 Exames complementares

Os testes de termorresistência incluem o lento e o de sêmen resfriado. No termo-resistência lento, coloca-se a amostra em banho maria (38° C) e a motilidade espermática progressiva é registrada a cada uma hora. No caso do sêmen congelado, a motilidade deve durar pelo menos três horas após o descongelamento. No sêmen resfriado, a amostra já diluída é colocada a 5 °C e avaliada a cada 24 horas, devendo apresentar motilidade mínima de 30% (CBRA, 2013).

A microbiologia é indicada para avaliar a presença dos patógenos associados a infertilidade como *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Klebsiella sp*, *Taylorella equigenitalis*. Para tanto, os resultado das amostras coletadas das secreções genitais adequadamente acondicionadas devem ser associados ao quadro clínico apresentado (CBRA, 2013).

A Sorologia é utilizada quando se tem problemas no sistema reprodutor e o objetivo é identificar a presença de anticorpos específicos. Os agentes etiológicos mais identificados são *Trypanosoma equiperdum*, *Arteriviridae*, *Taylorella equigenitalis* e *Herpesvírus eqüino* tipo 1 (CBRA, 2013).

### 3.6 Critérios para seleção de reprodutor

Os padrões desejáveis da seleção de garanhões para monta natural envolvem dois princípios comportamentais, sendo elas a libido e a capacidade de serviço. A libido relaciona-se com a disposição do macho ante a fêmea no cio e a capacidade de serviço seria a habilidade do macho em realizar a monta e copular. Tais princípios podem variar com a raça, sanidade, concentração hormonal e idade (PETRUCI, BECEGATTO, 2022).

Bettencourt *et al* (2018) acrescentam que no relatório sobre o perfil de fertilidade deve constar que os animais devem ser livres de doenças hereditárias, apresentar os testículos na bolsa escrotal medindo minimamente 8 cm de diâmetro e produzir uma concentração mínima de  $1,1 \times 10^9$  espermatozoides móveis normais. Além disso, devem ser livres de agentes patológicos (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Taylorella equigenitalis*) e, caso ocorra e não responda à terapêutica de eleição, pode-se utilizar a inseminação artificial e técnicas de contaminação mínima.

### 3.7 Critérios para seleção de sêmen

Como descrito anteriormente, características com motilidade, concentração

e morfologia espermática são parâmetros utilizados na rotina para verificar a qualidade do sêmen (MANTOVANI *et al.*, 2002). No entanto, quanto mais estudos forem realizados, mais informações poderão ser obtidas. No caso de espermatozoides submetidos a criopreservação, além dos testes de rotina é importante avaliar a viabilidade espermática e do DNA, bem como o funcionamento da membrana plasmática dos espermatozoides.

A seguir, pode-se compreender outros parâmetros utilizados no processo de seleção do sêmen.

### **3.7.1 Morfologia espermática**

Como descrito anteriormente, em equinos é desejável a obtenção de uma quantidade igual ou superior a 70% de espermatozoides morfologicamente normais para ejaculados coletados através de vagina artificial e 60% para dose de espermatozoides refrigerados e congelados (CBRA, 2013).

Em geral, as alterações das células espermáticas podem ser classificadas em defeitos maiores ou menores, primárias ou secundárias e também de acordo com o segmento afetado do espermatozoide (cabeça, peça intermediária e peça principal). Ainda que a morfologia espermática dos equídeos seja semelhante a morfologia das demais espécies, a cabeça do espermatozoide apresenta formato assimétrico, o acrossoma é pouco desenvolvido e a inserção abaxial da cauda pode ser considerada normal (CBRA, 2013; HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al.*, 2022).

A morfologia espermática é rotineiramente avaliada através da técnica de câmara úmida e a leitura da lâmina feita com microscopia de contraste de fase com objetiva de 100x, sob óleo de imersão ou podem ser analisados através de esfregaços corados em microscópio óptico também sob imersão (CBRA, 2013). Entretanto, nos equinos, como o acrossomo é pouco desenvolvido, possíveis alterações estruturais são muito difíceis de serem identificadas (APARICIO *et al.*, 2023). Por essa razão, outros métodos utilizando esfregaços corados com Rosa de Bengala, Giemsa e Eosina-Nigrosina, são mais adequados (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2018ab ; HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al.*, 2022).

### **3.7.2 Integridade da membrana plasmática**

A manutenção da integridade da membrana plasmática é crucial para o bom funcionamento e fertilidade do espermatozoide. A membrana plasmática atua na manutenção da homeostase, proteção contra agentes estranhos e favorece as interações com outras células, incluindo oócitos e tecido epitelial do trato reprodutivo da fêmea (LEEMANS *et al.*, 2019; AKBARINEJAD *et al.*, 2020). Além disso, é fundamental durante a capacitação, a reação acrossômica e zona de ligação (GUAUSTI *et al.*, 2020; AKBARINEJAD *et al.*, 2020).

Diante de sua importância, vários testes têm sido realizadas para avaliar a

permeabilidade da membrana. Dentre os métodos mais utilizados destacam-se o teste hiposmótico, o de coloração eosina-nigrosina e o uso de sondas fluorescentes (QUINTELA *et al.*, 2018; SONI *et al.*, 2019; McCUE *et al.*, 2021; GACEM *et al.*, 2021). Sondas fluorescentes como Hoechst ou iodeto de propídio (PI) são utilizadas isoladas ou em conjunto com outros fluorocromos permeáveis, como diacetato de carboxifluoresceína ou SYBR (HERNÁNDEZ-AVILÉS; RAMÍREZ-AGÁMEZ; MAKLOSKI-COHORN, 2021).

### **3.7.3 Viabilidade espermática**

A viabilidade espermática desempenha um papel crucial na avaliação da qualidade e é um requisito fundamental para uma fecundação bem-sucedida. Essa viabilidade parece ser importante especialmente durante a utilização de tecnologias de reprodução assistida como a inseminação artificial. Esse fato é decorrente do reduzido número de espermatozoides utilizados na IA (FERREIRA *et al.*, 2019).

Dentre os principais métodos usados para avaliação da viabilidade espermática, os métodos de coloração merecem destaque (FERREIRA *et al.*, 2018). A coloração de eosina-nigrosina tem sido convencionalmente empregada como um corante diferencial para avaliar a proporção de espermatozoides vivos e mortos (TANGA *et al.*, 2021). A eosina, como corante celular, colore o espermatozoides morto com membranas plasmáticas danificadas, enquanto o espermatozoides vivo permanece incolor e a nigrosina mancha o fundo. Vários outros corantes foram utilizados, no entanto, nenhum desses métodos produziu resultados satisfatórios como aqueles utilizando a coloração de eosina-nigrosina (RESTREPO *et al.*, 2019/2022).

### **3.7.4 Integridade do acrossoma**

A integridade acrossomal é um fator crítico para a fertilidade, uma vez que o espermatozoide deve ter um acrossoma intacto e exibir reações oportunas ao atingir o local da fecundação (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2018; HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al.*, 2022). Um teste ideal para analisar o status acrossômico do esperma deve ser preciso, rápido, aplicável a amostras com baixa contagem de espermatozoides, seguro para a função espermática e capaz de distinguir reações acrossômicas normais das falsas (HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al.*, 2022).

### **3.7.5 Integridade mitocondrial**

A manutenção da integridade da mitocondria é fundamental para a correta função do espermatozoide. Qualquer alteração dessa organela afeta a motilidade e a maturação do espermatozoide (MEYERS; BULKELEY; FOUTOUHI, 2019). A função mitocondrial pode ser medida utilizando-se corantes como a fluorescência da rodamina (BARBAGALLO *et al.*, 2020). Esse corante se difunde na célula

espermática e se acumula nas mitocôndrias, permitindo a detecção de danos mitocondriais funcionais. Além da rodamina, os corantes JC-1 ou Mitotracker podem ser usados para a avaliação das mitocôndrias do espermatozoide (BARBAGALLO *et al.*, 2020; TALLURI *et al.*, 2021; GIARETTA *et al.*, 2022).

### **3.7.6 Integridade da cromatina**

A integridade da cromatina espermática é crucial para a fertilidade, manutenção da gestação e subsequente bem-estar da prole (VIGOLO *et al.*, 2022). Além disso, a integridade da cromatina é vital para a fertilidade, tendo em vista que o índice de fragmentação de DNA mais alto tem sido associado à redução da fertilidade (NEUHAUSER *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2018/2019).

A avaliação da integridade da cromatina é realizada utilizando laranja de acridina, uma sonda de DNA com propriedades metacromáticas e princípios de citometria de fluxo (AL-KASS *et al.*, 2023). Nesse tipo de avaliação a cromatina intacta é corada de verde, enquanto a cromatina danificada aparece em laranja. Espermatozóides com proporções de vermelho para verde mais altas indicam maior desnaturação do DNA (NASIRABADI *et al.*, 2019; AL-KASS *et al.*, 2023).

### **3.7.7 Coloração supravital**

Para avaliação da infertilidade da membrana plasmática, o teste de coloração supravital é o mais utilizado. Com o auxílio de corantes derivados da fluoresceína, como a eosina e corantes de fundo como a nigrosina é possível determinar a integridade da membrana (PESSOA *et al.*, 2020). Quando a membrana está lesionada, a eosina penetra e cora o interior do núcleo do espermatozoide em vermelho (GUASTI *et al.*, 2020; ALVES *et al.*, 2021). Além dos corantes, também podem ser utilizadas sondas fluorescentes para identificar alterações estruturais e metabólicas no interior das células. A utilização de microscópio de epifluorescência torna esse método mais sensível e específico para avaliar a condição da célula (LANÇONI *et al.*, 2018).

### **3.7.8 Atividade da acrosina**

O acrossomo é uma organela situada na parte anterior da cabeça do espermatozoide que, além de proteger parcialmente o núcleo, é importante porque contém uma série de enzimas fundamentais para o processo de fecundação (HIROHASHI; YANAGIMACHI, 2018). Por esse motivo, alterações morfológicas em sua estrutura reduzem ou impedem a capacidade fecundante do espermatozoide (SIU *et al.*, 2021). Diante dessa importância, a determinação das enzimas presentes no acrossomo é um importante teste de sua funcionalidade (LIU *et al.*, 2022; APARICIO *et al.*, 2023).

A hialuronidase dissolve a camada intercelular do cumulus oophorus quando

o espermatozoide penetra no oócito (O'FLAHERTY, 2020). A neuraminidase atua exclusivamente sobre a corona radiata e a acrosina é responsável pela dissolução da zona pelúcida do oócito e bloqueio à polispermia (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2018ab). Diante da importância da acrosina no processo de fecundação, essa enzima tornou-se um critério adicional para avaliar o prognóstico da fertilidade dos espermatozoides (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2018ab; HIROSE *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2023).

### 3.7.9 Expressão gênica

O padrão de expressão gênica dos sêmen, em termos de indicadores de fertilidade definidos, é considerado um importante indicador de fertilidade. O perfil transcriptômico do sêmen tem assumido importância, pois carrega informações sobre espermatogênese, função espermática e papéis paternos em eventos pós-fertilização (BLOMMAERT *et al.*, 2019; GOSZCZYNSKI *et al.*, 2021). As técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) são as melhores devido à sua natureza mais quantitativa, mas sua principal limitação é a necessidade de conhecimento prévio das sequências gênicas a serem avaliadas (GILMORE *et al.*, 2023).

A maioria dos estudos sugerem que os níveis de RNA espermático podem ser usados para estudar os eventos anteriores da espermatogênese, função espermática e fertilização bem-sucedida (ZHU *et al.*, 2019; FIGUEROA *et al.*, 2020; PARDEDE *et al.*, 2022). Mudanças sutis nos transcritos e proteínas do esperma não são avaliadas como parte do procedimento padrão de avaliação do sêmen. Através da fertilização, esses espermatozoides aparentemente normais podem ainda ser prejudiciais para o desenvolvimento pós-fertilização, onde os RNAs dos espermatozoides desempenham um papel crucial (BLOMMAERT *et al.*, 2019; FIGUEROA *et al.*, 2020; PARDEDE *et al.*, 2022; GILMORE *et al.*, 2023).

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A área de reprodução animal vem se expandindo, em especial a da espécie equina que tem impacto socioeconômico no Estado de Pernambuco (tração, campeonatos de vaquejada e exposição). Nesse sentido, percebe-se a necessidade de maiores estudos sobre os impactos da avaliação andrológica nos haras dos pequenos produtores. Embora que as características avaliadas no espermograma estejam bem elucidadas, como exame físico do material coletado, identificação de alterações morfológicas e os impactos no processo de fecundação, é relevante ampliar os estudos em relação ao manejo e bem-estar dos reprodutores e sua relação com o tratador e os equipamentos para coleta (seja por vagina artificial ou monta natural). As pesquisas possuem um papel de relevância nesse contexto, por permitir a atualização dos profissionais e o reconhecimento e visibilidade desse mercado em expansão.



## REFERÊNCIAS

- AKBARINEJAD, V. *et al.* The relationship of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, adenosine triphosphate content, sperm plasma membrane integrity, and kinematic properties in warmblood stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 94, p. 103267, 2020.
- AL-KASS, Z. *et al.* Deciphering sperm chromatin properties to predict stallion sperm fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 250, p. 107200, 2023.
- ALVES, G. E. S. Aspectos de manejo e condições genitais que podem constituir ameaça á longevidade reprodutiva de garanhões. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.208-213, 2015. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n1/pag208-213%20\(RB543\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n1/pag208-213%20(RB543).pdf) Acesso em: 18 mai. 2023.
- ALVES, N C. *et al.* Addition of caffeine to equine thawed sperm increases motility and decreases nitrite concentration. **Andrologia**, v. 53, n. 2, p. e13918, 2021.
- PARICIO, I. M. *et al.* The Autophagy Marker LC3 Is Processed during the Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction and Translocates to the Acrosome Where It Colocalizes with the Acrosomal Membranes in Horse Spermatozoa. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 937, 2023.
- ARRUDA, R. P. *et al.* (2011). Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p.145-151, 2011. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n2/RB385%20Arruda%20145-151.pdf> Acesso em: 19 mai. 2023.
- BARBAGALLO, F. *et al.* Evaluation of sperm mitochondrial function: a key organelle for sperm motility. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, p. 363, 2020.
- BARROS, H.A. **Importância do exame andrológico associado a morfologia espermática** – revisão de literatura. Artigo (Bacharel em Medicina Veterinária). Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – UNICEPLAC, Gama: DF, 2021.
- BETTENCOURT, E. M. V. *et al.* **Reprodução em Equinos** - Manual Prático. Universidade de Évora: Évora. 2018
- BLOMMAERT, D. *et al.* Expression, localization, and concentration of A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and its precursor (proAKAP4) in equine semen: Promising marker correlated to the total and progressive motility in thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 131, p. 52-60, 2019.
- BUSS, T; AURICH, J; AURICH, C. Evaluation of a portable device for assessment of motility in stallion semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 514-519, 2019.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal**. 3. Ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- DE ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1a década do século XXI. **R. Bras. Zootec.**, v.39, p.119-129, 2010. Disponível em: <http://www.sbz.org.br/revista/artigos/8814.pdf>. Acesso em: 18 mai. 2023.
- DE OLIVEIRA, R. A. Conduzindo um garanhão de forma segura para cobertura ou colheita de sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 45, n. 1, p. 12-17, 2021. Disponível em: <http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v45/n1/RB888%20Oliveira%20p12-17.pdf> Acesso em: 15 mai. 2023.

DYCE, R.M.; SACK, W. O.; & WENSING, C.J.G. **Tratado de Anatomia Veterinária**, 4 ed. 2010. Rio de Janeiro: Elsevier Editora. Capítulo 22.

FERREIRA, H. N. *et al.* Variable inter-assay estimation of sperm DNA fragmentation in stallions classified as good and bad semen freezers. **CryoLetters**, v. 39, n. 1, p. 67-71, 2018.

FERREIRA, H. N. *et al.* Functional Assessment of Diluent Choice for Semen Cryopreservation from Stallions with High and Low Freezability. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, 2019.

FERREIRA-SILVA, J. C. *et al.* Freezing of stallion semen: I-In vitro evaluation of motility and acrosin activity in sperm cells cryopreserved under different glycerol concentrations. **Pferdeheilkunde**, v. 34, n. 1, p. 51-56, 2018a.

FERREIRA-SILVA, J. C. *et al.* Induction of Ovulation in Mangalarga Marchador Mares by hCG or GnRH. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, p. 6-6, 2018b.

FIGUEROA, E. *et al.* Potential biomarkers of DNA quality in cryopreserved fish sperm: impact on gene expression and embryonic development. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 1, p. 382-391, 2020.

FIGUEIRÓ, G. M. *et al.* Morphology and Morphometry of Seminiferous Tubules in Crioulo Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 50, p. 20-26, 2017.

FREITAG, G. P. *et al.* Use of imagej, smartphone camera, and light microscope to evaluate stallion sperm concentration. **Archive Veterinary Science**, v. 25, n. 3, 2020.

GACEM, S. *et al.* New sperm morphology analysis in equids: Trumorph® vs eosin-nigrosin stain. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 5, p. 79, 2021.

GIARETTA, E. *et al.* Use of specific mitochondrial complex inhibitors to investigate mitochondrial involvement on horse sperm motility and ROS production. **Research in Veterinary Science**, v. 147, p. 12-19, 2022.

GILMORE, A. *et al.* Preliminary investigation of kisspeptin gene expression and concentration in stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 124, p. 104443, 2023.

GONZALEZ-CASTRO, R. A., CARNEVALE, E. M. Association of equine sperm population parameters with outcome of intracytoplasmic sperm injections. **Theriogenology**, v. 119, n. 1, p. 114-120, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X18304205#previe> w-section-cited-by Acesso em: 15 jun. 2023.

GOSZCZYNSKI, D. E. *et al.* Allele-specific expression analysis reveals conserved and unique features of preimplantation development in equine ICSI embryos. **Biology of Reproduction**, v. 105, n. 6, p. 1416-1426, 2021.

GUASTI, P. N. *et al.* Equine seminal plasma and sperm membrane: Functional proteomic assessment. **Theriogenology**, v. 156, p. 70-81, 2020.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ª ed., São Paulo: Manole, 2004, 503p.

HARRIS, I. T. *et al.* Temporal trends in equine sperm progressive motility: a systematic review and meta-regression. **Reproduction**, v. 165, n. 6, p. M1-M10, 2023.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, C. *et al.* The stallion sperm acrosome: Considerations from a research and clinical perspective. **Theriogenology**, 2022.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, C.; RAMÍREZ-AGÁMEZ, L.; MAKLOSKI-COHORN, C.. Semen evaluation. **Equine Hematology, Cytology, and Clinical Chemistry**, p. 257-274, 2021.

HIROHASHI, N.; YANAGIMACHI, R. Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization. **Biology of reproduction**, v. 99, n. 1, p. 127-133, 2018.

HIROSE, M. *et al.* Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 5, p. 2513-2518, 2020.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Rebanho de Equinos (Cavalos)** - Mapa - Equinos (Cavalos) - Tamanho do rebanho (Cabeças). Rio de Janeiro: IBGE, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br> Acesso em: 22 mar. 2023.

JUNQUEIRA, L.C.U. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LANÇONI, R. **Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função do espermatozoide equino criopreservado**. 2015. Dissertação (Mestrado em reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-17092015-103200/en.php> Acesso em: 08 jul. 2023.

LANÇONI, R. *et al.* Validation of the CellRox Deep Red® fluorescent probe to oxidative stress assessment in equine spermatozoa. **Animal Reproduction (AR)**, v. 14, n. 2, p. 427-441, 2018.

LEEMANS, B. *et al.* Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species?. **Reproduction**, v. 157, n. 5, p. R181-R197, 2019.

LIU, H. *et al.* Proteomic analysis of donkey sperm reveals changes in acrosome enzymes and redox regulation during cryopreservation. **Journal of Proteomics**, v. 267, p. 104698, 2022.

MACEDO, D.B.; ROSANOVA, C. O Complexo Agronegócio do Cavalo. In: IV JICE-JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E EXTENSÃO - IFTO. 2013. Disponível em: <https://propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/jice/jice/paper/viewFile/5832/3116> Acesso em: 17 mai. 2023.

MADELLA-OLIVEIRA, A. DE F. *et al.* O processo de domesticação no comportamento dos animais de produção. **Pubvet**, n. 5, v. 31. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v5n31.1204> Acesso em: 18 mai. 2023.

MCCUE, P. M. Hypo-Osmotic Swelling Test. **Equine Reproductive Procedures**, p. 633-634, 2021.

MEYERS, S.; BULKELEY, E.; FOUTOUHI, A. Sperm mitochondrial regulation in motility and fertility in horses. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, p. 22-28, 2019.

NASCIMENTO, A. J. S.; NARDI JUNIOR, G. A cultura equina e sua evolução. **Tekhne e Logos**, v. 12, n. 3, p. 37-48, 2021. Disponível em: <http://revista.fatecbt.edu.br/index.php/tl/article/view/788> Acesso em: 22 mar. 2023.

NASIRABADI, M. H. *et al.* Sericin ameliorates the capacitation state and chromatin

integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa by reducing oxidative stress. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 245, 2019.

NEUHAUSER, St. *et al.* Comparison of the effects of five semen extenders on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. **Journal of equine veterinary science**, v. 79, p. 1-8, 2019.

NEVES, M. G. **Perfil de testosterona e parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador dentro e fora da estação reprodutiva**. 2014. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/5823> Acesso em: 08 jul. 2023.

O'FLAHERTY, C.. Reactive oxygen species and male fertility. **Antioxidants**, v. 9, n. 4, p. 287, 2020.

OLIVEIRA, R. R. **Características reprodutivas de garanhões da raça Mangalarga marchador em diferentes faixas etárias**. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014 Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/1889> Acesso em: 17 mai. 2023.

OLIVEIRA, V. da S.; MORELLI, K. G.; COUTINHO, G. T. R. M. Princípios básicos da manipulação, análise, e envio do sêmen equino. **PubVet**, v. 13, n. 10, p. 176, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n10a430.1-9> Acesso em: 22 mar. 2023.

PARDEDE, B. P. *et al.* PRM1 Gene Expression and Its Protein Abundance in Frozen-Thawed Spermatozoa as Potential Fertility Markers in Breeding Bulls. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 3, p. 111, 2022.

PESSOA, G. A. *et al.* Effect of plasma separation techniques and sperm selection on sperm recovery and viability of cooled pony stallion semen for 48h at 5° C. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 2017-2026, 2020.

PETRUCI, M. V. S.; BECEGATTO, D. B.. Bem-estar de garanhões e éguas utilizados para a reprodução – revisão de literatura. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, [S.l.], v. 38, n. 74, p. 21-34, fev. 2022. ISSN 2596-2809. Disponível em: <http://periodicos.unifil.br/index.php/Revistatestes/article/view/2478>. Acesso em: 23 mar. 2023.

QUINTELA, A. T. *et al.* Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. **Animal Reproduction (AR)**, v. 7, n. 2, p. 70-74, 2018.

RESTREPO, G. *et al.* Effect of supplementation of freezing media with isoosmotic glycerol on functional integrity of equine semen. **Annals of Animal Science**, v. 22, n. 3, p. 953-960, 2022.

RESTREPO, G. *et al.* Freezing, vitrification, and freeze-drying of equine spermatozoa: Impact on mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation, and DNA integrity. **Journal of equine veterinary science**, v. 72, p. 8-15, 2019.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. **Animal Reproduction (AR)**, v. 10, n. 3, p. 148-159, 2018.

RUA, M. A. S. *et al.* Espermatogênese em eqüinos. **PUBVET**, Londrina, v. 8, N. 7, Ed. 256, Art. 1696, Abril, 2014. Disponível em: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/3028/3028> Acesso em: 19 mai. 2023.

SALES, F. A. B. M. *et al.* In vitro and in vivo efficiency of extenders added to

thawed stallion semen. **Cryoletters**, v. 40, n. 4, p. 231-236, 2019.

SILVA, L. T. *et al.* Comparação morfológica da célula espermática equina no sêmen fresco e refrigerado. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: ENCONTRO ANUAL DA BIOFÍSICA, 2017, Recife. Anais. Recife: UFPE, 2017. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1081560/1/Marciane2017.pdf> Acesso em: 19 mai. 2023.

SIU, K. K. *et al.* The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. **Journal of Cell Biology**, v. 220, n. 10, 2021.

SOARES, A.S.P. **Estudo de uma técnica de castração de cavalos por laparoscopia**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. 2009. Lisboa. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/1462/1/Estudo%20de%20uma%20T%C3%A9cnica%20de%20Castr%C3%A7%C3%A3o%20de%20Cavalos%20por%20Laparoscopia.pdf> Acesso em: 15 mai. 2023.

SONI, Y. *et al.* Effects of different concentration and combinations of cryoprotectants on sperm quality, functional integrity in three Indian horse breeds. **Cryobiology**, v. 86, p. 52-57, 2019.

TALLURI, T. R. *et al.* Efficacy of evaluation of mitochondrial membrane potential in equine spermatozoa using JC-1. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v. 90, n. 12, 2021.

TANGA, B. M. *et al.* Semen evaluation: Methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment—A review. **Animal bioscience**, v. 34, n. 8, p. 1253, 2021.

VALVERDE, A.; BARQUERO, V.; SOLER, C. The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 29, n. 3, p. 189-198, 2020.

VIGOLO, V. *et al.* Sperm concentration of frozen semen has a leading role in fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 247, p. 107143, 2022.

WINTER, G. H. Z. **Exame andrológico em garanhões**. Nucleus Animalium, v.6, n.1, 2014, Porto Alegre, RS.

ZHANG, M. *et al.* Characterization of acrosin and acrosin binding protein as novel CRISP2 interacting proteins in boar spermatozoa. **Andrology**, 2023.

ZHOU, R. *et al.* The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. **Cellular and molecular life sciences**, v. 76, p. 2681-2695, 2019.

ZHU, Z. *et al.* Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 141, p. 159-171, 2019.