

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**Ultrassonografia Testicular no Modo Color Doppler e Espectral e
Avaliação Andrológica de Garanhões Mangalarga Marchador
Tratados com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)**

RITA DE CÁSSIA LIMA MORAIS

2017



INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Ultrassonografia Testicular no Modo Color Doppler e Espectral e
Avaliação Andrológica de Garanhões Mangalarga Marchador Tratados
com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)**

RITA DE CÁSSIA LIMA MORAIS

Sob orientação do Professor

Dr. Júlio César Ferraz Jacob

e co-orientação da Professora

Dra. Carla Fernanda Paranhos de Moura Carvalho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Abril de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M827u MORAIS, RITA DE CÁSSIA LIMA, 1987-
Ultrassonografia Testicular no Modo Color Doppler
e Espectral e Avaliação Andrológica de Garanhões
Mangalarga Marchador Tratados com Gonadotrofina
Coriônica Humana / RITA DE CÁSSIA LIMA MORAIS. - 2017.
81 f.: il.

Orientador: JÚLIO CÉSAR FERRAZ JACOB.
Coorientadora: CARLA FERNANDA PARANHOS DE MOURA
CARVALHO.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
MEDICINICA VETERINÁRIA, 2017.

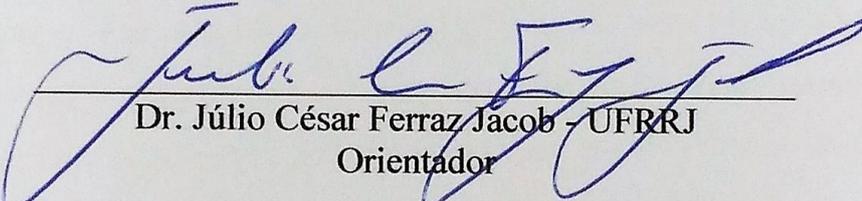
1. ULTRASSONOGRFIA. 2. DOPPLER ESPECTRAL. 3.
DOPPLER COLORIDO. 4. HCG. 5. GARANHÕES. I. JACOB, JÚLIO
CÉSAR FERRAZ, 1961-, orient. II. CARVALHO, CARLA
FERNANDA PARANHOS DE MOURA, 1968-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINICA VETERINÁRIA.
IV. Título.

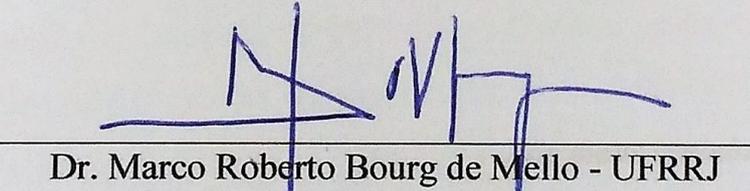
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

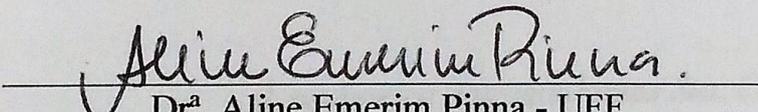
RITA DE CÁSSIA LIMA MORAIS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia e Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 13/04/17


Dr. Júlio César Ferraz Jacob - UFRRJ
Orientador


Dr. Marco Roberto Bourg de Mello - UFRRJ


Drª. Aline Emerim Pinna - UFF

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais João e Odaléia

À toda minha família e aos amigos verdadeiros

Aos animais

À padroeira dos estudantes Sta. Catarina de Alexandria

À Deus...

Dedico!

AGRADECIMENTOS

É com muito prazer que chego ao final de mais uma etapa, em um nível do qual nunca imaginei que poderia atingir! E definitivamente, só tenho a agradecer a todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram a alcançar um dos meus objetivos. Com toda certeza, as palavras que seguem abaixo serão poucas para expressar toda a minha gratidão aos envolvidos...

Agradeço primeiramente a Deus e a minha intercessora Sta. Catarina de Alexandria, a padroeira dos estudantes, por me abençoar, me proporcionar paciência, inteligência e discernimento frente à todas os momentos, bons e ruins, desta longa caminhada. Muito obrigado por caminharem comigo e me guiarem para os melhores caminhos.

Fora isso, o apoio da minha família foi fundamental para que eu conseguisse seguir meu caminho de forma serena e determinada. Aos meus pais, JOÃO EUGÊNIO DE MORAIS FILHO e a minha mãe ODALÉA MARIA DE LIMA MORAIS, eu devo absolutamente tudo, todas as minhas escolhas e todas as minhas vitórias. Muito obrigada mãe por suportar a distância, ouvir horas a fio de conversa fiada para me ajudar a render o longo trajeto do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal até minha casa, por ouvir minhas reclamações, tentar me acalmar nas horas de raiva, me ajudar com o pouco que tem e deixar de viver e fazer as coisas pra si própria só para me proporcionar o melhor. Ao meu pai, meu João do Dino, sem palavras para descrever a gratidão ao senhor, em todos esses anos de estudo, mas principalmente nesse mestrado, você foi muito mais que um pai para mim. Foi meu amigo, meu companheiro, meu estagiário, concertando tudo que o Quebec quebrava no setor, dormindo comigo e me acompanhando nas coletas de sangue, noturnas... Mesmo sem lida com animais, me ajudando no que era possível durante os procedimentos experimentais diários, e além disso tudo ainda foi meu faz tudo em quanto estava totalmente ocupada, me levando café, marmita, arrumando minha casa... um obrigado seria muito pouco para poder agradecer tudo que vocês fizeram e ainda fazem por mim. Amo muito vocês!

Ao meu irmão SÉRGIO, meus sobrinhos BIANCA, PRISCILA, CRISTIAN e à pequena sobrinha neta ALICE, que mesmo distantes me fizeram sentir suas presenças.

Ao meu orientador, professor Dr. JÚLIO CESAR FERRAZ JACOB, pela oportunidade, por seus ensinamentos e também pelas broncas, que em muitos momentos também ensinaram alguma coisa.

A minha coorientadora, professora Dra. CARLA FERNANDA PARANHOS DE MOURA CARVALHO, pela preocupação, apoio, idéias e ajudas no aperfeiçoamento da técnica ultrassonográfica em garanhões, como em toda a pesquisa.

A professora Dra. VERA LUCIA TEIXEIRA DE JESUS, pelo carinho, conversas, preocupação, ajuda e cuidados.

Ao professor Dr. MARCO ROBERTO BOURG MELLO, pela amizade, conhecimento repassado, por me salvar diversas vezes nas duvidas quando meu orientador estava ausente e pelas deliciosas costelas no bafo na reprodução (“rs”)!

Ao professor JOSÉ EUGÊNIO TRÉS, pelas conversas fiadas, coleguismo e apoio.

Ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária e seu corpo docente, bem como o corpo docente desta instituição pelo aprendizado e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Sr. “ZICO” (OROZIMBO!), funcionário do DRAA, por tornar meus dias mais belos e divertidos! Pelos cafés na tampinha! Pelas bobearas e casos contados, pela ajuda e amizade. Todo mundo malucado! Sem o Sr. lá no setor, tudo seria mais difícil. E aos demais funcionários, FOFINHO (Fofis), Sr. LUIZ e NÉZIO, por ficarem até mais tarde no setor para ajudar com os garanhões durante o experimento e com os outros serviços diários de lida das éguas malucas! Ao ZEZINHO pelo apoio, pelas prosas, ajudas com gambiarras e afins e ao RENEU, por ajudar e sempre fazer aquele cafezinho depois do almoço.

Aos funcionários do setor dos garanhões, em especial o JORGINHO, por toda ajuda, levando e trazendo os garanhões, guiando nas coletas e principalmente pela confiância em deixa-los sobre minha responsabilidade.

Ao SÉRGIO CAMARGO da PESAGRO, por realizar minhas análises estatísticas.

Ao Dr. JHONNATHA OLIVEIRA, por ter idealizado minha pesquisa, pela ajuda na confecção do projeto, pela paciência nos ensinamentos e principalmente pela amizade!

Aos estagiários PABLO, JÁDER, NATALIA DE FIGUEIREDO, DIEGO, GISELE, ANDRESSA ALVES, ALINE BRUM, VICTÓRIA, FLAVINHA VIEIRA, entre outros, pela ajuda, paciência, fidelidade e amizade! Obrigado pessoal, este trabalho também é de vocês!

Aos colegas do Setor de Reprodução Animal PAULINHA, MARCO DA LUA YURI, SAMUEL (BAÚ), OTÁVIA, LARA, JOAQUIM e JOÃO PAULO (Seropec), pelas ajudas e prosas! Em especial GABRIEL DUTRA, por todos os ensinamentos, ajudas, caronas, risadas, por sempre salvar a pátria nas minhas dúvidas, enfim, muito obrigado por sua amizade!

Às residentes do HVGA-UFRRJ, CINTIA E BRUNA, pela ajuda até altas horas da madrugada chuvosa durante o tratamento da cólica do Quebec.

À DONA VERA e Sr. JORGE pelo imenso coração e por toda ajuda em me concederem a moradia durante essa etapa, sem vocês tudo isso não seria possível. Também aos meus vizinhos PAULINHO e ROSA pela amizade, pelas rabanadas, por ajudar concertar as coisas da casa e cuidar do meu Pitoquinho quando estou viajando!

E por último agradeço aos animais, especialmente os que passaram por minha vida me inspirando profissionalmente, meus cães LUPY (*in memorian*), SUSHI lá em MG e PITOCO que apareceu aqui no RJ para que eu não me sentisse mais sozinha! E principalmente à memória dos meus cavalos, GIVALI e FENIX, que foram os responsáveis pelo meu grande amor por essa espécie e pela raça Mangalarga Marchador e aos meus garanhões MISTÉRIO, PRESIDENTE, QUEBEC (*in memorian*) e meu favorito QUARTZO, da linhagem IZ 47, por me concederem o corpo e a alma para que eu pudesse concluir meu experimento.

A todos aqueles que de alguma forma fazem parte da minha vida e participaram desse trabalho...

Muito Obrigado!

RESUMO

MORAIS, Rita de Cássia Lima. **Ultrassonografia Testicular no Modo Color Doppler e Espectral e Avaliação Andrológica de Garanhões Mangalarga Marchador Tratados com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)**, 2017. 81p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Foram avaliadas as características reprodutivas de garanhões através da estimulação das células de Leydig com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) durante as estações do ano nos meses de: janeiro, abril, julho e outubro de 2016, no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal da UFRRJ. O estudo foi realizado utilizando quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador. Os animais foram divididos em dois grupos: GI (n=4), administrando 5ml de solução salina e GII (n=4), administrando 5000 UI de hCG (5ml) (Chorulon[®]), ambos *i.v.*, *in bollus*. Em cada mês os procedimentos foram subdivididos em dois ciclos (CI e CII) com seis dias (D) cada e com um intervalo de três dias entre os ciclos. Nos dias ímpares avaliou-se dois cavalos, um de cada grupo e nos dias pares os outros dois de cada grupo. Para o C2, seguiu-se o esquema experimental rotacional “cross over”, onde: CI = animal 1 (GI) e 2 (GII) avaliados nos dias D1, D3 e D5 e animal 3 (GI) e 4 (GII) em D2, D4 e D6; CII= animal 1 (GII) e 2 (GI) avaliados nos dias D1, D3, D5 e animal 3 (GII) e 4 (GI) em D2, D4 e D6. O tratamento foi feito apenas no primeiro dia de cada ciclo (D1 e D2). Houve um intervalo de 3 dias entre os ciclos. Seguidamente aos tratamentos e com os animais contidos e tranquilizados com Cloridrato de Xilazina 2% (0,00028 mg/kg), foi realizada a ultrassonografia (US), em modo color Doppler aferindo a porcentagem de vascularização dos testículos e no modo Doppler espectral, aferiu-se o RI, na artéria testicular, uma hora antes de cada coleta de sêmen e imediatamente após. Durante as coletas de sêmen, foram avaliados: frequência de reflexo de Flehmen e de montas sem ereção, tempo de reação à ereção e duração da monta. O sêmen coletado foi submetido às análises de qualidade (avaliação de volume total, filtrado, motilidade, vigor e concentração). Todos os dados obtidos foram submetidos aos testes Qui-quadrado e ANOVA com significância de 5%. Ao analisar os resultados, observou-se que não houve diferenças estatísticas ($P>0,05$) para as seguintes variáveis: RI da artéria testicular, frequência de reflexo de Flehmen, nº de montas sem ereção, tempo de reação à ereção, duração da monta, volume total, filtrado, motilidade, vigor e concentração, entre os grupos tratados com hCG ou com solução salina, nem entre as diferentes estações do ano. Conclui-se que a administração de uma única dose de 5000 UI de hCG em garanhões não foi suficiente para causar alterações no fluxo sanguíneo da artéria testicular, mensurado pelo índice Doppler de resistividade, como também não ocasionou alterações no comportamento nas condições experimentais pesquisadas.

Palavras-chave: andrologia; garanhões; hCG; ultrasson; Doppler.

ABSTRACT

MORAIS, Rita de Cássia Lima. **Testicular Ultrasonography in Color Doppler and Spectral Mode and Andrological Evaluation of Mangalarga Marchador Stallions Treated with Human Chorionic Gonadotrophin (hCG)**, 2017. 82p. Masters dissertation. Master's degree in Medicine Clinical Veterinary medicine, Pathology and Sciences. Institute of Veterinary medicine, Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, Seropédica, RJ.

The reproductive characteristics of stallions were evaluated through the stimulation of Leydig cells with human chorionic gonadotrophin (hCG) during the seasons of January, April, July and October 2016, in the Animal Reproduction and Evaluation Department of UFRRJ. The study was carried out using four Mangalarga Marchador stallions. The animals were divided into two groups: GI (n = 4), administering 5ml of saline and GII (n = 4), administering 5000 IU of hCG (5ml) (Chorulon®) both i.v., in bollus. In each month the procedures were subdivided into two cycles (CI and CII) with six days (D) each and with a three day interval between cycles. On odd days two horses were evaluated, one from each group and on even days the other two from each group. For C2, the cross-over experimental rotational scheme was used, where: CI = animal 1 (GI) and 2 (GII) evaluated on days D1, D3 and D5 and animal 3 (GI) and 4 (GII) on D2, D4 and D6; CII = animal 1 (GII) and 2 (GI) evaluated on days D1, D3, D5 and animal 3 (GII) and 4 (GI) on D2, D4 and D6. The treatment was done only on the first day of each cycle (D1 and D2). There was an interval of 3 days between cycles. After the treatments and with the animals contained and reassured with 2% Xylazine Hydrochloride (0.00028 mg/ kg), ultrasonography (US) was performed in Doppler color mode, assessing the percentage of vascularization of the testes and in the spectral Doppler mode, RI was measured in the testicular artery one hour before and immediately after each semen collection. During the collection of semen, Flehmen's reflex frequency and number of erections without erection, reaction time to erection and duration of mating were evaluated. The collected semen was submitted to quality analyzes (evaluation of total volume, filtration, motility, vigor and concentration). All data were submitted to chi-square and ANOVA tests with significance of 5%. When analyzing the results, it was observed that there were no statistical differences ($P > 0.05$) for the following variables: testicular artery RI, Flehmen reflex frequency, number of erections without erection, reaction time to erection, duration of Total volume, filtration, motility, vigor and concentration between groups treated with hCG or saline solution, nor between the different seasons of the year. It was concluded that administration of a single dose of 5000 IU of hCG in stallions was not sufficient to cause changes in testicular artery blood flow as measured by the Doppler index of resistivity, nor did it cause changes in behavior in the experimental conditions studied.

Keywords: andrology; stallions; hCG; ultrasson; Doppler.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MÉDIAS \pm DESVIO PADRÃO DO ÍNDICE DE RESISTIVIDADE (RI) NO MODO DOPPLER ESTECTRAL, DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR, TRATADOS COM SOLUÇÃO SALINA OU COM HCG NOS MESES DE JANEIRO, ABRIL, JULHO E OUTUBRO (MÉDIAS OBTIDAS A PARTIR DE TRÊS TRÊS EXAMES POR GRUPO).....	56
TABELA 2 - MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DA PORCENTAGEM DE COLORAÇÃO OBTIDA ATRAVÉS DA ULTRASSONOGRRAFIA EM MODO DOPPLER COLORIDO DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR TRATADOS COM SOLUÇÃO SALINA OU COM HCG NOS MESES DE JANEIRO, ABRIL, JULHO E OUTUBRO (MÉDIAS OBTIDAS A PARTIR DE TRÊS EXAMES POR GRUPO).....	60
TABELA 3 - MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS (TRÊS AVALIAÇÕES POR GRUPO) NO ATO DAS COLHEITAS SEMINAIS DOS GARANHÕES, NAS 4 ESTAÇÕES DO ANO, TRATADOS COM HCG OU SOLUÇÃO SALINA.....	62
TABELA 4 - MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS SEMINAIS DOS GARANHÕES NOS MESES DE JANEIRO, ABRIL, JULHO E OUTUBRO, DE 2016, TRATADOS COM HCG E SOLUÇÃO SALINA, OBTIDAS A PARTIR DE TRÊS COLETAS DE SÊMEN POR GRUPO TRATADO.....	63

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ÓRGÃOS GENITAIS DO GARANHÃO. 24
- FIGURA 2**- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORIENTAÇÃO DO TESTÍCULO, EPIDÍDIMO, FUNÍCULO ESPERMÁTICO E ESTRUTURAS ULTRASSONOGRÁFICAS IMPORTANTES. 25
- FIGURA 3** - O ESQUEMA DEMONSTRANDO O POSICIONAMENTO DE UM TRANSDUTOR LINEAR (5 MHZ DE FREQUÊNCIA) COLOCADO NO TESTÍCULO PARA AVALIAÇÃO DA VEIA CENTRAL. NA IMAGEM ULTRASSONOGRÁFICA (DIREITA) DE UM TESTÍCULO NORMAL (CORTE TRANSVERSAL), A VEIA CENTRAL APARECE COMO UMA ESTRUTURA ANECÓICA COM FORMATO CIRCULAR (SETA). 26
- FIGURA 4** - O ESQUEMA À ESQUERDA DEMONSTRA O POSICIONAMENTO DO TRANSDUTOR LINEAR (5 MHZ DE FREQUÊNCIA) NO TESTÍCULO PARA AVALIAÇÃO DA VEIA CENTRAL. NA IMAGEM ULTRASSONOGRÁFICA (CORTE LONGITUDINAL), A VEIA CENTRAL APARECE COMO UMA ESTRUTURA ANECÓICA (SETAS). 27
- FIGURA 5** - O ESQUEMA À ESQUERDA DEMONSTRA O POSICIONAMENTO DO TRANSDUTOR LINEAR (5 MHZ DE FREQUÊNCIA) NA AVALIAÇÃO DO FUNÍCULO ESPERMÁTICO. NA IMAGEM ULTRASSONOGRÁFICA (DIREITA) A ARTÉRIA TESTICULAR É IDENTIFICADA COMO ESTRUTURAS ANECÓICAS EM CORTES (SETA BRANCA), E O PLEXO PAMPINIFORME COMO UMA ESTRUTURA HETEROGÊNEA ENVOLVENDO A ARTÉRIA (SETA PRETA).. 27
- FIGURA 6** - O ESQUEMA À ESQUERDA DEMONSTRA O POSICIONAMENTO DO TRANSDUTOR LINEAR (5 MHZ DE FREQUÊNCIA) NO TESTÍCULO, POSSIBILITANDO A VIZUALIZAÇÃO DOS RAMOS DA ARTÉRIA TESTICULAR (SETAS). 28
- FIGURA 7** - O ESQUEMA DEMONSTRA O POSICIONAMENTO DO TRANSDUTOR LINEAR (5 MHZ DE FREQUÊNCIA) PARA AVALIAÇÃO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO EM A E NA SUPERFÍCIE DORSO-LATERAL DO TESTÍCULO PARA AVALIAÇÃO DO CORPO DO EPIDÍDIMO EM C. NA IMAGEM ULTRASSONOGRÁFICA EM B OBSERVA-SE A CAUDA DO EPIDÍDIMO (SETAS) HIPOECÓICA EM RELAÇÃO AO PARÊNQUIMA TESTICULAR. A PRESENÇA DE LÍQUIDO NA CAVIDADE VAGINAL FACILITA O EXAME. A IMAGEM ULTRASSONOGRÁFICA EM D DEMONSTRA O CORPO DO EPIDÍDIMO (SETAS) APRESENTANDO-SE HIPOECÓICO EM RELAÇÃO AO PARÊNQUIMA TESTICULAR NORMAL.. 29
- FIGURA 8** - DIAGRAMA DOS RAMOS ARTÉRIAS PÉLVICOS E ABDOMINAIS DE GARANHÃO. 30
- FIGURA 9** - FORMA, TAMANHO E APARÊNCIA ULTRASSONOGRÁFICA DAS GLÂNDULAS SEXUAIS ACESSÓRIAS DE GARANHÕES NORMAIS ANTES E APÓS EJACULAÇÃO. 31
- FIGURA 10** - O ESQUEMA DEMONSTRA O POSICIONAMENTO DO TRANSDUTOR LINEAR COLOCADO NO PÊNIS PARA OBTENÇÃO DOS CORTES TRANSVERSAL EM A E LONGITUDINAL EM B. NAS IMAGENS ULTRASSONOGRÁFICAS É

POSSÍVEL VISUALIZAR CORPO CAVERNOSO (SETAS PRETAS), CORPO ESPONJOSO (SETAS BRANCAS) E URETRA PENIANA (SETAS VERMELHAS).....	34
FIGURA 11 - DIAGRAMA DOS RAMOS ARTÉRIAS PÉLVICAS E ABDOMINAIS DE GARANHÃO.....	35
FIGURA 12 - DIAGRAMA DA ARTÉRIA TESTICULAR E SEUS RAMOS NO CORDÃO ESPERMÁTICO E TESTÍCULOS DE GARANHÕES.	36
FIGURA 13 - ESQUEMA DAS ATIVIDADES DIÁRIAS DE CADA CICLO EM CADA MÊS DO EXPERIMENTO.	48
FIGURA 14 - ESQUEMA DE POSICIONAMENTO NORMAL DOS TESTÍCULOS (ESQUERDA), E POSICIONAMENTO ADEQUADO DOS TESTÍCULOS (DIREITA) PARA O EXAME ULTRASSONOGRÁFICO, DESLOCANDO DORSALMENTE O TESTÍCULO CONTRALATERAL AO QUE ESTÁ SENDO EXAMINADO.	49
FIGURA 15 - EXAME ULTRASSONOGRÁFICO DOS TESTÍCULOS. POSICIONAMENTO TRANSDUTOR/TESTÍCULO: A) CORTE VERTICAL-CRANIAL; B) CORTE VERTICAL- CAUDAL; C) CORTE HORIZONTAL-LATERAL.....	49
FIGURA 16 - MÉTODO SUBJETIVO DE PONTUAÇÃO (%) DA EXTENSÃO DOS SINAIS COLORIDOS PARA O FLUXO SANGUÍNEO EM TESTÍCULO DE GARANHÃO.....	51
FIGURA 17 - POSICIONAMENTO HORIZONTAL DO TRANSDUTOR PARA EXAME ULTRASSONOGRÁFICO DO CORDÃO ESPERMÁTICO.	52
FIGURA 18 - CURSOR SOBRE RAMO DA ARTÉRIA TESTICULAR DO CORDÃO ESPERMÁTICO DIREITO E OBTENÇÃO DO ESPECTRO DOPPLER PARA MEDIÇÃO DA VELOCIDADE DO FLUXO SANGUÍNEO E DOS ÍNDICES PI E RI	53

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - MEDIDAS DE FLUXO SANGUÍNEO (PI E RI) DAS ARTÉRIAS TESTICULARES DE 41 GARANHÕES (N= 82 TESTÍCULOS) MENSURADOS POR ULTRASSONOGRAFIA NO MODO COLOR DOPPLER ESPECTRAL SEGUNDO POZOR E MCDONNELL (2004).	23
QUADRO 2 - COMPORTAMENTO PRÉ E COPULATÓRIO NORMAL DE GARANHÕES DOMÉSTICOS SUBMETIDOS À CÓPULA DIRIGIDA..	39
QUADRO 3 - PROPORÇÕES DE VISUALIZAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO (MODO SUBJETIVO) DO PARÊNQUIMA TESTICULAR VIA ULTRASSONOGRAFIA NO MODO DOPPLER COLORIDO.	50

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

°C – Graus Celsius

ABP- Proteina ligadora de andrógenos

AC- Antes da coleta de sêmen

AMPc – Adenosinamonofosfato cíclico

C – Velocidade média do ultrasson nos tecidos

C (não) - Ciclos do experimento

CEUA/ UFRRJ – Comissão de tica no uso de animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal do Rio de Janeiro

CASA – Computer Assisted Sperm Analyses

CBRA – Conselho Brasileiro de Reproduo Animal

Cos – cosseno

D (não) - Dias do experimento

DC- Depois da coleta de sêmen

EDV – Velocidade diastólica final

FAPERJ – Fundao Carlos Chagas de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

FSH – Hornio folículo estimulante

Fd – Frequência Doppler

Fr – Frequência dos ecos recebidos

Freq. – Frequência

Ft – Frequência das ondas transmitidas

GI – Grupo I (soluço salina)

GII – Grupo II (hCG)

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

H - Hora

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

HIOMT – Hidroxiindol –O- metiltransferase

IEP- Início de exposição do pênis

IGF –I – Fator de crescimento

IME – Início de monta com ereção

i.v. - Intravenoso

Kg - Quilograma

LH – Hormônio luteinizante

MHz – Mega-hertz

mL - Mililitros

mm – Milímetros

MP – Motilidade Progressiva

MT – Motilidade total

NAT – N- acetiltransferase

ng – Nanogrâma

PI – Índice de pulsatilidade

PRF – Frequência de repetição de pulso

PSV – Velocidade de pico sistólico

RI – Índice de resistividade

s – Segundos

TABF- fluxo arterial total

TABFR- taxa de fluxo sanguíneo arterial total

TAM – Velocidade arterial máxima

TM – Total de tempo da monta

TRE – Tempo de reação à ereção

UI – Unidade internacional

US - Ultrassonografia

V – Velocidade de hemácias

VM – Velocidade média

X – Vezes

LISTA DE SÍMBOLOS

θ - Ângulo Doppler

β - Beta

α - Alfa

$^{\circ}$ - Graus

' - Minutos

" - Segundos

\pm - Mais ou menos

$>$ - Maior

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Fisiologia e Endocrinologia Reprodutiva dos Garanhões	3
2.2 Alterações Reprodutivas em Garanhões Associadas à Estação do Ano	6
2.3 Efeitos da Gonadotrofina Coriônica Humana em Garanhões	8
2.4 Exame Ultrassonográfico	10
2.4.1 Vantagens e desvantagens da ultrassonografia.....	11
2.4.2 Princípios ultrassonográficos	11
2.4.3 Modos de exibição do ultrasson	12
2.4.4 Interpretações de imagens e terminologia	14
2.4.5 Ultrassonografia no Modo Doppler.....	15
2.5 Anatomia ultrassonográfica do Sistema Genital dos Garanhões	24
2.5.1 Anatomia do escroto, testículo, epidídimo e cordão espermático	25
2.5.2 Anatomia ultrassonográfica das glândulas sexuais acessórias	29
2.5.3 Anatomia ultrassonográfica do pênis	33
2.5.4 Arterias pélvicas e abdominais em garanhões.....	34
2.6 Comportamento Sexual	36
2.6.1 Fatores que afetam o comportamento sexual dos garanhões.....	40
2.6.2 Controle hormonal do comportamento sexual	41
2.7 Avaliação Andrológica	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 Local e Período de Execução.....	46
3.2 Animais e Manejo.....	46
3.3 Exame Clínico	46
3.4 Delineamento Experimental	47
3.5 Exame Ultrassonográfico da Genitália Externa	48
3.6 Avaliação do Comportamento Sexual	53
3.7 Análise do sêmen.....	54
3.8 Análises Estatísticas	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5 CONCLUSÕES	68
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

Entre os animais de produção, os equinos são os que apresentam a reprodução mais dispendiosa, o que justifica as tentativas de melhorias relacionadas à fertilidade da espécie com objetivo de aumentar seu rendimento. O macho equino assume um papel relevante por sua possibilidade de disseminar o patrimônio genético mais eficientemente que a fêmea.

A sobrevivência de uma espécie está diretamente relacionada com a fertilidade de seus indivíduos. Há uma estimativa de que 25% dos machos equinos passam por algum problema reprodutivo que possa limitar sua fertilidade (McDONNEL, 1986). Garanhões submetidos à monta têm sua libido e sua fertilidade diminuídas quando essas são efetuadas com uma frequência maior que uma ou duas vezes ao dia.

Na espécie equina, a importância da eficiência reprodutiva é influenciada não só pela fisiologia da reprodução, mas também pelos objetivos de criação. Esta espécie é, dentre as dos animais de produção, a que apresenta os índices de fertilidade mais baixos independente da forma de utilização do sêmen, sendo a fresco, resfriado, congelado ou por monta natural (GINTHER et al., 1985). Esse fato é decorrente da seleção zootécnica que, geralmente, não considera parâmetros relacionados à fertilidade, sendo a maioria dos critérios de seleção aplicados, ainda hoje, baseados nas características morfofuncionais.

Com a evolução das técnicas diagnósticas e, tendo conhecimento dos distúrbios reprodutivos, faz-se necessária a aplicação e execução de exames e terapias complementares para diminuir os objetivando a melhoria dos índices reprodutivos na espécie equina. Assim, quanto mais elucidar-se conhecimentos sobre condições reprodutivas, aliadas à eficiência econômica, melhor e mais eficiente será a prevenção de possíveis complicações por condições insatisfatórias de manejo e criação.

Sabe-se que ao longo da estação de monta há um decréscimo qualitativo em alguns parâmetros reprodutivos dos garanhões como, por exemplo, libido e qualidade espermática. Visto que já é comprovado que o uso de gonadotrofina coriônica humana (hCG) tem um papel importante na estimulação da resposta esteroidogênica das células de Leydig e, sabendo que ela vem sendo utilizada nos casos de produção insuficiente de testosterona e de criptorquidismo (LIMA et al., 2000), essa pesquisa teve como objetivo avaliar possíveis alterações no parâmetros ultrassonográficos vasculares das gônadas, assim como mudanças nas

características do comportamento reprodutivo no ato da monta e nos parâmetros seminais de garanhões férteis após a administração de hCG durante as diferentes estações climatológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia e Endocrinologia Reprodutiva dos Garanhões

A fisiologia da reprodução equina está intimamente relacionada com a sazonalidade das estações do ano. Tanto garanhões quanto éguas sofrem influência da intensidade e quantidade de luz ao longo do dia, que se modifica ao longo das estações do ano (GINTHER et al., 2004; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Os garanhões não se tornam azoospermicos durante o período não reprodutivo, diferentemente de ovinos e caprinos. São capazes de continuar produzindo espermatozoides, embora em menores concentrações e de qualidade ligeiramente inferior, ao longo do ano inteiro quando estimulados (monta natural ou coleta de sêmen) (McKINNON e VOSS, 1993).

Dessa forma, o uso contínuo do garanhão ao longo do ano é uma prática de manejo comum em centrais de reprodução equina que aproveitam o período de inverno para coletar e congelar sêmen visando à próxima estação reprodutiva, até porque se trata de um período em que as éguas não estão apresentando atividade folicular ou estão prenhes (JANET et al., 2003).

O sistema neuroendócrino é responsável pela regulação da função dos órgãos reprodutivos, esse sistema é composto por grupos especializados de células nervosas e tecidos endócrinos que secretam os hormônios, que são carreados pelo sangue, de um órgão para o outro, controlando a função de outro órgão (AMANN, 1993).

A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal sendo o principal responsável pelo efeito da sazonalidade em equinos. Ela é sintetizada a partir do aminoácido triptofano por meio de duas enzimas principais: N-acetiltransferase (NAT) e hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), que são ativadas a partir da secreção de neurotransmissores liberados apenas durante a noite. Esse mecanismo explica a maior concentração desse hormônio durante o inverno, período do ano em que a duração de luz diminui enquanto a duração de escuridão aumenta (NUNES, 1999).

A melatonina regula a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo, órgão situado à base do cérebro. Especificamente em equinos, a melatonina tem a capacidade de inibir a secreção de GnRH, diminuindo indiretamente as concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), influenciando negativamente sobre a espermatogênese. Acredita-se que a melatonina seja capaz de inibir a

liberação do GnRH devido à sua capacidade de diminuir a concentração intracelular de adenosinomonofosfato cíclico (AMPC) e também ao bloquear a mobilização e influxo de cálcio²⁺ nas células gonadotróficas da adeno-hipófise (PANG et al., 1998).

A espermatogênese está dependente de um correto funcionamento do eixo hipotálamo-pituitário-testicular, envolvendo a secreção pulsátil por curtos períodos de GnRH pelo hipotálamo, cuja ação causa a liberação também pulsátil de gonadotrofinas pela pituitária anterior, o hormônio Luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), através de uma modulação endócrinaparácrina-autócrina, que por sua vez atuam sobre as células testiculares (ROSER, 2009).

Toda esta dinâmica é regulada tanto por opióides cerebrais como pela glândula pineal, dado que esta precede à secreção de melatonina que por sua vez atua negativamente sobre a GnRH, durante a época de reprodução. A produção de melatonina depende do fotoperíodo, ou seja, o aumento de número de horas diárias de luminosidade é detectado pelas células ganglionares da retina, que contêm o fotopigmento melanopsina (BERSON et al., 2002). Este estímulo é transmitido pelo nervo óptico ao núcleo supraquiasmático (SCN), causando uma inibição da glândula pineal (em equino) e da secreção de melatonina, o que favorece a secreção de GnRH pelo hipotálamo. A sua atuação não se dá directamente sobre os neurónios ligados ao GnRH, mas sim sobre os neurónios dopaminérgicos, serotoninérgicos e aminoacidológicos, que atuam sobre os primeiros. A sazonalidade e a diminuição de número de horas diárias de luz interferem assim positivamente sobre a produção de melatonina, diminuindo a secreção de GnRH e conseqüentemente das gonadotrofinas esteróides e a atividade testicular (ROSER, 2000).

O FSH provavelmente liga-se às células de Sertoli para que estas venham a secretar inibina, ativina, proteína ligadora de andrógeno (ABP), além de outros fatores necessários à espermatogênese. A liberação de FSH é regulada pela ação da inibina e da ativina, que controlam a quantidade do fluido seminífero tubular, a manutenção da barreira hemato-testicular e a sustentação do desenvolvimento das células germinativas essenciais para espermatogênese (SAMPER, 2009).

O LH causa a estimulação da produção e a liberação da testosterona e do estrógeno pelas células de Leydig em garanhões adultos (EISENHAUER et al., 1994; EISENHAUER et al., 1995). Os altos níveis locais de testosterona permitem que este hormônio atue na espermatogênese. Pela circulação periférica, a testosterona age em vários órgãos alvos para

manter as características físicas masculinas, a libido e a função das glândulas sexuais acessórias (PICKETT et al., 1998).

As células de Leydig secretam e são periodicamente estimuladas a aumentar a produção de níveis basais de vários hormônios. Desse modo, são encontradas duas à até quatro vezes a concentração de testosterona no sangue periférico, sendo cada pico com duração de 2-4 horas. Na maioria dos garanhões, três a oito explosões episódicas de produção de testosterona ocorrem todos os dias. Consequentemente, se uma única amostra de sangue de um garanhão é analisada quanto à concentração de testosterona, pode ser obtido um valor invulgarmente elevado, que não é típico das concentrações periféricas normais do sangue desse cavalo (McKINNON et al., 2011).

A testosterona, proteínas e hormônios protéicos produzidos nos testículos realizam um “feed-back” negativo com o hipotálamo e pituitária anterior, via circulação periférica, para que ocorra a modulação da secreção de GnRH, FSH e LH (AMANN, 1993).

A testosterona é essencial para a manutenção e restauração da espermatogênese no testículo adulto. Embora seja aceito que o FSH tenha importância crítica na iniciação e expansão da espermatogênese nos mamíferos durante a puberdade, sua função na espermatogênese em adultos não está bem clara (SHARP et al., 1993). De acordo com Zirkin et al. (1994), em quase todos os mamíferos, somente a testosterona é capaz de manter qualitativamente a espermatogênese completa, enquanto que o FSH tem papel na influência da quantidade de espermatozoides produzidos.

A secreção de testosterona é regulada por alças longas, curtas e ultracurtas. A alça longa envolve FSH, inibina e interações LH-testosterona. A alça curta envolve fatores de crescimento (IGF-I) e hormônios. A alça ultracurta regula as interações células de Sertoli/células germinativas/células mioides (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Após penetrar na célula, a testosterona pode ainda sofrer ação da aromatase citoplasmática, sendo convertida a estrogênio. Após a conversão, o produto desta reação (estradiol) liga-se a receptores estrogênicos e este complexo irá interagir com o DNA nuclear, promovendo resposta estrogênica (WILSON e FOSTER, 1988; CELOTTI e CESI, 1992; LISE et al., 1999). Os hormônios estrogênicos são necessários para a deposição de tecido ósseo e também para a fusão epifisária ao final da puberdade (MORISHIMA et al., 1995).

A detecção de altas concentrações de estrógeno produzido nos testículos de garanhões supõe que o estrógeno, junto com a testosterona e o FSH possa desempenhar um importante papel na espermatogênese (ROSER, 2000).

Em relação à participação do estrógeno na reprodução masculina, o seu potencial na modulação parácrina-autócrina da espermatogênese sugere que o evento seja mais complexo, principalmente na espécie equina, onde o estrógeno é produzido em quantidades atipicamente altas (AMANN, 1993).

O bom entendimento dos mecanismos de controle da função testicular do garanhão é de fundamental importância para a compreensão do processo reprodutivo dos mesmos bem como para o desenvolvimento de um manejo reprodutivo mais adequado à sua fisiologia, maximizando seu aproveitamento.

2.2 Alterações Reprodutivas em Garanhões Associadas à Estação do Ano

O garanhão tem sido classificado como um reprodutor de dias longos, basicamente porque sua máxima capacidade reprodutiva é atingida durante períodos de aumento gradual no comprimento dos dias (ROSER, 2000). Ao contrário das éguas, que se tornam anovulatórias fora da estação reprodutiva, os garanhões não são azoospermicos durante este mesmo período (AURICH et al., 1996).

No hemisfério norte, a época de reprodução fisiológica dura de abril a outubro (SHARP et al., 1993) e durante esse período a produção de espermatozoides (JOHNSON, 1991) e a função testicular endócrina (CLAY e CLAY, 1992) estão claramente aumentadas (JANETT, et al., 2003).

Durante os meses de primavera e verão, pode-se observar um aumento no tamanho e no peso testicular, na produção e liberação de espermatozoides, nas concentrações dos hormônios LH, FSH, testosterona, 17β -estradiol, inibina e prolactina e uma visível melhora na libido de garanhões (THOMPSON et al., 1978, CLAY e CLAY, 1992, ROSER et al., 1994).

Por analogia a outros mamíferos, é provável que as alterações anuais na capacidade reprodutiva do garanhão sejam resultados da presença de um ciclo circanual endógeno da função testicular, que é iniciado por um fator externo, um marcador do tempo ou ritmo ambiental. O fator externo mais comum utilizado como marcador sazonal é o fotoperíodo, principalmente por ser fidedigno ao representar as mudanças ao longo do ano (CLAY E CLAY, 1992; ROSER, 2000).

No caso dos equinos, um conceito claro sobre refratariedade é fundamental para o bom entendimento sobre seu ciclo circanual ou sazonal. Em garanhões, é aceito que os dias longos

agem desencadeando e iniciando os mecanismos que levam ao mais alto grau da capacidade reprodutiva (PICKETT et al., 1998).

A secreção das gonadotrofinas, LH e FSH, em machos, depende da liberação do GnRH pelo hipotálamo (TILLBROOK E CLARKE, 2001). Em garanhões, existe uma concordância entre os pulsos de GnRH e LH; e a influência do fotoperíodo nas secreções de GnRH é claramente refletida pelas variações circanuais na liberação do LH. Concordância semelhante entre o GnRH e o FSH não é observada (CLAY E CLAY, 1992).

Em garanhões, a liberação de LH é positivamente correlacionada com o comprimento do dia. As concentrações de LH aumentam com o início da estação reprodutiva e as concentrações basais de LH no verão são duas vezes mais altas que aquelas observadas próximo ao solstício de inverno (IRVINE E ALEXANDER, 1982, JOHNSON E THOMPSON, 1983).

As variações na liberação de LH nos eqüinos dependem da presença das gônadas, indicando que os efeitos do fotoperíodo são dependentes dos esteróides (THOMPSON et al., 1986). As concentrações séricas de testosterona e estrógeno também apresentam flutuações sazonais, com as máximas concentrações ocorrendo em abril e maio (relativos a outubro e novembro do Hemisfério Sul) (THOMPSON et al., 1978). As variações do LH sérico, descritas como altamente sazonais, apresentam picos em maio e junho (relativos a novembro e dezembro no Hemisfério Sul) (JOHNSON e THOMPSON, 1983, CLAY e CLAY, 1992).

Byers et al. (1983) também relataram um aumento sazonal dos níveis de testosterona, com os maiores níveis observados no verão; porém, com um aumento secundário no outono, menor que o do verão.

Leme et al. (2012) relataram a presença do efeito do ciclo anual na função testicular dos garanhões, relatado pelas variações sazonais das suas características seminais.

A estação do ano mostrou uma evidente influência nas características seminais de garanhões, incluindo volume do ejaculado, motilidade espermática, total de espermatozóides e porcentagem de espermatozóides anormais. Van der Holst (1975) estudou a influência da estação do ano e a aplicação de luz contínua na baía em garanhões, na Holanda. Seus resultados mostraram que a estação teve bastante influência nas características seminais dos garanhões; e a manutenção de garanhões sob luz contínua durante o inverno pareceu ter um benefício sobre a espermatogênese, evidenciado pelo aumento da motilidade e queda do número de espermatozóides anormais presentes no ejaculado, comparado com o mesmo período do ano anterior. Byers et al. (1983) observaram que o volume seminal foi maior no verão, e a

concentração espermática e o número de espermatozoides por ejaculado foram mais altos durante o outono. Magistrini et al. (1987) relataram que durante o inverno, ao contrário da primavera e verão, houve uma diminuição do volume seminal, aumento da concentração espermática e baixa motilidade. Entretanto, segundo Pickett et al. (1998), a motilidade progressiva não sofreu qualquer variação por efeito da estação do ano.

Segundo Pickett (1993), o número de espermatozoides ejaculados chega a ser 50% maior nos meses da estação reprodutiva para o primeiro ejaculado e 39% para o segundo, com uma hora de intervalo entre as colheitas de sêmen. Este padrão de produção espermática está em concordância com as observações feitas sobre a espermatogênese (BERNDTSON et al., 1977). Entretanto, não está ainda precisamente estabelecido como os elementos testiculares do garanhão são reversivelmente estimulados ou inibidos pela estação do ano (CLAY e CLAY, 1992).

Baseando-se nesses dados, é plausível que o fotoperíodo sirva simplesmente para sincronizar ou iniciar um ciclo circanual endógeno; pois, na ausência de um fotoperíodo, o ciclo endógeno ainda persiste. Porém, sem uma sincronização com o meio externo, o ciclo endógeno ficaria livre para se manifestar e o intervalo anual da máxima capacidade reprodutiva variaria de garanhão para garanhão (CLAY e CLAY, 1992).

2.3 Efeitos da Gonadotrofina Coriônica Humana em Garanhões

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é produzida pelas vilosidades coriônicas da placenta humana (NEWCOMBE, 2011), especificamente no retículo endoplasmático rugoso (BIELINSKA e BOIME, 1979) dos sinciciotrofoblastos (MEDEIROS e NORMAN, 2009), que são células responsáveis pela invasão do endométrio pelo embrião humano. Ela é detectada precocemente após a concepção e atinge o pico em torno de 35 a 50 dias (NEWCOMBE, 2011).

A hCG faz parte do grupo dos hormônios glicoproteicos que incluem LH, FSH e TSH (STENMAN et al., 2006), seu peso é de 38000Da com 237 aminoácidos, organizados em duas unidades alfa e beta, ligadas de forma não covalente (COLE, 2008), cada uma consistindo em uma única cadeia de polipeptídeos (MEDEIROS e NORMAN, 2009), contendo galactose e hexosamina. Sua estrutura é dividida em 70% de cadeias proteicas e 30% de unidades de carboidrato (KEAY et al., 2004). Todos os hormônios glicoproteicos são formados por essas duas subunidades α e β , diferentes. A subunidade α é formada por uma sequência de aminoácidos comum a todos os hormônios glicoproteicos, sendo a β única e responsável pela

atividade biológica. A hCG e LH possuem 80% de homologia entre as subunidades β , sugerindo uma função biológica comum, fazendo com que ambos se liguem ao mesmo receptor (LAPTHORN et al., 1994).

Aproveitando desta similaridade com o LH, a hCG tem sido usada para avaliar os receptores para LH, em células de Leydig de equinos com a vantagem de ser mais estável que o LH equino e ambos estimulam a esteroidogênese (EVANS et al., 1982). A estimulação da esteroidogênese pelas células de Leydig é um parâmetro utilizado no estudo das alterações reprodutivas ligadas à esfera hormonal em várias espécies (LIMA et al., 2000).

Após a aplicação da hCG, existe um padrão bifásico da meia vida, sendo que o primeiro pico de ação ocorre entre 5 e 9 horas, chamada de fase rápida e o segundo inicia-se de 24 a 33 horas (STENMAN et al., 2006), sendo a fase lenta. Esta diferença de meia vida se deve à presença do ácido siálico na molécula, conferindo uma menor metabolização pelo fígado, aumentando o período de permanência no plasma (HERSHMAN, 2004).

Os testículos constituem um tecido de atividade metabólica muito alta sendo muito sensível às perturbações do seu abastecimento nutritivo, que é essencialmente via hematológica. Várias investigações em seres humanos (BATTAGLIA, et al., 2000; TARHAN, et al., 2003) e ratos (BERGH, et al., 2001) demonstraram a associação entre fluxo sanguíneo e qualidade espermática. Além dos mediadores locais, os hormônios parecem estar envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo testicular. Receptores para LH e um mecanismo de transporte transendotelial para hCG foram encontradas na microvasculatura testicular de ratos (GHINEA et al., 1994). Administração de hCG resultou em um aumento na concentração de testosterona e fluxo sanguíneo em roedores de laboratório (SETCHEL e SHARPE, 1981; DAMBER et al., 1985;). Um aumento na concentração de testosterona plasmática após administração de hCG também ocorreu em roedores (ROSER, 1995; LIMA et al., 2000; POZOR et al., 2006a; BOLLWEIN et al., 2008). Os estrogênios, que têm um efeito vasodilatador marcado e podem ser convertidos a partir da testosterona (ROSENFELD et al., 2002), também aumentam após o tratamento com hCG (LIMA et al., 2000; POZOR et al., 2006a; BOLLWEIN, et al., 2008).

Inque et al. (1993), sugerem que a determinação de testosterona no sangue, pode auxiliar no diagnóstico da infertilidade. A mensuração das concentrações plasmáticas da testosterona sérica também é um parâmetro para determinar a efetividade da resposta esteroidogênica do hCG sobre as células de Leydig (LIMA et al., 2000). Para determinação da concentração plasmática de testosterona é importante considerar que a produção de testosterona é dependente

de idade, da estação do ano e horário de coleta das amostras sanguíneas (McKINNON et al., 2011).

Em relação à caracterização do fluxo sanguíneo testicular, Pozor et. al., (2006a), realizaram um trabalho utilizando tratamento com 500, 1000, 2500 e 6000 UI de hCG e efetuaram exames ultrassonográficos dos testículos no modo B e color Doppler espectral antes do tratamento, 1 e 72 horas, e 7 dias após o tratamento. Eles observaram que houve um aumento no tempo máximo de velocidade (TAM) e taxa de fluxo sanguíneo total arterial no exame realizado 1h após o tratamento com a dose de 6000 UI de hCG e não houve nenhum efeito de qualquer dos tratamentos neste fluxo após 7 dias. Esses pesquisadores também observaram um aumento na concentração de testosterona após cada tratamento com hCG, sendo este efeito presente até 72h após a administração com 2500 UI e foi ainda maior após a administração de 6000 UI de hCG. Pozor e colaboradores (2006a) então concluíram que houve uma significativa correlação entre o aumento na concentração de testosterona e consequente aumento nos índices ultrassonográficos no modo Doppler espectral após o tratamento com hCG.

2.4 Exame Ultrassonográfico

O estudo ultrassonográfico é um recurso que tem demonstrado muitos benefícios e pode ser utilizado sem restrições de segurança (KING, 2006). A ultrassonografia em tempo real Modo B (escala de cinza) vem sendo utilizada há muito tempo e é útil no exame da genitália masculina externa e interna, sendo uma excelente ferramenta no diagnóstico de inúmeras condições patológicas como granuloma espermático (HELD et al., 1989), epididimites (HELD et al., 1990), criptorquidismo (LOVE, 1992), varicocele, estruturas císticas do epidídimo, aumento da espessura da túnica vaginal (POZOR, 2007) e neoplasias testiculares (HUNT et al., 1990; MELO et al., 2007). Além disso, este exame permite aferições de medidas tais como altura, largura e comprimento, medidas estas utilizadas para estimar volume testicular e produção diária de espermatozóides (McKINNON, 2010) e indicadores clínico de disfunção testicular em garanhões (POZOR et al 2014). Entretanto, novas técnicas e modalidades como a ultrassonografia Doppler (Color, Power e Espectral) estão sendo mais estudadas e cada vez mais mostram-se efetivas na avaliação da integridade e normalidade fisiológica vascular dos órgãos (POZOR, 2007).

2.4.1 Vantagens e desvantagens da ultrassonografia

2.4.1.1 Vantagens segundo Kealy et al. (2012)

- É um procedimento não invasivo;
- Permite a avaliação dinâmica (p.ex., nas estruturas vasculares);
- Geralmente não requer anestesia geral nem sedação;
- Permite a aspiração precisa por agulha fina ou biópsia de tecidos.

2.4.1.2 Desvantagens segundo Kealy et al. (2012)

- O equipamento pode ser caro;
- Os artefatos podem levar a uma interpretação errada
- Não permite uma preciação real das estruturas do esqueleto, exceto das superfícies ósseas;
- É impossível atribuir mudanças na ecotextura e ecogenicidade a certas causas fisiopatológicas;
- É necessário um tempo considerável para se ter o domínio da técnica.

2.4.2 Princípios ultrassonográficos

O ultrassom na frequência diagnóstica é produzido por materiais denominados cristais piezoelétricos (zirconato de chumbo titânico), que se encontram no transdutor onde sua superfície de contato chama-se “footprint” (GODDART, 1995; KEALY e McALLISTER, 2012).

Os transdutores são instrumentos capazes de transformar uma forma de energia em outra. A frequência do transdutor depende basicamente da espessura do material piezoelétrico utilizado em sua construção, isto é, quanto menor a espessura maior a frequência produzida. É a onda de maior amplitude que determina a frequência do transdutor. Os transdutores podem ser classificados de acordo com tipo de imagem produzida: setoriais (eletrônicos ou mecânicos) que formam imagem triangular (feixes sonoros divergentes), lineares (eletrônicos) que forma uma imagem retangular (feixes sonoros de linhas paralelas) e convexa (eletrônicos) que também forma uma imagem em forma triangular. O transdutor é a peça mais frágil e mais cara do aparelho de ultrassonografia. O uso do gel acústico em transdutores tem como função eliminar

todo o ar entre o transdutor e a pele (SIEMS, 2000; KEALY e McALLISTER, 2012; DROST, 2007).

Quando um impulso elétrico é aplicado no cristal, o efeito piezoelétrico resulta na deformação do cristal, ele vibra e as ondas do ultrassom são geradas, isto é ele transfere energia (impulsos) elétrica em ondas mecânicas de ultrassom e reconverte as ondas mecânicas de ultrassom (eco) em energia elétrica. Este impulso de energia elétrica é depois exibido no monitor na forma de várias sombras em tom de cinza (quanto mais forte for o eco de retorno, mais brilhante será o ponto na imagem na tela). Quando a força do ultrassom decresce com a profundidade dos tecidos, quer devido à reflexão do som ou refração dos tecidos, a máquina de ultrassonografia pode ser ajustada com a finalidade de compensar o eco de retorno (ganho) (GODDART, 1995; BURK e ACKERMAN, 1996; KEALY e McALLISTER, 2012; DROST, 2007).

2.4.3 Modos de exibição do ultrassom

Os ecos de retorno podem ser demonstrados de várias formas no aparelho de ultrassom. Os modos de exibição do ultrassom são: modo-A, modo-B e modo-M (KEALY e McALLISTER, 2012):

- **Modo-A (Amplitude):** Baseia-se na visibilização da amplitude do eco em um osciloscópio, onde o sistema de coordenadas é utilizado medindo-se as distâncias percorridas pelo som. É um método unidimensional. A exibição é feita como picos de voltagem sobre um traçado linear. A intensidade de cada eco é indicada pela variação na amplitude do pico, representado graficamente em relação a uma escala de profundidade, isto é, maior a intensidade do eco de retorno, maior o pico de voltagem na profundidade do tecido. Este modo de exibição requer um “software” mais simples e o seu uso é restrito a exames oftalmológicos especializados (exemplo: medição de distâncias dentro do olho) e na ecoencefalografia, usado também em medicina veterinária para o diagnóstico de gestação em suínos e ovinos e medição de gordura subcutânea em suínos (CARTEE, 1995; SIEMS, 2000; CARVALHO, 2004; KEALY e McALLISTER, 2012).
- **Modo -B (brilho ou escala cinza):** Imagens de melhor qualidade são obtidas a partir de estruturas relativamente estáticas (músculos, tendões) com índice de imagem mais

baixas. Os ecos de retorno são digitalizados e convertidos em várias intensidades de brilho, em duas dimensões, na forma de uma escala de cinza, e são exibidos num monitor de televisão. Os retornos dos ecos fortes são muito brilhantes, e os dos ecos fracos são cinzentos ou pretos, isto é, a intensidade do brilho é proporcional à amplitude dos mesmos e cuja posição corresponde à profundidade na qual o eco originou-se ao longo de uma única linha produzida por um transdutor. Ocorre uma atualização contínua da imagem pelo computador, com o objetivo de fornecer uma imagem bidimensional (imagem dinâmica ou em tempo real). Usado para maior parte dos exames ultrassonográficos (DROST, 2007; KEALY e McALLISTER, 2012) NYLAND et al., 2005; CARTEE, 1995).

- **Modo-B em Tempo Real:** Exibem uma imagem em movimento, em escala de cinza, da anatomia em corte transversal, obtido por meio da varredura com um feixe de ultrassom fino e focado por um campo de visão triangular, linear ou curvilíneo, em um paciente, várias vezes por segundo. Pulsos sonoros são enviados e ecos são recebidos em seqüência, ao longo de cada linha do modo-B do campo, até que se forme uma imagem de um segmento completo (NYLAND et al., 2005).
- **Modo-M (movimento):** Os ecos de retorno modo-B de uma área específica são assinalados em relação ao tempo para formar um traçado, este vai percorrer o monitor de lado a lado e também vai permitir que o movimento das estruturas seja estudado na forma de traçado em linha ou de mapa. O seu uso é especialmente útil na avaliação cardíaca (medição dos ventrículos e aurículas, movimento das válvulas cardíacas e das paredes do coração) (SIEMS, 2000; KEALY e McALLISTER, 2005; NYLAND et al., 2005).
- **Modo Doppler:** O termo ecografia Doppler ou sonografia “Duplex” ou “Triplex”, usado em alto grau dentro do campo da ultrassonografia, indica o uso adicional do princípio Doppler para medir os parâmetros dos fluxos sanguíneos em determinados órgãos. A ultrassonografia Doppler é usada para identificar o fluxo e a velocidade do sangue como também para calcular os gradientes de pressão pelas válvulas cardíacas. São conhecidos os seguintes tipos de Doppler: o Doppler de ondas contínuas, o Doppler duplex, o Doppler de ondas pulsadas, o power Doppler e o Doppler de fluxo colorido (mais usado), com diferentes avaliações da área de interesse (CARTEE, 1995;

POULSEN NAUTRUP, 2001; GINTHER, 2007). Uma abordagem mais aprofundada sobre essa técnica será mencionada no item 2.4.5.

2.4.4 Interpretações de imagens e terminologia

É de grande importância reconhecer ultrassonograficamente a textura dos órgãos e a terminologia usada pelos ultrassonografistas referente à imagem gerada durante o exame ultrassonográfico (NYLAND et al., 2005). A posição normalmente é descrita observando a relação entre órgãos adjacentes e a arquitetura vascular da região. Os contornos dos órgãos são ditos irregulares quando, as superfícies demonstram irregularidades diversas que podem ser descritas como serrilhadas, macro e micronodulares, etc. Quando uma estrutura não tem forma, denomina-se amorfa. As áreas de alta intensidade de ecos são denominadas ecogênicas/hiperecogênicas (ecos brancos e brilhantes, normalmente indicativo de doença em um parênquima homogêneo). As áreas de baixa intensidade de ecos são denominadas de hipocogênicas (imagem cinza). As áreas que não produzem nenhum tipo de eco são denominadas de anecóicas/anecogênicas (área negra no monitor). Considera-se uma imagem isosecócica quando a ecogenicidade tecidual é a mesma das estruturas adjacentes similares (KEALY e McALLISTER, 2012; NYLAND et al., 2005; GODDART, 1995).

O sangue e o fluido que não contém células ou debris aparecem como uma imagem preta na ultrassonografia em preto-e-branco, pois poucos ecos retornam. Conforme o fluido, este ganha viscosidade pelo aumento de proteínas, células ou debris, tornando-se mais ecogênico, com mais ecos de retorno. Órgãos parenquimatosos (normais) e tecidos do corpo são visibilizados em vários tons de cinza, que são mais ou menos constantes de animal para animal. A gordura e o tecido conectivo são altamente ecogênicos. Os cistos possuem uma imagem arredondada, contornos definidos, e apresentam falta de ecos no seu interior, ou seja, conteúdo anecogênico. A fibrose (padrão sólido) é demonstrada como linhas ecogênicas paralelas ou sobrepostas. O gás é caracterizado pela produção de imagens de alta refletividade e artefatos de reverberação, sombra acústica e cauda de cometa (CARVALHO, 2004; NYLAND et al., 2005).

A textura delicada ou grosseira do parênquima refere-se ao tamanho pequeno ou grande do ponto, respectivamente. Uma textura uniforme (homogênea) sugere um tamanho e espaçamento similares de pontos em todo parênquima. Uma textura não uniforme (heterogênea) sugere um tamanho e espaçamento variado (NYLAND et al., 2005).

Segundo Burk e Ackerman (1996), existem certas características dos órgãos durante o exame ultrassonográfico que devem ser avaliadas, quais sejam:

- **Tamanho:** a maior parte das estruturas pode ser mensurada usando as máquinas de ultrassonografia. Órgãos de grandes dimensões (fígado) são impossibilitados de serem mensurados na sua total dimensão.
- **Forma:** a forma dos órgãos muitas das vezes é distorcida devido o ponto de visibilização. Nestes casos há que ter em conta a pressão exercida no transdutor.
- **Ecotextura:** a intensidade do eco é específica para cada órgão. Um contato fraco entre a pele e o transdutor pode provocar uma estrutura hipoecóica. A intensidade do eco dos órgãos abdominais é comparada com outros órgãos da cavidade abdominal.
- **Posição:** a posição de um órgão pode ser detectada imediatamente pelo exame ultrassonográfico, mas a sua posição pode ser alterada devido à posição do transdutor.
- **Arquitetura ecogênica:** alguns órgãos abdominais são reconhecidos devido a sua arquitetura ecogênica. Estes podem ter uma estrutura anecogênica, ecogênica uniforme ou uma mistura na ecogenecidade.

2.4.5 Ultrassonografia no Modo Doppler

Em 1842, Christian Johann Doppler descreveu a situação na qual uma fonte de ondas (sonoras ou eletromagnéticas), em movimento em relação a um receptor, altera a frequência de onda durante este processo, aumentando a frequência na aproximação da fonte e diminuindo durante o seu distanciamento (KAWAKAMA et al., 1993). O deslocamento Doppler ou frequência Doppler (fd) é definido como a diferença entre a frequência das ondas transmitidas (ft) e a frequência dos ecos recebidos (fr) (GINTHER e UTT, 2004).

Supondo que o transdutor do equipamento capte o movimento de um objeto analisado, deve-se esperar aumento da resposta quando ambos se aproximam e redução quando se afastam. A maior diferença ou sinal mais forte é obtido quando o movimento é paralelo ao feixe de ultrassom. Ao contrário, nenhum sinal é gerado quando o movimento é perpendicular ao feixe (RUBENS et al., 2006).

A técnica fundamentada no efeito Doppler se baseia em alterações nas frequências das ondas emitidas ou refletidas por um objeto em movimento, em relação a um objeto estático (GINTHER e UTT, 2004). Com foco no fluxo sanguíneo, as hemácias são os corpos refletivos em movimento e o transdutor corresponde ao observador. Dentro da caixa colorida, cada ponto

móvel tem uma tonalidade de vermelho ou azul, ao invés de tons de cinza (CERRI et al, 1998). Assim, conforme a velocidade e a direção das hemácias mudam, as imagens ultrassonográficas apresentam cores e tonalidades diferentes dependendo da configuração do aparelho (VERMILLON, 1997). Os fluxos de maior velocidade são expressos por tonalidades mais claras da mesma cor e os de velocidade menor são expressados por tonalidades mais escuras (CERRI et al., 1998).

A ultrassonografia na modalidade Color Doppler se tornou o método diagnóstico de escolha na avaliação da vascularização de vários órgãos, incluindo os testículos (POZOR e MCDONNEL, 2002).

Na maioria das vezes, o modo Doppler, seja no modo espectral pulsado ou no modo colorido, é utilizado em associação com a ultrassonografia bidimensional (SILVA et al., 2012). Esta associação é denominada duplex quando associa o modo B com o modo Doppler espectral, e triplex quando associam os três modos de processamento ao mesmo tempo (KING, 2006; CARVALHO et al., 2009). Cada sinal obtido passa por um processamento isolado que é codificado por cores em relação ao sentido do movimento e da velocidade de cada ponto analisado. Sobre a imagem em modo-B é apresentada uma outra imagem, colorida, que representa um mapeamento dos elementos móveis em relação à intensidade e ao sentido do movimento (KAWAKAMA et al., 1993).

A técnica do Doppler colorido tem a vantagem de fornecer informações sobre o movimento em uma grande parte da imagem (SIGEL, 1998). Esta técnica permite avaliar a presença, a direção e a qualidade do fluxo sanguíneo mais rapidamente do que qualquer outra técnica não invasiva, até mesmo em vasos muito pequenos, que não aparecem no modo bidimensional. Também é possível a diferenciação entre fluxos rápidos e lentos sem a determinação de valores absolutos (GINTHER, 2007).

No Doppler colorido, a imagem apresenta diferentes colorações que são caracterizadas como o fluxo em direção ao transdutor (tons de vermelho) e em sentido contrário (tons de azul), não sendo representações de fluxo sanguíneo venoso ou arterial. O Doppler colorido é subdividido em dois modos distintos: Color-flow e Power-flow. O modo Color-flow clássico representa a perfusão vascular da estrutura em duas cores: vermelho e azul, que indicam o sentido das hemácias em relação ao transdutor. O vermelho corresponde ao fluxo sanguíneo que se desloca em direção ao transdutor, enquanto o azul indica afastamento. Tonalidades

escuras e claras são velocidades lentas e rápidas, respectivamente (GINTHER e UTT, 2004; GINTHER, 2007; DASCANIO, 2014).

O modo Power-flow é uma inovação recente do Color-flow. Inicialmente utilizava-se uma escala graduada em uma única cor, o laranja, independente da direção do fluxo sanguíneo. No entanto, equipamentos recentes de ultrassonografia Doppler têm apresentado o modo Power-flow também graduado em duas cores, de acordo com o sentido do fluxo. A intensidade da cor neste modo varia de acordo com a potência do sinal (GINTHER e UTT, 2004; GINTHER, 2007). Este exame apresenta aumento na sensibilidade de três a cinco vezes em relação ao exame convencional, proporcionando assim a avaliação de vasos sanguíneos com diâmetro menor ou fluxo sanguíneo mais fraco, sendo as características de vascularização representadas em imagens coloridas de uma única coloração, independente da direção do fluxo sanguíneo (GINTHER e UTT, 2004).

Em relação aos exames utilizando o Doppler colorido, a vascularização pode ser graduada através da quantificação do número e tamanho dos pontos ou áreas coloridas (avaliação objetiva), bem como pode ser realizada a avaliação por escores (1 a 4, por exemplo, indicando vascularização mínima e máxima; avaliação subjetiva). A grande vantagem deste tipo de avaliação é a estimativa das características vasculares diretamente em uma estrutura. Ou seja, a avaliação pode ser direcionada especificamente a uma área, possibilitando avaliação sistemática do local desejado, em vez de avaliar apenas um foco (por exemplo, apenas um vaso sanguíneo durante o espectral). Além disso, muitas vezes, devido ao movimento de vísceras e/ou do próprio animal, a manutenção do cursor nos exames em modo espectral é prejudicada, tornando sua realização mais difícil e demorada. As principais desvantagens deste tipo de exame são a utilização de imagens selecionadas e que não são em tempo real (no caso da análise objetiva) ou a subjetividade na atribuição de escore entre avaliadores (análises subjetivas) (GINTHER; UTT, 2004; SILVA et al., 2005; GINTHER, 2007).

Usando-se modo Doppler pulsado, as ondas sonoras são transmitidas como um impulso, sendo que um traçado pode ser visto e simultaneamente um som pode ser ouvido. A equação Doppler ($f_d = 2 f_t v \cos\theta / c$) expressa a magnitude do deslocamento de frequência Doppler (f_d), em que f_t é frequência do feixe ultrassônico transmitido (frequência do transdutor); “v” é a velocidade das hemácias (alvo móvel); θ , o ângulo Doppler (ângulo formado pela intersecção do eixo correspondente à direção do fluxo sanguíneo dentro do vaso e o feixe sonoro); $\cos\theta$ é o

coseno do ângulo formado entre o transdutor e as hemácias; “c” é a velocidade média do ultrassom nos tecidos (1540m.s-1) (CERRI et al., 1998).

Através da fórmula Doppler, é estabelecida a velocidade do fluxo sanguíneo. A magnitude da mudança de frequência (deslocamento Doppler) é maior quando o feixe sonoro e o eixo formado pelo vaso sanguíneo são paralelos ($\theta=0^\circ$, $\cos\theta=1$). Não há deslocamento Doppler se eles forem perpendiculares um ao outro ($\theta=90^\circ$, $\cos\theta=0$) (POULSEN NAUTRUP, 2001).

Com ultrassonografia no modo espectral ou pulsado pode ser avaliada e determinada informações sobre o fluxo sanguíneo de um vaso específico. Para isto, leva-se em consideração o ângulo de insonação (ângulo de inserção do ultrassom com a direção do fluxo sanguíneo (POZOR, 2005a). Para o modo pulsado, as características do fluxo sanguíneo em uma área focalizada de um vaso, são acessadas por colocação de um cursor amostral (ou *gate*) que é a região onde os sinais Doppler são mensurados na imagem em modo B ou em color-Doppler, situado no lúmen de um vaso sanguíneo alvo, que na maioria dos instrumentos possuem um controle operador de ajuste de tamanho do cursor amostral que pode variar de 1 a 10 mm (GINTHER e UTT, 2004). Após a seleção adequada do vaso deve-se efetuar a correção do ângulo de insonação. Valores reais de velocidade podem ser obtidos somente se o ângulo Doppler não exceder 60° , pois um pequeno erro na estimativa do ângulo promove um grande erro acima do valor real (YANIK, 2002).

Após ativação do modo espectral ocorre a geração de um gráfico obtido a partir de informações do fluxo sanguíneo da artéria durante diferentes ciclos cardíacos. Este gráfico é denominado espectro, onde o eixo horizontal representa o tempo e o eixo vertical a frequência de deslocamento Doppler. O espectro representa a mudança de velocidade do fluxo sobre o tempo, retratando os pulsos arteriais gerados por cada ciclo cardíaco (GINTHER, 2007). Neste gráfico, a linha de base horizontal representa o fluxo zero, o fluxo em direção ao transdutor é representado acima da linha de base e abaixo desta linha é demonstrado o fluxo em direção oposta (SZATMÁRI et al., 2001; CARVALHO et al., 2008b). Por convenção, o traçado espectral é disposto acima do zero da linha de base (desvio positivo) quando a frequência do eco retornado é maior do que a frequência transmitida e, o fluxo encontra-se na direção do transdutor. Um traçado disposto abaixo da linha de base (desvio negativo) indica que o fluxo está direcionado no sentido contrário ao transdutor e a frequência retornada é menor do que a frequência de insonação (CARVALHO et al., 2008a; CARVALHO, 2009). O modo espectral

fornece valores exatos de velocidades do fluxo sanguíneo e índices Doppler teciduais (GINTHER e UTT, 2004).

A frequência Doppler exibe um espectro resultante que demonstra a variação existente das frequências Doppler com o tempo no volume da amostra, com o invólucro do espectro representando as frequências máximas presentes em dado momento no tempo e a largura do espectro em algum ponto, indicando a variação das frequências presentes. O aumento da largura determinado pelo alargamento de janela espectral ocorre quando grande número de frequências diferentes está presente em qualquer ponto em particular (MERRITT, 1999).

O brilho, representado na escala de cinza, também é usado para representar amplitude de cada componente de frequência, indicando a quantidade de células sanguíneas que viajam a uma velocidade particular. Quanto maior o brilho do traçado espectral de um local, tendendo para o branco, maior o número de células que passaram àquela velocidade no momento específico da amostragem (VAITKUS e COBBOLD, 1988; CARVALHO et al, 2008b).

A perfusão de cada órgão determina o estado do seu leito vascular, que, por sua vez, afeta as características de fluxo dos vasos adjacentes. O contorno da linha de frequência de deslocamento Doppler máxima corresponde ao tempo de variação de máxima velocidade de fluxo dentro do vaso (FINN-BODNER e HUDSON, 1998).

O padrão de fluxo de alta resistividade se caracteriza por alta pulsabilidade e alta resistividade de fluxo, observado pela presença de picos sistólicos finos (afilados) e fluxo reverso no início da diástole, um exemplo deste de fluxo é observado na aorta (CERRI et al., 1998; SZATMARI et al., 2001; CARVALHO et al., 2008b).

O padrão de fluxo de baixa resistividade se caracteriza por baixa pulsabilidade e baixa resistividade de fluxo, com a presença de picos sistólicos amplos e contínuos e alta velocidade de fluxo na diástole com velocidade decrescente. As artérias de baixa resistividade, como exemplo a artéria renal, suprem órgãos que possuem demanda contínua de sangue (CERRI et al., 1998; SZATMARI et al., 2001; CARVALHO et al., 2008b).

O padrão de fluxo de resistividade intermediária se caracteriza por fluxos de pulsabilidade e resistividade intermediária, evidenciando a presença de picos sistólicos afilados, mais amplos do que os das artérias de padrão de alta resistividade e fluxo direcional diastólico sem fluxo reverso, como exemplo na artéria mesentérica cranial (RIESEN et al., 2002; CARVALHO et al., 2008a). O pico de velocidade diastólico é mais baixo do que no padrão de

baixa resistividade, quando se compara ao pico de velocidade sistólica (CERRI et al., 1998; SZATMARI et al., 2001; CARVALHO et al., 2008b; CARVALHO, 2009).

O padrão do fluxo venoso geralmente é laminar. As condições de pressão intratorácica e intra-abdominal, durante a inspiração/ expiração, influenciam na velocidade do fluxo sanguíneo venoso, promovendo alterações de fase. A grande maioria das veias tem baixo grau de plasticidade e periodicidade (CERRI et al., 1998; SZATMARI et al., 2001; CARVALHO et al., 2008b).

Alterações no vaso avaliado podem sugerir alterações no traçado espectral e este fato pode ser um indicativo de alterações fisiológicas, sistêmicas ou de alguma enfermidade no local (CARVALHO, 2009). Alterações sistêmicas como hipertensão e doenças cardíacas também podem alterar o traçado espectral de vários vasos (GRANATA et al., 2009).

Na análise quantitativa do traçado Doppler Espectral, a maioria dos aparelhos tem a configuração automática para realizar o cálculo da média da frequência de deslocamento ou a velocidade automaticamente (SIGEL, 1998). O ponto máximo alcançado no espectro é denominado velocidade de pico sistólico (PSV) e o ponto mínimo na morfologia da onda é o valor da velocidade diastólica final (EDV). O fluxo médio pode ser calculado multiplicando-se a velocidade média pela área do vaso (GINTHER, 2007; CARVALHO, 2009).

Os índices Doppler foram desenvolvidos pois as informações sobre a impedância vascular não pode ser obtida apenas pelo valor de velocidade absoluta. Esses índices comparam o fluxo durante a sístole e a diástole, sendo razões das velocidades obtidas do espectro Doppler (NOVELLAS et al., 2007; CARVALHO, 2009). A vantagem desses índices em relação à análise isolada de velocidade é de que os índices têm a independência da correção do ângulo, sendo eles utilizados para avaliar vasos muito pequenos e tortuosos onde é difícil a correção do ângulo (NELSON e PRETORIUS, 1988).

Os índices Doppler, tais como a proporção sistólica/ diastólica, o índice de resistividade (RI) e de pulsabilidade (PI), fornecem informações acerca da resistência arterial ao fluxo sanguíneo, assim indicam alterações que resultam de uma variedade de enfermidades (SIGEL, 1998; MERRITT, 1999; NOVELLAS et al., 2007). Os índices mais utilizados são o RI e o PI. O RI, descrito por Pourcelot em 1974, relacionam o resultado da subtração entre as velocidades de pico sistólico e diastólico final sobre a velocidade de pico sistólico ($RI = \frac{PSV - EDV}{PSV}$). O PI, descrito por Gosling e King em 1974, relaciona o resultado da subtração entre as velocidades de pico sistólico e diastólico final sobre a velocidade média ($PI = \frac{PSV - EDV}{\text{velocidade média}}$).

VM) (GINTHER, 2007; CARVALHO, 2009). RI e PI arterial apresentam correlação negativa com a perfusão vascular do tecido irrigado pelo mesmo, ou seja, quanto menor RI e PI maior será a perfusão vascular no tecido suprido por aquele vaso (GINTHER, 2007).

Pozor e McDonnel (2004), no exame da artéria testicular, obtiveram duas medidas que refletem diretamente as velocidades do fluxo sanguíneo nos vasos arteriais durante o ciclo cardíaco (PSV e EDV). No entanto, os valores de EDV são conhecidos por serem consideravelmente variáveis e não consistentes entre as medidas (COCHARD et al., 2000). Já observando os índices calculados (RI e PI), esses autores relataram que esses valores pareciam ser indicadores mais sensíveis do fluxo sanguíneo arterial do que PSV e EDV, pois forneceram informações sobre a impedância vascular, não apenas a velocidade.

Destes dois índices, o RI foi mais sensível na diferenciação de formas de onda anormais, especialmente para a avaliação do rim transplantado (RIFKIN et al., 1987). Além disso, o RI da artéria testicular pareceu ser a medida clínica mais útil do fluxo sanguíneo para e dentro do testículo e epidídimo (POZOR e McDONNELL, 2004). Geralmente o RI é alterado pelos processos inflamatórios (JEE et al., 1997) e pelo próprio envelhecimento (WIELGOS et al., 1998).

Um aumento na velocidade diastólica leva a um correspondente aumento do fluxo sanguíneo e redução dos índices de resistividade e pulsabilidade (RIESEN et al., 2002). Portanto, baixa resistividade de fluxo sugere alto metabolismo e altas resistências sugerem baixo metabolismo. Já índices de resistência aumentados reduzem o fluxo diastólico. Dependendo da alteração que está ocasionando o aumento da resistência, pode-se encontrar até ausência de fluxo diastólico ou a chamada diástole zero (CARVALHO, 2009).

A vantagem do RI é sua alta sensibilidade para diferenciar traçados anormais, porque o denominador nunca se torna zero, permitindo sempre a obtenção de um valor para este índice. O PI tem como vantagem o fato de levar em conta a velocidade média, que reflete o que ocorre durante todo o ciclo cardíaco, e não em apenas um momento específico como o RI (NELSON et al., 1988).

As alterações nos índices hemodinâmicos auxiliam na identificação da perfusão e de alterações na complacência do leito vascular, disfunções de parênquima, caracterização de malignidade de doenças (CARVALHO, 2009), para definir o prognóstico e para acompanhar o tratamento (IZUMI et al., 2000). Alguns exemplos são no caso da estenose, onde ocorre uma redução significativa do volume sanguíneo e aumento da velocidade deste provocando

turbulência e aumento do RI e do PI (GRANATA et al., 2009) e em casos de estados inflamatórios, que são caracterizados por aumento do fluxo sanguíneo em resposta a hiperemia, podendo ocorrer redução da resistência arterial nos tecidos ou órgãos envolvidos (MARTINOLI et al., 1998).

Nos equinos a ultrassonografia do trato reprodutivo é uma excelente ferramenta no diagnóstico de inúmeras condições patológicas como granuloma espermático, epididimites, criptorquidismo (HELD et al., 1989; LOVE, 1992), varicocele, estruturas císticas do epidídimo, aumento da espessura da túnica vaginal (POZOR, 2005b) e neoplasias testiculares (HUNT et al., 1990; MELO et al., 2007). Além disso, este exame permite aferições exatas de medidas tais como altura, largura e comprimento, bem como área transversal e circunferência na parte mais larga de cada testículo, medidas estas utilizadas para estimar volume testicular e produção diária de espermatozoides (McKINNON, 2010). Embora esses índices sejam úteis, é importante ter em mente que essas medidas são influenciadas não apenas pela resistência ao fluxo nos vasos periféricos, mas por muitos outros fatores, inclusive a frequência cardíaca, a pressão sanguínea, o comprimento e a elasticidade dos vasos, bem como, a compressão orgânica extrínseca (MERRITT, 1999).

Além disso, o uso de alguns fármacos como, sedativos, anestésicos e medicamentos cardiovasculares podem atuar no sistema vascular alterando sua resistência (CARVALHO, 2009). Estudos em humanos também mostram que os índices podem variar de acordo com a idade, sendo encontrado RI mais elevado em crianças e idosos (GRANATA et al., 2009). Portanto, a interpretação deve considerar sempre todas essas variáveis (CARVALHO, 2009).

Muitas vezes, para garantir máxima qualidade do exame, mesmo animais dóceis precisam ser anestesiados para controlar os movimentos respiratórios, sendo que alguns autores recomendam que o uso de anestésicos seja feito sempre que possível (NELSON et al., 2010).

Segundo trabalhos realizados por Pozor e McDonnell (2002), as mensurações do fluxo sanguíneo testicular são semelhantes antes e após o uso de cloridrato de xilasina para sedação dos garanhões na dosagem de 0,5 mg/kg, *i.v.* Com o transdutor posicionado em três pontos distintos da artéria testicular, sedados e não sedados com xilazina, respectivamente: cordão espermático (0,6 - 1 e 0,72 - 1), porção proximal da artéria testicular na borda epididimária do testículo (0,73 - 1 e 0,66 - 1) e parte distal da artéria testicular na borda livre do testículo (0,8 - 0,99 e 0,74 - 1). Com esse estudo, os autores relataram que em todos três locais da artéria testicular, a velocidade do pico sistólico, o índice de resistividade e o índice de pulsatilidade

foram similares com e sem sedação prévia ao exame. Este fator pode amenizar algumas especulações que poderiam ser tomadas pelo fato da artéria testicular no nível do cordão ter um aspecto convoluto, o que seria capaz de demonstrar divergências nos valores obtidos, pois seria difícil mensurar o fluxo sanguíneo através do RI sempre no mesmo ponto, nos cordões esquerdo e direito e entre animais diferentes, já que foi demonstrado que independente da porção da artéria escolhida para o exame, os valores de RI obtidos serão semelhantes.

Em 2004, Pozor e McDonnell obtiveram formas de onda bifásicas de fluxo sanguíneo principalmente "resistivas" para os testículos de garanhão ao nível do cordão espermático e, principalmente, formas de onda monopásicas "não-resistivas" do aspecto marginal da artéria testicular. Middleton et al. (1989) descreveram formas de onda Doppler das artérias dos testículos de homens normais e valores de referência estabelecidos para medidas do fluxo sanguíneo testicular. Semelhante aos resultados de Pozor e McDonnell, eles relataram que as formas de onda de velocidade das artérias suprategesticulares eram bastante variáveis, em contraste com as artérias capsulares e intrategesticulares. O RI para as artérias capsulares e intrategesticulares dos testículos humanos foi menor do que nas artérias suprategesticulares, enquanto que nos garanhões, os valores do RI médio no aspecto marginal da artéria eram apenas um pouco menores do que no aspecto enrolado. Essa diferença foi estatisticamente significativa. Devido às limitações da instrumentação, não foi possível avaliar o fluxo sanguíneo nas artérias intrategesticulares. O **Quadro 1** demonstra os valores de RI e PI obtidos na artéria testicular ao nível de cordão espermático e à nível periférico relatados por Pozor e McDonnell (2004).

Quadro 1 - Medidas de fluxo sanguíneo (PI e RI) das artérias testiculares de 41 garanhões (n= 82 testículos) mensurados por ultrassonografia no modo color Doppler espectral segundo Pozor e McDonnell (2004).

Mensurações	Artéria testicular convoluta (cordão espermático)		Artéria testicular marginal	
	Média	Varição	Média	Varição
RI	0,78	0,56-0,99	0,63	0,39-0,85
PI	1,99 ^A	0,96-3,96	1,15 ^B	0,55-2,29

*RI: índice de resistividade; PI: índice de pulsatilidade. Os valores com diferentes sobrescritos diferem (A, B: P <0: 001).

Pozor, et al. (2006b), relataram outra pesquisa avaliando o fluxo da artéria testicular com ultrassonografia no modo Doppler espectral nas quatro estações do ano. Os autores relatam

que ocorrem flutuações no fluxo sanguíneo testicular entre as diferentes estações e que essa regulação pode estar relacionada também as mudanças demonstradas no volume testicular e na produção de espermatozoides nessas diferentes fases. A pesquisa demonstrou que houve diferenças entre as estações do ano para as seguintes variáveis: pico de velocidade sistólico (PSV), velocidade diastólica final (EDV), diâmetro arterial, taxa de fluxo sanguíneo da artéria testicular (TABF), concentração de testosterona e de estradiol. O estudo relata que a perfusão testicular aumenta durante a estação reprodutiva correlacionado também com o aumento das concentrações de testosterona. Isso parece ser principalmente por aumento do diâmetro da artéria testicular e aumento da velocidade média do fluxo sanguíneo.

2.5 Anatomia Ultrassonográfica do Sistema Genital dos Garanhões

Os órgãos genitais masculinos são constituídos de segmentos contínuos que servem à formação, ao amadurecimento, ao transporte e à transferência das células germinativas, os espermatozoides. Nas gônadas masculinas, os testículos, são produzidos os espermatozoides e os hormônios. Na cauda do epidídimo, os espermatozoides são armazenados até seu amadurecimento final, e, daí, transportados para o ducto deferente, alcançando a luz uretral. Nessa parte da uretra, misturam-se às secreções das glândulas genitais acessórias, com a consequente formação do esperma ou sêmen (KÖNIG E LIEBICH, 2004). A **Figura 1** representa um esquema da organização anatômica dos órgãos genitais masculinos de um garanhão.

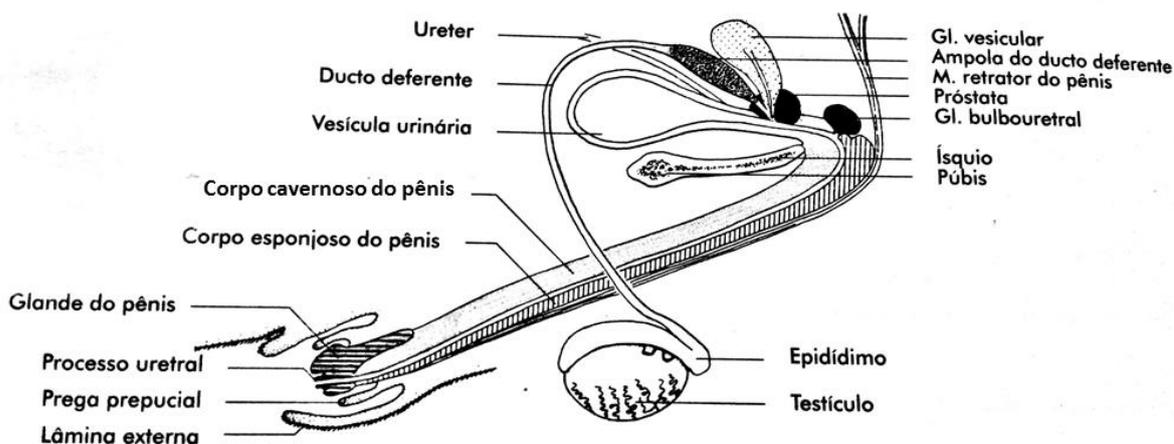


Figura 1 – Representação esquemática dos órgãos genitais do garanhão.
Fonte: König e Liebich (2004).

2.5.1 Anatomia do escroto, testículo, epidídimo e cordão espermático

Um garanhão normal possui dois testículos localizados na região inguinal, cada um com formato elipsóide, orientados longitudinalmente no eixo horizontal com um cordão espermático localizado cranio-dorsal (LOVE, 1992; TURNER, 1998). O funículo espermático é recoberto pela túnica albugínea e contém a artéria testicular, plexo pampiniforme e ducto deferente (Figura 2) (KÖNIG E LIEBICH, 2004).

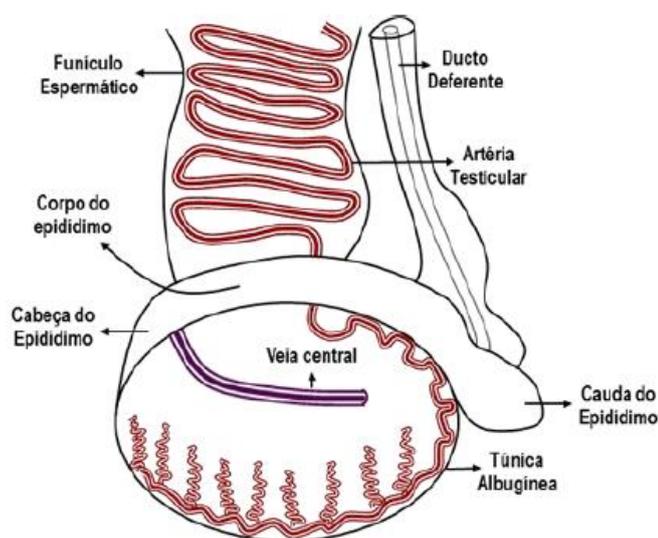


Figura 2- Representação esquemática da orientação do testículo, epidídimo, funículo espermático e estruturas ultrasonográficas importantes.
Fonte: Monteiro (2017).

O exame ultrassonográfico desta região normalmente é realizado com o animal em estação e devidamente contido, tendo em vista que o examinador deverá colocar-se em uma posição potencialmente perigosa em frente aos membros pélvicos do garanhão. A maioria dos garanhões são mais facilmente manipulados após a colheita de sêmen, pois eles estão mais relaxados e toleram melhor a manipulação (LOVE, 1992; CHENIER, 2009).

A utilização de um transdutor linear ou setorial de 5.0 ou 7.5MHz fornece imagens de boa qualidade para avaliação dos órgãos genitais externos (TURNER, 1998; CHENIER, 2009). A aplicação de gel no local ou a utilização de standoff pad (distanciador), melhoram a qualidade da imagem por aumentarem o contato com a pele (LOVE, 1992).

Para realização do exame dos testículos o examinador deve posicionar-se lateralmente ao animal em estação, empurrando o testículo contralateral dorsalmente, facilitando assim, a apreensão do funículo espermático do testículo a ser examinado. Após manter o testículo na posição ventral do escroto o transdutor é colocado na posição vertical, iniciando o escaneamento da região cranial para região caudal (LOVE, 1992).

Na projeção transversal do testículo no garanhão não é possível a distinção do mediastino testicular como presente em outras espécies, tais como em humanos, bovinos, suínos e caninos (CARTEE ET AL., 1986; EILTS e PECHMAN, 1988). Em um posicionamento transversal é possível distinguir vasos sanguíneos do funículo espermático e a cabeça do epidídimo. O sangue é drenado do testículo pela veia central, podendo este vaso, muitas vezes, ser visualizado no corte transversal (**Figura 3**), especialmente em testículos maiores (LOVE, 1992). Na imagem ultrassonográfica em corte longitudinal, a veia central aparece como uma estrutura anecóica, que diminui em diâmetro à medida que segue para a região caudal (**Figura 4**). A veia central atravessa a túnica albugínea, ramificando-se para a formação do plexo pampiniforme (GINTHER e UTT, 2004).

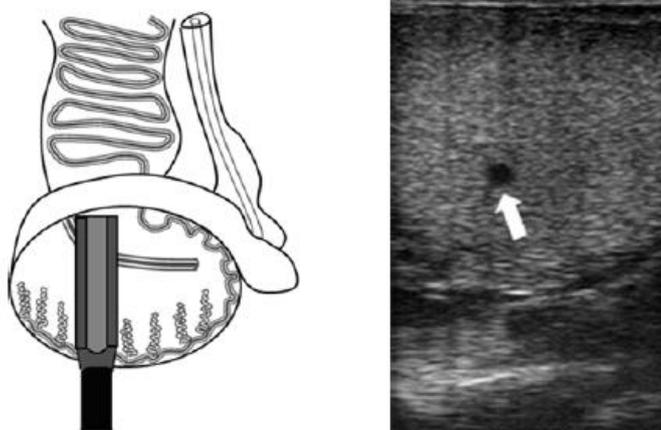


Figura 3 - O esquema demonstrando o posicionamento de um transdutor linear (5 MHz de frequência) colocado no testículo para avaliação da veia central. Na imagem ultrassonográfica (direita) de um testículo normal (corte transversal), a veia central aparece como uma estrutura anecóica com formato circular (seta).

Fonte: Monteiro (2017).

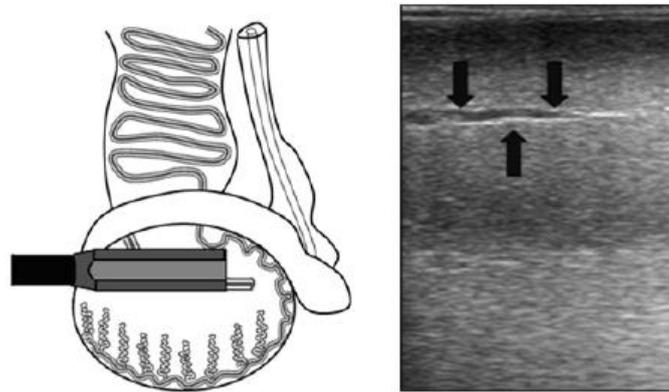


Figura 4 - O esquema à esquerda demonstra o posicionamento do transdutor linear (5 MHz de frequência) no testículo para avaliação da veia central. Na imagem ultrassonográfica (corte longitudinal), a veia central aparece como uma estrutura anecóica (setas).
Fonte: Monteiro (2017).

O funículo espermático é mais facilmente visualizado pela colocação da probe na posição horizontal, bem próximo ao testículo. O plexo pampiniforme apresenta-se como uma imagem manchada heterogênea, e a artéria testicular é identificada em cortes (CHENIER, 2009) com aspecto de queijo suíço (LOVE, 1992), como demonstrado na **Figura 5**.

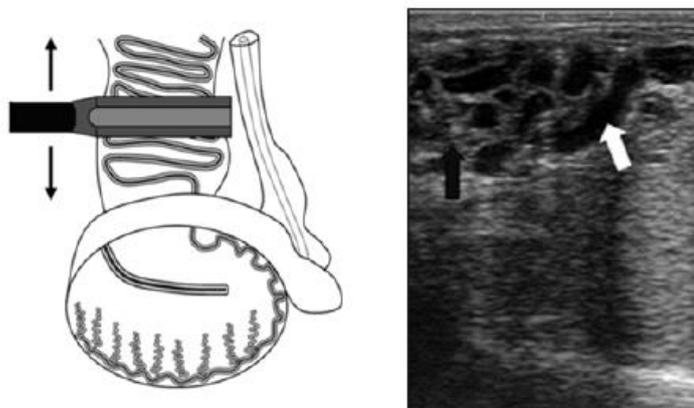


Figura 5 - O esquema à esquerda demonstra o posicionamento do transdutor linear (5 MHz de frequência) na avaliação do funículo espermático. Na imagem ultrassonográfica (direita) a artéria testicular é identificada como estruturas anecóicas em cortes (seta branca), e o plexo pampiniforme como uma estrutura heterogênea envolvendo a artéria (seta preta). Fonte: Monteiro (2017).

Em certas posições é possível visualizar ramos da artéria testicular (**Figura 6**), sendo esses vasos maiores e mais proeminentes próximos à cauda do epidídimo. O parênquima testicular normal possui textura homogênea (LOVE, 1992).

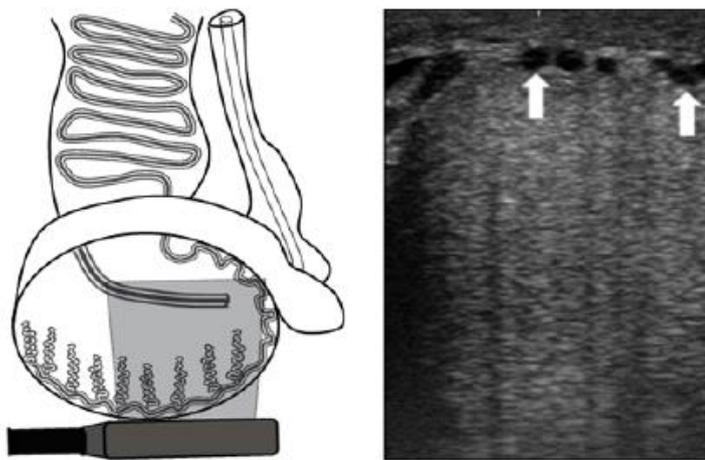


Figura 6 - O esquema à esquerda demonstra o posicionamento do transdutor linear (5 MHz de frequência) no testículo, possibilitando a visualização dos ramos da artéria testicular (setas). Fonte: Monteiro (2017).

A avaliação ultrassonográfica de estase venosa dentro dos vasos do funículo espermático, pode ter significado clínico na avaliação do suprimento sanguíneo testicular (LOVE, 1992). Distensão anormal das veias do plexo pampiniforme é rara em garanhões, sendo esta condição denominada *varicocele* (CHENIER, 2009).

O epidídimo é um órgão alongado, enovelado, localizado na superfície do testículo (SULLIVAN et al., 2005). Ele pode ser dividido anatomicamente em três segmentos: cabeça, intimamente ligada à região crânio-dorsal do testículo; corpo, que se encontra horizontalmente disposto na superfície dorso-lateral do testículo; cauda, responsável pelo armazenamento dos espermatozoides, formado por um ducto epididimário com a forma cilíndrica que se estende na região caudal do testículo (LOVE, 1992) que com auxílio do ligamento espesso (ligamento da cauda do epidídimo), mantém-se firmemente fixado ao testículo (**Figura 7**). O ducto deferente é uma continuação do ducto da cauda do epidídimo (TURNER, 1998).

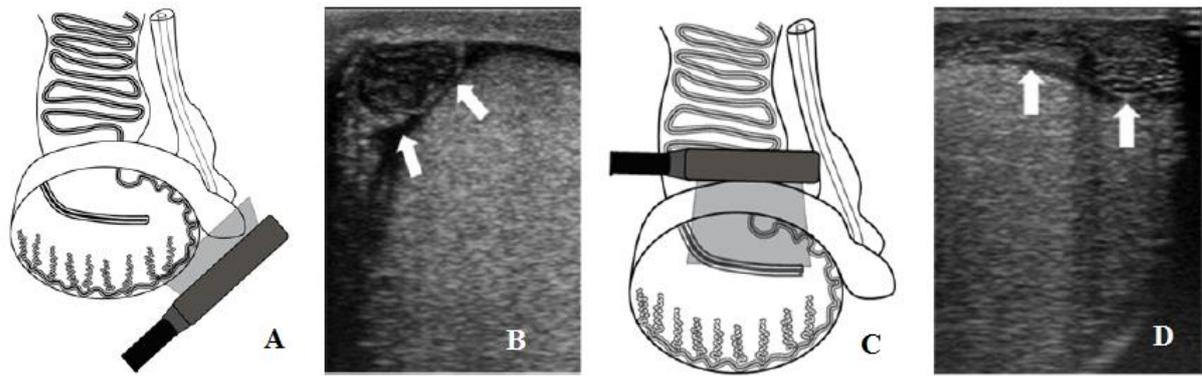


Figura 7 - O esquema demonstra o posicionamento do transdutor linear (5 MHz de frequência) para avaliação da cauda do epidídimo em A e na superfície dorso-lateral do testículo para avaliação do corpo do epidídimo em C. Na imagem ultrassonográfica em B observa-se a cauda do epidídimo (setas) hipocóica em relação ao parênquima testicular. A presença de líquido na cavidade vaginal facilita o exame. A imagem ultrassonográfica em D demonstra o corpo do epidídimo (setas) apresentando-se hipocóico em relação ao parênquima testicular normal. Fonte: Imagem adaptada de Monteiro (2017).

A túnica albugínea é uma forte cápsula fibrosa que está intimamente associada com a superfície do testículo, produzindo delicada compressão do parênquima testicular. Os septos que se estendem no parênquima, a partir do interior da cápsula, não juntam para formar um mediastino visivelmente distinto. (DYCE et al., 2005). Por isso no garanhão não é possível a distinção do mediastino testicular presente em outras espécies, como em humanos, bovinos, suínos e caninos (CARTEE et al., 1986; EILTS e PECHMAN, 1988).

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

2.5.2 Anatomia ultrassonográfica das glândulas sexuais acessórias

As glândulas sexuais acessórias são responsáveis pela produção da maior parte do plasma seminal que é eliminado junto com os espermatozoides, provenientes da cauda do epidídimo, durante a ejaculação (KÖNIG e LIEBICH, 2004). As glândulas sexuais acessórias do garanhão incluem as glândulas vesiculares emparelhadas, um par de ampolas do ducto deferente, próstata, e um par de glândulas bulbouretrais, como demonstra o esquema na figura 8 (WEBER e WOODS, 1992).

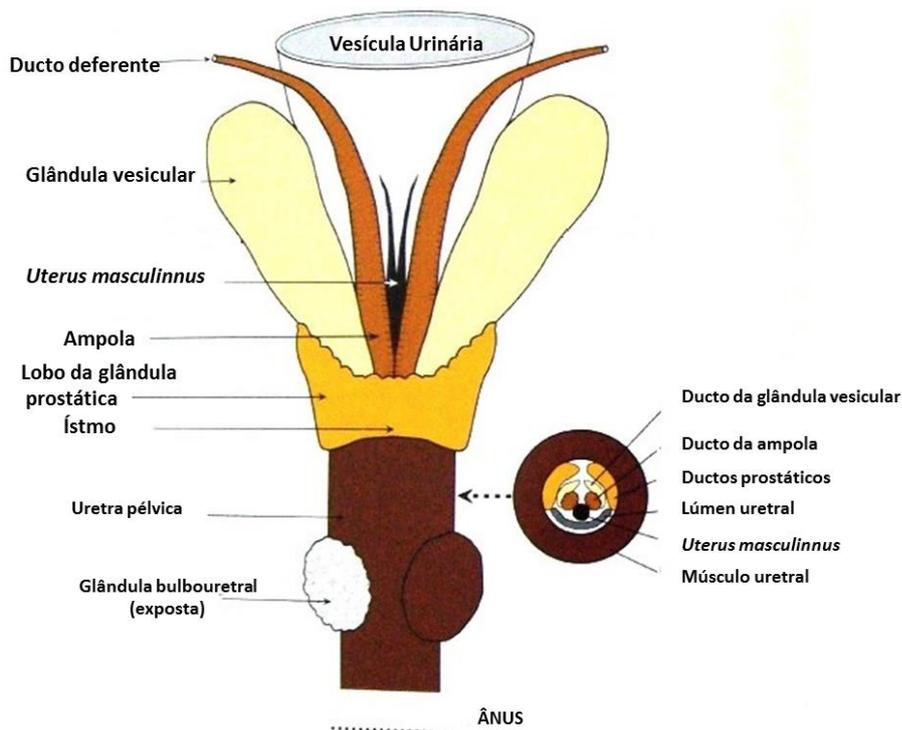


Figura 8 - Diagrama dos ramos arteriais pélvicos e abdominais de garanhão Fonte: Imagem adaptada de Ginther (2007).

A primeira porção do ejaculado é a fração pré-espermática, aquosa, e provêm das glândulas bulbouretrais e da próstata. Esta fração possui a função de limpeza da uretra. A segunda porção é rica em espermatozoides, leitosa, e é composta por secreções do epidídimo e da ampola do ducto deferente. A terceira porção contém poucos espermatozoides, mas grandes quantidades de ácido cítrico e gel, proveniente das vesículas seminais, que arrastam os poucos espermatozoides que restaram na uretra (AMANN e GRAHAM, 1993).

O exame das glândulas sexuais acessórias não é realizado com tanta frequência no exame andrológico de garanhões. No entanto, tanto a palpação transretal quanto o exame ultrassonográfico, podem auxiliar no diagnóstico de patologias que podem comprometer a capacidade reprodutiva de garanhões (WEBER e WOODS, 1993). As principais patologias associadas a essas regiões são obstrução da ampola, vesiculite seminal, neoplasias prostáticas e cistos da glândula bulbouretral (MONTEIRO, 2017).

Após a retirada das fezes do reto, as glândulas sexuais acessórias são examinadas por palpação transretal para avaliação do tamanho e consistência. Após esse procedimento, o transdutor do ultrassom é lubrificado e introduzida no reto do animal até na altura do pulso, com os cristais voltados ventralmente (WEBER e WOODS, 1993).

O exame normalmente requer contenção do animal e às vezes tranquilização leve. A maioria dos garanhões aceita melhor o exame após a colheita de sêmen, no entanto, de um modo geral neste momento é mais difícil avaliar, pois as glândulas diminuem seu diâmetro e quantidade de fluido no seu interior. A estimulação sexual e frequência das ejaculações podem alterar significativamente a forma, tamanho e aparência ultrassonográfica das glândulas sexuais acessórias de garanhões normais, como demonstrado na **Figura 9** (CHENIER, 2009).

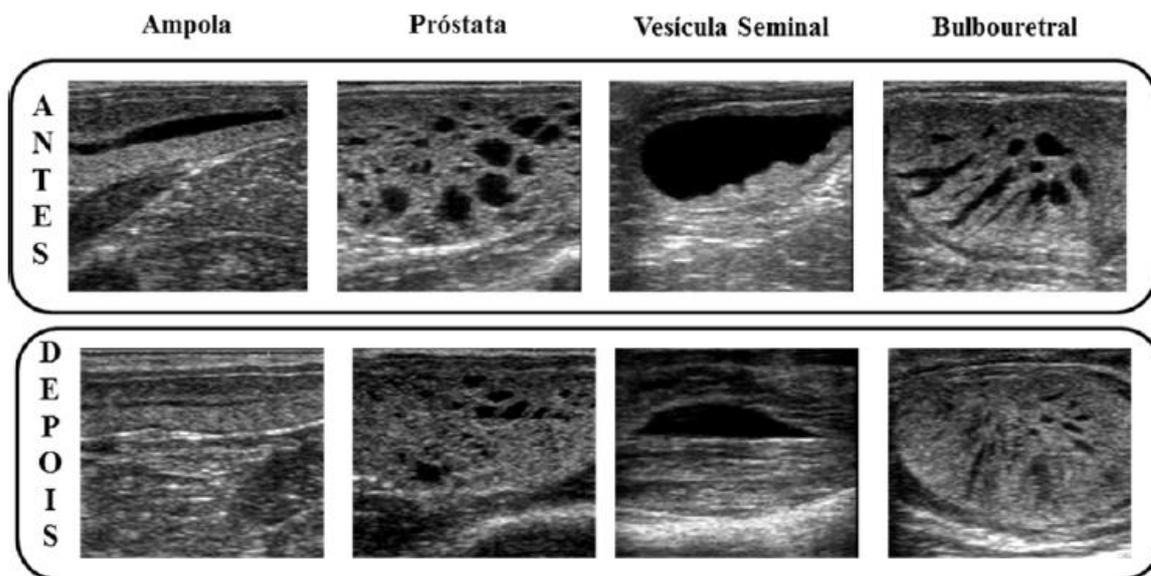


Figura 9 - Forma, tamanho e aparência ultrassonográfica das glândulas sexuais acessórias de garanhões normais antes e após ejaculação. Fonte: Monteiro (2017).

Com a entrada do ducto deferente no abdômen, o mesmo alcança a face dorsal da bexiga ao lado da margem medial da glândula vesicular, onde há uma dilatação da parede do ducto para formar a ampola. Os ductos deferentes penetram na parede uretral próximo à origem da uretra, a partir da bexiga (DYCE et al., 2005).

As ampolas são localizadas dorso-laterais à bexiga e mediais às glândulas vesiculares. Seguindo em uma direção craniocaudal, elas convergem, passam entre o istmo da próstata e da superfície dorsal da uretra, e diminuem para ductos excurrentes dentro do lúmen da uretra proximal (WEBER e WOODS, 1993).

Para obtenção de cortes longitudinais da glândula, o transdutor deve ser colocado diretamente em cima da mesma. A imagem resultante do parênquima é de uma estreita faixa homogênea. Ocasionalmente, o lúmen da ampola é visível como uma linha anecóica fina (líquido) ou aparece como uma linha hiperecótica, quando é desprovida de líquido (TURNER,

1998). Em gananhões normais o lúmen e diâmetro total da ampola aumentam após a estimulação sexual ocorrendo o inverso após a ejaculação (MONTEIRO, 2017).

As ampolas podem ser visualizadas em cortes transversais, girando o transdutor em um ângulo de 90° ao longo do eixo da glândula. A imagem é mais facilmente obtida com transdutor de 7,5 MHz. Com esta abordagem, as ampolas podem ser vistas no curto eixo transversal até sua entrada para a uretra (TURNER, 1998).

Glândulas vesiculares nos gananhões apresentam superfície lisa, forma de pêra, aproximadamente 12 cm de comprimento, e grande lúmen central. As vesículas seminais estão localizadas dorsolaterais à bexiga (WEBER E WOODS, 1993), e são visualizadas ao mover o transdutor ligeiramente caudal e lateral à ampola. Quando visualizada na seção longitudinal, suas paredes musculares são mais hiperecóticas do que as vísceras adjacentes. Em repouso, as paredes das vesículas seminais permanecem achatadas dorso-ventralmente, e possuem aparência ultrassonográfica homogênea. Quantidades variáveis de líquido anecótico podem estar presentes dentro do lúmen glandular (TURNER, 1998). As glândulas vesiculares são prontamente identificadas quando há acúmulo de líquido, mas elas são difíceis de distinguir quando desprovidas de fluídos (WEBER e WOODS, 1993). Após a estimulação sexual, a quantidade de líquido luminal aumenta, e as glândulas vesiculares tornam-se distendidas e arredondadas (MONTEIRO, 2017).

A próstata consiste em dois lobos laterais compactos e lobulados, unidos por um estreito istmo que atravessa a face dorsal da uretra, próximo ao colo da bexiga. Cada lobo é pressionado contra a margem da uretra, e se estendem cranialmente ao longo da extremidade caudolateral da glândula vesicular adjacente (KÖNIG e LIEBICH, 2004).

O istmo da próstata está localizado na linha média, caudal às vesículas seminais. Os lobos da próstata se estendem dorso-lateral ao istmo imediatamente caudal à inserção das ampolas e glândulas vesiculares. Os lobos são vistos ao mover o transdutor lateralmente. O parênquima prostático aparece branco acinzentado e heterogêneo, contendo vários espaços anecóticos (TURNER, 1998). Após estimulação sexual, o tamanho total da próstata, e o tamanho e densidade dos espaços cheios de líquido, aumentam. O tamanho da glândula e seus espaços de fluído diminuem após a ejaculação (WEBER e WOODS, 1993; TURNER, 1998). As Glândulas bulbouretrais situam-se dorsolateralmente à uretra, na saída da pelve. São finamente revestidas por músculo estriado (músculo bulboglandular) de aproximadamente 4 cm de comprimento (DYCE et al., 2005).

Para exame ultrassonográfico destas glândulas, o pulso e a palma da mão são retirados do reto, restando apenas os dedos e o transdutor dentro do esfíncter anal. Quando visualizada no corte longitudinal no exame ultrassonográfico, cada glândula é delineada por uma borda fina hipoeecóica, correspondente ao músculo bulboglandularis que circunda o parênquima glândular isoecóico. Pequenas áreas hipoeecóicas são observadas ao longo do seu parênquima (WEBER e WOODS, 1993; TURNER, 1998). Após estimulação sexual constata-se o aumento do conteúdo de líquido e diâmetro total das glândulas bulbouretrais. O líquido é ocasionalmente visível dentro do lúmen uretral, nas proximidades dos ductos excurrentes das glândulas bulbouretrais (WEBER e WOODS, 1993). Posteriormente à ejaculação, o tamanho e aparência voltam ao observado na fase de estimulação (TURNER, 1998).

2.5.3 Anatomia ultrassonográfica do pênis

O pênis do garanhão é classificado como musculocavernoso e pode ser anatomicamente dividido em base, corpo e glande. Os corpos cavernosos do pênis estão rodeados pela túnica albugínea. O corpo esponjoso envolve a uretra ao longo do eixo do pênis, expandindo para formação do tecido erétil da glande (TURNER, 1998).

Para realização do exame o pênis deve estar totalmente ereto, e isso requer que o garanhão fique tranquilo após estimulação sexual sem perder a ereção. Como alternativa, o garanhão pode ser sedado. Em muitos casos, após a sedação, o pênis flácido fica exposto, e pode ser examinado (TURNER, 1998).

Antes do exame, o pênis do garanhão deve ser lavado e seco, proporcionando assim uma superfície sem rugosidades. O escaneamento do pênis pode ser feito com transdutor de 5,0 ou 7,5 MHz. A aplicação de gel no local ou a utilização de standoff pad (distanciador), melhoram a qualidade da imagem por melhorarem o contato do transdutor com o pênis (MONTEIRO, 2017).

Após a ereção, um transdutor linear (corte transversal) é colocado a partir da base da glande, seguindo ao longo do pênis. O escaneamento fornece imagens transversais do pênis, uretra e musculatura associada, corpo cavernoso do pênis e corpo esponjoso do pênis (**Figura 10A**). O pênis também pode ser examinado em cortes longitudinais, colocando o transdutor paralelo ao eixo do pênis (**Figura 10B**). Além disso, imagens oblíquas podem ser úteis para avaliação dos vasos superficiais do pênis (TURNER, 1998).

Quando o transdutor é movido em direção à glande, o corpo cavernoso do pênis apresenta aspecto heterogêneo e vai diminuindo lentamente de tamanho. Com o pênis ereto, o

espaço preenchido com sangue no corpo cavernoso do pênis é identificado como espaços anecóicos. Além disso, trabéculas provenientes da túnica albugínea podem ser vistas (hiperecóticas) na face ventral do corpo cavernoso, irradiando para fora. A túnica albugínea é visível tanto no corte transversal, quanto no corte longitudinal. Imagens obtidas com o transdutor colocado dorsalmente ao pênis providenciarão melhor detalhe do corpo cavernoso, e as obtidas ventro-dorsal terão melhor imagem do corpo esponjoso do pênis (TURNER, 1998; MONTEIRO, 2017).

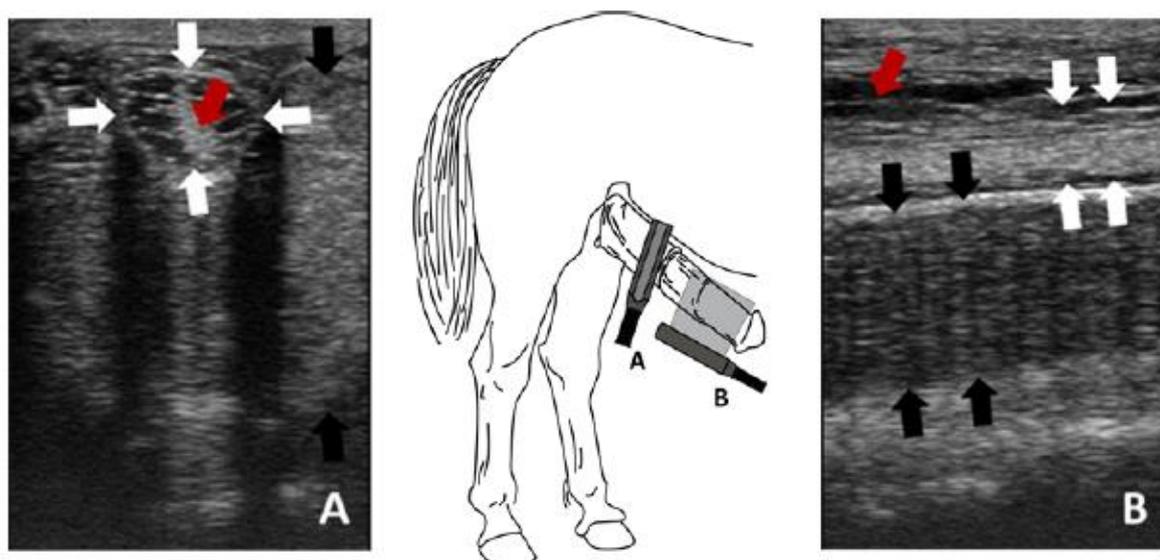


Figura 10 - O esquema demonstra o posicionamento do transdutor linear colocado no pênis para obtenção dos cortes transversal em A e longitudinal em B. Nas imagens ultrassonográficas é possível visualizar corpo cavernoso (setas pretas), corpo esponjoso (setas brancas) e uretra peniana (setas vermelhas). Fonte: Monteiro (2017).

2.5.4 Arterias pélvicas e abdominais em garanhões

A artéria cremaster origina-se da artéria ilíaca externa nos garanhões e atravessa pela parede abdominal para perto do anel inguinal, suprindo o músculo cremaster. A artéria pudenda é o maior ramo da artéria ilíaca interna e segue o mesmo curso na cavidade pélvica em garanhões como a artéria ilíaca interna segue nos touros. A artéria umbilical supre a genitália, surgindo da artéria pudenda nos garanhões, sendo a primeira fonte de suprimento para o ducto deferente. A porção proximal do ducto deferente é suprida pelo ramo da artéria prostática (GINTHER, 2007).

As glândulas acessórias adjacentes à uretra, a uretra propriamente dita e o pênis são irrigados pela artéria pudenda interna. Para todos os segmentos dos órgãos sexuais que se

encontram na cavidade pélvica, a irrigação é feita pela artéria prostática. A artéria prostática origina da artéria pudenda interna nos gananhões e da artéria ilíaca à medida que termina na próstata. Os ramos da artéria prostática é que suprem as glândulas acessórias. Além disso, também há os ramos dos ductos deferentes. A artéria pudenda interna também fornece o principal suporte arterial para o pênis. Ao nível do arco isquiático, a artéria pudenda interna emite: a artéria do bulbo do pênis (para o bulbo do pênis), a artéria profunda do pênis (para o corpo cavernoso do pênis), e a artéria dorsal do pênis que chega até a glândula, irrigando-a. Para a extremidade livre do pênis, ainda contribuem os ramos da artéria pudenda externa, que estabelecem anastomoses com artéria dorsal do pênis, irrigando também o prepúcio. Nos gananhões, a demanda de sangue do pênis durante a ereção é considerável e há o requerimento de uma vasculatura adicional que é satisfeita pela anastomose da artéria dorsal do pênis com a artéria obturadora, que origina da ilíaca interna e passa através do forame obturador (KÖNIG e LIEBICH, 2004; GINTHER, 2007).

Um esquema dos ramos arteriais pélvicos e abdominais de gananhão é demonstrado na **Figura 11**.

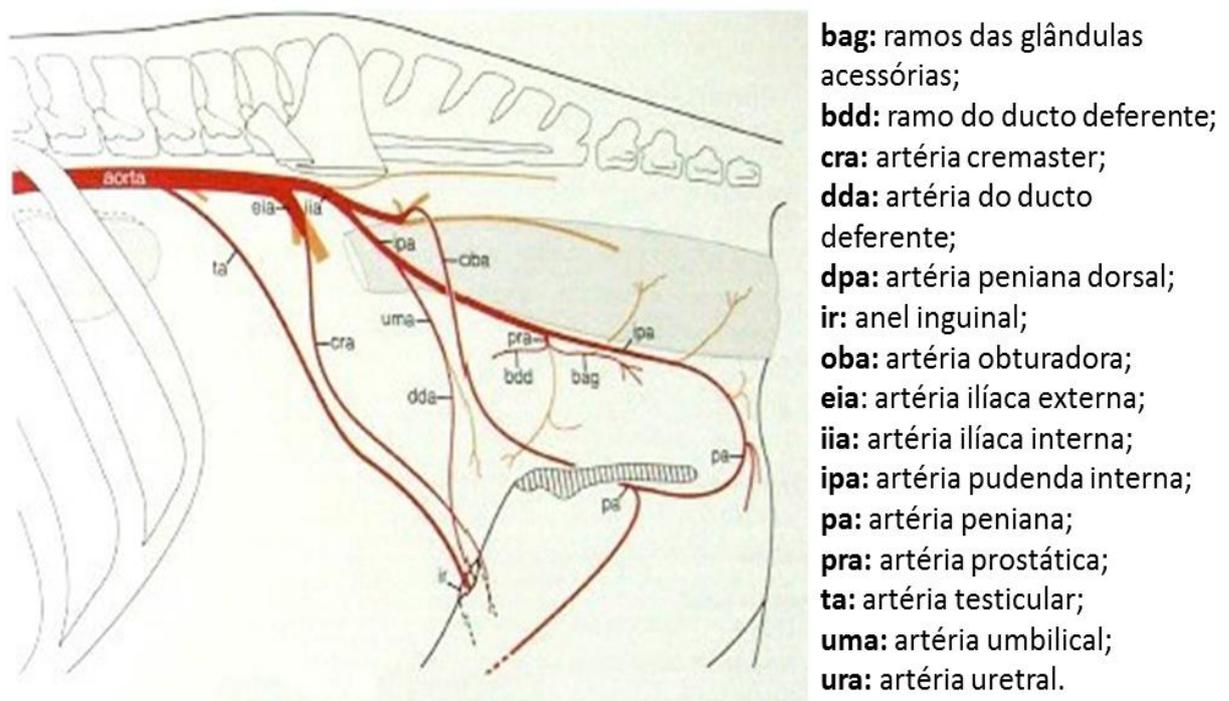


Figura 11 - Diagrama dos ramos arteriais pélvicos e abdominais de gananhão. Fonte: Adaptado de Ginther (2007).

A artéria testicular de garanhões é homologa a artéria ovariana em éguas e origina-se diretamente da aorta abdominal, em sintonia com a veia testicular, ao longo da parede abdominal para o anel inguinal sendo inserida no mesórquio proximal se tornando parte do cordão espermático. No funículo espermático, a artéria testicular se apresenta com uma disposição flexuosa. Essa artéria é envolvida por finas ramificações das veias testiculares. O plexo venoso, também chamado de plexo pampiniforme, serve para refrigerar o sangue arterial para o testículo. A artéria testicular supre, além disso, o epidídimo, bem como a parte inicial do ducto deferente (**Figura 12**) (KÖNIG e LIEBICH, 2004; GINTHER, 2007).

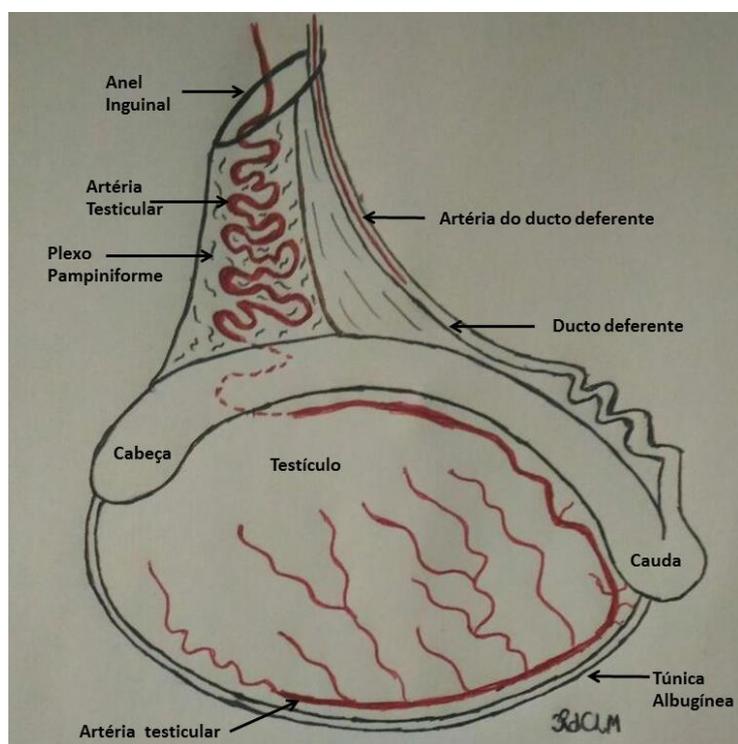


Figura 12 - Diagrama da artéria testicular e seus ramos no cordão espermático e testículos de garanhões. Fonte: Autor, com imagem adaptada de Ginther (2007).

2.6 Comportamento Sexual

O comportamento sexual é influenciado por fatores internos (genética e experiência) e externos (ambiente) que podem afetar a intensidade e frequência desse comportamento (SIGNORET e BALTHAZART, 1993). Para tal avaliação observa-se a libido do garanhão baseando nos parâmetros de manifestação da espécie no pré-coito, coito e pós-coito como

resposta de Flehmen durante a coleta, número de montas sem ereções, tempo de reação a ereção, tempo de monta e observações de cortejo e atitudes gerais (McDONNELL, 1992).

Observações de coberturas de equídeos em liberdade indicam que a fêmea desempenha um importante papel na localização, na estimulação do macho e na efetiva regulação da cobertura que na monta dirigida é, tipicamente, assumida ou controlada pelo garanhão (McDONNELL, 2000).

O comportamento pré-copulatório do garanhão inclui: cheirar, lambe, morder a cabeça, regiões escapulares e axilares, ventre, flanco e áreas inguinais e perineais, nesta ordem. O contato com urina, fezes ou fluídos vaginais são, geralmente, seguidos do reflexo de Flehmen. Montas sem ereção são um elemento normal do cortejo sexual (McDONNELL, 1992).

Nas coberturas de animais a campo, grande parte das cópulas são precedidas por uma ou mais montas sem ereção. Isto acontece com garanhões experientes ou principiantes, numa relação de 2:1, considerando-se um elemento natural da sequência interativa pré-copulatória, assim como a vocalização. Este procedimento parece ser um teste ou um condutor para a postura de cio da égua (HENRY et al., 1991).

Nas montas dirigidas, no entanto, não se permite que o garanhão monte sobre a fêmea sem uma ereção. Em garanhões principiantes lentos, as montas sem ereção podem acelerar o processo de cobertura. É comum o condutor forçar imediatamente a desmonta de forma rude e com disciplina verbal e física. O ato de desmontar é uma prática única atribuída ao controlador e que não ocorre nas coberturas livres. Esta intolerância se baseia em razões de segurança, principalmente em locais fechados para cobertura, além do fato de sucessivas montas aumentarem o risco de injúrias (McDONNELL, 2000).

Normalmente o garanhão consegue a monta quando empina, mas pode ser acompanhada por monta lateral com um subsequente ajuste para a posição empinada. Este último procedimento é mais comum em garanhões jovens ou inexperientes. Após a monta, o macho abraça as tuberosidades ilíacas com seus membros anteriores e com a cabeça mantém a égua segurando ou mordendo a crina (McDONNELL, 1992).

Nas montas com ereção, o pênis é exposto e, gradualmente se torna rígido. Normalmente este tipo de monta leva à inserção e ejaculação. A inserção ocorre após um ou mais atos de procura e a ejaculação é obtida após cinco ou oito arremetidas intravaginais profundas. Indícios da ejaculação incluem: contrações rítmicas dos músculos dos membros posteriores, aumento da

taxa respiratória, abaixamento da cabeça contra a crina da égua e o característico balançar rítmico da cauda (McDONNELL, 1992; McDONNELL, 2000).

Ao finalizar a ejaculação o garanhão exibe um relaxamento dos músculos faciais e abaixamento das orelhas. A desmonta ocorre dentro de 3 a 15 segundos, sendo facilitada com a égua dando passos para frente. Repostas pós-copulatórias incluem: cheirar o ejaculado ou secreções urovaginais da égua, seguido reflexo de flehmen ou mesmo urinar ou defecar sobre elas. A interação copulatória frequentemente dura menos de um minuto. O período refratário, ou seja, quando perde o interesse pela fêmea, pode durar pouco tempo (McDONNELL, 1992).

No entanto, para alguns reprodutores domesticados submetidos à cobertura dirigida, normalmente não é permitido que se tenha algum tipo de contato com as fêmeas, além de uma breve conduzida interação pré-copulatória. Alguns garanhões que realizam a cobertura com sucesso geralmente não tocam as fêmeas, nem tem contato com a urina, fezes ou secreções urovaginais, seja na cobertura natural ou para a coleta de sêmen. Isto ocorre provavelmente devido à capacidade dos garanhões responderem a estímulos subótimos, naturalmente ou como resultado de um condicionamento (McDONNELL, 2000).

As respostas comportamentais de um garanhão doméstico normal submetido à cobertura dirigida demonstradas por McDonnell (1992) estão descritas no **Quadro 2**. Esta tabela inclui animais com várias raças e idades, evidenciando algum tipo de interação pré-copulatória, ereção em 2 minutos e monta dentro de 10 a 15 segundos após a ereção. Cerca de 70% ejaculam com uma monta e 90% com uma ou duas montas; a maioria realiza a cobertura num tempo total de 2 a 5 minutos. Aproximadamente dois terços ejaculam após cinco ou oito arremetidas intravaginais profundas.

Quadro 2 - Comportamento pré e copulatório normal de garanhões domésticos submetidos à cópula dirigida. Fonte: quadro adaptado de McDonnell, 1992.

	Valor médio *	Mínimo – máximo
Resposta pré copulatória		
Cheirar ou mordiscar (freq.)	3	0-80
Lamber (freq.)	0	0-20
Flehmen (freq.)	2	0-10
Mordida (freq.)	0	0.25
Coicear/golpear (freq.)	0	0-10
Vocalização (freq.)	3	0-35
Tempo para ereção (s)	10	0-500
Tempo 1ª monta sem ereção(s)	15	10-540
Resposta copulatória		
Nº de montas	1	1-3
Tempo de monta e inserção (s)	2	1-5
Inserção antes da ejaculação(s)	15	8-20
Nº de arremetidas	7	2-12
Tempo total de monta (s)	20	15-45
Tempo total na area de cobertura (s)	2	0.5-10

*Dados incluídos de garanhões principiantes e experientes submetidos à cobertura dirigida e/ou coleta de sêmen.

2.6.1 Fatores que afetam o comportamento sexual dos garanhões

O comportamento social e sexual dos cavalos domesticados que vivem estabulados, difere substancialmente dos mantidos em liberdade com as éguas. Interações com outros animais, experiências sociais e reprodutivas são bastante restritas e, provavelmente, afetam o seu desempenho sexual e reprodutivo (McDONNELL, 2000).

Entre as populações equinas domesticadas, onde os garanhões permanecem confinados e a interação entre eles se torna frequente e intensa, o estresse social resultante do relacionamento de um animal com seu rival pode influenciar o seu desempenho reprodutivo (WARAN, 1997).

Além dos problemas associados com o estresse social, o comportamento reprodutivo dos cavalos domesticados pode ser influenciado por fatores de manejo, por exemplo: os garanhões tendem a ficar individualmente estabulados desde cedo com pouca ou nenhuma oportunidade de aprendizado sobre as interações normais e técnicas de cortejo. A detecção do estro das éguas nas populações domesticadas pode ser problemática, requerendo a presença do garanhão ou, pelo menos, algum estímulo tátil ou auditivo e, na ausência do macho, estes sinais de comportamento são pouco demonstrados. Sob condições controladas, há pouca possibilidade de cortejo normal e a interação pré-copulatória é inibida por motivos de segurança para o garanhão e para as pessoas envolvidas nas coberturas ou coletas de sêmen (WARAN, 1997).

Nas montas dirigidas, as éguas que estão no estágio ambivalente de início de estro ou que, por engano, se apresentam em diestro, representam uma ameaça ao garanhão e para as pessoas que participam destas coletas de sêmen. Reprodutores experientes com vigorosa libido, respondem adequadamente a éguas imobilizadas, assim como a manequins. Entretanto, quando se trata de machos principiantes ou de garanhões com pouca libido, é preferível expô-los ao estímulo dado pelas atividades das éguas, naturalmente (NOUE et al., 2001).

Simples mudanças de manejo como permitir maior mobilidade da égua e menos alteração da sua postura normal de cio poderão melhorar a resposta sexual e a eficiência comportamental dos garanhões. A contenção da égua inibe os movimentos para frente durante as arremetidas do macho, podendo causar desconforto e intolerância (McDONNELL, 1992).

Uma interação sexual anormal pode levar a certos problemas de comportamento, tais como baixo interesse sexual entre os jovens garanhões, devido possivelmente, à falta de

experiência social com outros da sua espécie, e excessiva agressão em relação às éguas e aos tratadores (McDONNELL, 2000).

Estudos indicam que, em populações selvagens, os garanhões têm a capacidade de reconhecer e de se comportar diferentemente, de acordo com a categoria social da égua. Éguas maduras pertencentes ao harém são cuidadas e ativamente cortejadas e cobertas pelo macho. Eventualmente, o garanhão pode demonstrar interesse pelas fêmeas adultas de haréns próximos. No entanto, as jovens nascidas no mesmo grupo são similarmente vigiadas de perto, exceto quando estão em estro. Neste período, ele permite que elas vaguem pelo harém vizinho ou por grupos de machos solteiros, não sendo protegidas, cortejadas ou cobertas pelo garanhão (McDONNELL, 2000).

Entre animais submetidos à monta dirigida, há ocasiões em que o garanhão pode não aceitar ou não ter uma boa performance com uma ou mais éguas em particular. Talvez, nestes casos, mecanismos naturais para aceitação de certas éguas e rejeição de outras possam estar em jogo, em função da sua categoria social. Por outro lado, algumas éguas parecem ter preferências sexuais e, portanto, podem rejeitar determinados garanhões (PICKEREL et al., 1993).

Outro fator importante, além do sistema de cobertura, que faz parte do manejo reprodutivo destes animais e pode afetar o comportamento sexual, é o estabelecimento de uma estação de monta definida, para certas raças. Levando em consideração o ano hípico, as coberturas são, geralmente, realizadas no final do inverno e no início da primavera. Desta forma, os reprodutores são submetidos aos sistemas de cobertura ou a coletas de sêmen fora da estação reprodutiva fisiológica (FREITAS, 2005).

2.6.2 Controle hormonal do comportamento sexual

A relação entre as secreções endócrinas e a atividade sexual parece ser totalmente diferente entre machos e fêmeas. Na maioria dos casos, a atividade sexual da fêmea é restrita a um período limitado, em condições endócrinas específicas. Por outro lado, o comportamento sexual do macho não sofre variações dramáticas de curta duração em função das mudanças circulantes dos hormônios sexuais. Em curtos períodos, durante 24 horas, a testosterona é secretada em forma de pulsos e a rápida alteração dos níveis circulantes não está relacionada com o comportamento sexual (SIGNORET e BALTHAZART, 1993).

Nas espécies estacionais, o nível do comportamento sexual varia lenta e progressivamente, em paralelo com a evolução dos andrógenos plasmáticos. Turner e

Kirkpatrick (1982) relatam um modelo estacional nos níveis de testosterona de garanhões, sendo que o pico ($3,04 \pm 0.63$ ng/mL) ocorreu nos meses da estação de monta natural, onde a média foi $> 2,4$ ng/mL e níveis basais ($1,55 \pm 0.34$ ng/mL), naqueles fora desta; a frequência das atitudes comportamentais, tais como resposta à eliminação de urina e fezes da égua (eliminação/marca), monta e cópula também seguiram este modelo.

Khalil et al. (1998), utilizando amostras de 23 garanhões selvagens Misaki, jovens e sexualmente maduros, encontraram variações estacionais nos níveis de testosterona. Estas foram significativamente mais altas durante a estação reprodutiva do que fora desta, em garanhões com idades acima dos três anos. Os garanhões com um e dois anos de idade tiveram seus níveis de testosterona mais baixos e similares nas duas estações.

Em garanhões, o 17- β -estradiol pode ter um importante papel na expressão do comportamento sexual. Mudanças estacionais nas concentrações sanguíneas periféricas de estradiol foram mais sincronizadas com as variações do comportamento sexual do que as variações das concentrações de testosterona (THOMPSON et al., 1977).

McDonnell (1995) sugere grandes variações nas concentrações de testosterona e no comportamento sexual, geralmente atribuídas ao ambiente social em que os animais são criados. Concentrações de testosterona, comportamento sexual e agressividade aumentam claramente com o nível de atividade sexual e com a exposição às éguas; aumentos médios das concentrações plasmáticas de testosterona de 529% foram observados nas primeiras duas semanas de exposição constante às éguas em garanhões com libido inadequada, associada a níveis de testosterona baixos. A autora alerta que estudos da endocrinologia do garanhão não têm, sistematicamente, levado em consideração os fatores sócio-sexuais, assim como outros moduladores que possam estar envolvidos e que são fontes de variação dos níveis dos hormônios reprodutivos.

No garanhão, a cópula culmina com dois eventos fisiologicamente distintos, conhecidos por emissão e ejaculação. O primeiro corresponde à liberação dos espermatozóides e fluidos das glândulas acessórias na uretra pélvica; o segundo é a expulsão do ejaculado a partir da uretra. As arremetidas intravaginais realizadas durante a cópula precedem e levam ao reflexo de emissão, que consiste na contração dos músculos lisos das paredes das caudas dos epidídimos, ductos deferentes, ampolas, vesículas seminais, próstata e, possivelmente, glândulas bulbo uretrais, resultando na liberação de fluidos e espermatozóides na uretra. A

ejaculação é consequência das contrações rítmicas dos músculos ísquio cavernoso, bulbo esponjoso, *uretralis* e outros músculos pélvicos estriados (McDONNELL, 1992).

Um determinado comportamento é resultado de uma série de contrações musculares em resposta específica à estimulação neural. Hormônios esteróides têm a capacidade de modificar o controle central destes músculos. Músculos periféricos, envolvidos na ereção, intromissão e ejaculação são inervados por motoneurônios e estes, assim como o desenvolvimento muscular, são controlados por andrógenos (testosterona e / ou dihidrotestosterona), influenciando indiretamente o comportamento copulatório. (SIGNORET e BALTHAZART, 1993).

No cérebro, a testosterona é transformada em 5α -dihidrotestosterona e em estradiol. Dependendo da espécie, os dois metabólitos, sozinhos ou em sinergia, executam a maioria dos efeitos produzidos pela testosterona. O comportamento copulatório pode ser ativado pela 5α -dihidrotestosterona, sozinha, em coelhos ou porcos-da-índia, e pelo estradiol, em ratos. Nestes, quando a atividade da aromatase (transformação de testosterona em estradiol) é suprimida por um inibidor específico, a ativação do comportamento sexual masculino é bloqueada (BALTHAZART, 1989).

Aromatização e redução da testosterona no cérebro são etapas críticas em relação aos efeitos desta no comportamento sexual. O estrógeno pode ser metabolizado em produtos hidrolisados chamados de catecolestrógenos. Estes componentes podem interferir na biossíntese e no catabolismo das catecolaminas. Eles devem contribuir com a ação do estrógeno no SNC. Como não se tem um inibidor altamente específico para a sua síntese e ação, torna-se difícil estabelecer, experimentalmente, seu papel e importância (SIGNORET e BALTHAZART, 1993).

2.7 Avaliação Andrológica

O exame andrológico consiste numa maneira indireta de se estimar a fertilidade potencial de um garanhão. As causas de infertilidade do macho podem ser devida à sua incapacidade copuladora, agentes patógenos ou a problemas no sêmen (HAMMES et al., 1996). Com relação ao exame de sêmen, o que se objetiva é apreciar indiretamente a produção qualitativa e quantitativa de gametas (AMANN, 1991), bem como suas condições de armazenamento e transporte no trato genital masculino (KENNEY et al., 1983).

Nas avaliações de rotina de sêmen a fresco observa-se: a motilidade e o vigor espermático, a morfologia, a integridade de membrana, o número de espermatozóides por

ejaculado, o volume, a cor (de branco acizentado ao branco leitoso), o aspecto (aquoso à leitoso) e o odor (*susi-generis*) do ejaculado (CBRA,2013).

De acordo com CBRA (2013), as características desejáveis para o sêmen equino fresco apresentam volume médio de 40 a 60 mL, vigor espermático ≥ 3 , ausência de movimento de massa, motilidade média de $\geq 60\%$ e concentração espermática de 100 a 200 $\times 10^6$ spz/mL. Entretanto, estas características apresentam grande variação entre as raças e entre indivíduos dentro da mesma raça, o que torna as avaliações das características seminais de extrema importância para uma correta seleção de um garanhão como reprodutor (McKINNON e VOSS, 1993).

A avaliação da motilidade espermática é um dos principais recursos para avaliar os efeitos da criopreservação dos espermatozóides, sendo utilizada em diversos estudos para a obtenção de comparações entre diluentes, métodos de resfriamento, congelamento e diluições utilizadas. Sua observação é considerada um elemento importante na avaliação da função espermática (PICKETT e AMANN, 1993). A motilidade é um componente indispensável no mecanismo da fertilização, e sua perda irreversível resulta na perda da função celular. Por outro lado, sua manutenção não implica integridade celular completa (VARNER et al.,1988) e não tem correlação absoluta com a fertilidade (KELLER, 1998).

Para se avaliar a motilidade espermática uma gota de sêmen é colocada entre uma lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C visualizada em microscópio óptico em objetiva com aumento de 10x até 40x. Segundo CBRA (2013), garanhões com motilidade inferior a 60% no sêmen fresco e 30% no congelado, não devem ser utilizados para reprodução. Para melhorar a avaliação, muitos pesquisadores têm utilizado diluentes de sêmen, com taxas de diluição de 1:2 ou mais. Os diluentes de sêmen previnem a aglutinação e reduzem a influência da concentração espermática e do pH seminal sobre a avaliação subjetiva da motilidade (LAGARES et al., 2000).

O objetivo de se avaliar a motilidade espermática é determinar a porcentagem de espermatozóides que estão vivos dentro de um ejaculado. A motilidade total é definida como a porcentagem de espermatozóides que apresentam movimento circular, pendular, progressivo ou em serpentina (KENNEY et al, 1983).

O vigor é avaliado em uma escala de zero a cinco (ausência de vigor e vigor máximo, respectivamente) e representa a força com que os espermatozóides se movimentam, ou seja,

refere-se à velocidade de deslocamento do espermatozóide no campo da lâmina. Normalmente o vigor é avaliado em conjunto com a motilidade (CBRA, 2013).

A concentração espermática representa o número de células por mL de sêmen. Sua determinação é realizada por método hemocitométrico da contagem de espermatozoides em câmara de Neubauer (FERNANDES e PIMENTEL, 2002). No garanhão adulto, a concentração espermática varia em média de 100 a 200 milhões de espermatozoides /ml de sêmen (CBRA, 2013). A avaliação da concentração é de grande importância durante o processo de congelamento de sêmen e inseminação artificial; quanto maior a concentração maior será o número de éguas inseminadas por ejaculado e maior será o número de palhetas que poderão ser congeladas por cada ejaculado (PAPA e DELL´AQUA JÚNIOR, 2001).

Recomenda-se a dose inseminante de 500 a 600 milhões de espermatozoides para inseminação com sêmen fresco e 800 milhões a 1 bilhão de espermatozoides no caso de sêmen congelado (PAPA e DELL´AQUA JÚNIOR, 2001).

Além dos métodos de avaliações espermáticas manuais já descritos, dentre outros, segundo Verstegen et al. (2002), existem inúmeros sistemas computadorizados que foram desenvolvidos nos últimos anos para determinação, de maneira mais precisa e mais padronizada, das características espermáticas que avaliadas subjetivamente por meio de microscopia comum, tais como velocidade, motilidade progressiva e linearidade. Dentre estes sistemas, o Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) se tornou um dos mais utilizados para análise de sêmen das mais variadas espécies animais (mamíferos, aves, répteis e peixes).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Período de Execução

A presente pesquisa foi aprovada junto Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ), protocolado sob o CEUA nº 9336110316.

O experimento foi conduzido no Setor de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, do Instituto de Zootecnia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), situada no município de Seropédica - RJ, latitude: 22°44'38", longitude: 43°42'27", em etapas que abrangeram as quatro estações climatológicas do ano. Estas etapas foram executadas nos meses de janeiro, abril, julho e outubro de 2016.

3.2 Animais e Manejo

Foram utilizados quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador, em idade reprodutiva (5-10 anos) e com fertilidade comprovada, que permaneceram alojados, durante o experimento, no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal da UFRRJ.

Os animais foram alocados em baias, recebendo volumoso a uma taxa de consumo de 2% do peso vivo e 4 kg /dia de ração balanceada, com acesso livre a água e sal mineral. O manejo sanitário durante o experimento constituiu de controle para endo e ectoparasitos.

3.3 Exame Clínico

Previamente ao início de cada etapa foi realizado o exame clínico de cada animal, constando do histórico reprodutivo, averiguação da libido frente a uma fêmea e avaliação do sistema genital. Na genitália externa, foram examinadas visualmente e por palpação, as seguintes estruturas: prepúcio, pênis, epidídimo e testículos, sendo este último avaliado quanto à simetria, forma, posição, consistência, sensibilidade e mobilidade.

3.4 Delineamento Experimental

No início de cada etapa, foi realizada a esgota do sêmen dos garanhões. Essa esgota constituiu-se de uma coleta de sêmen diária por três dias consecutivos, com auxílio de vagina artificial do modelo Hannover, preenchida com água na temperatura próxima de 44°C e égua em estro devidamente contida como manequim. Após a esgota os animais foram submetidos a um descanso reprodutivo de três dias.

Os animais foram divididos em dois grupos: GI (n=4), administrando 5ml de solução salina e GII (n=4), administrando 5000 UI de hCG (5ml) (Chorulon®), ambos *i.v. in bollus*. Em cada mês os procedimentos foram subdivididos em dois ciclos (CI e CII) com seis dias (D) cada e com um intervalo de três dias entre os ciclos. Nos dias ímpares avaliou-se dois cavalos, um de cada grupo e nos dias pares os outros dois de cada grupo. Para o C2, seguiu-se o esquema experimental rotacional “cross over”, onde: CI = animal 1 (GI) e 2 (GII) avaliados nos dias D1, D3 e D5 e animal 3 (GI) e 4(GII) em D2, D4 e D6; em CII= animal 1(GII) e 2 (GI) avaliados nos dias D1, D3, D5 e animal 3 (GII) e 4 (GI) em D2, D4 e D6. O tratamento foi realizado apenas no primeiro dia de cada ciclo (D1 e D2). Um resumo das atividades diárias de cada ciclo está demonstrado por uma linha do tempo na **Figura 13**.

Seguidamente aos tratamentos e com os animais contidos em um brete e tranquilizados com Cloridrato de Xilazina 2%, na dose de 0,00028 mg/kg (0,014 ml/kg, *i.v.*), foi realizado o exame ultrassonográfico, aferindo a vascularização da artéria testicular do cordão espermático e dos testículos uma hora antes de cada coleta de sêmen e imediatamente após.

Antes de se realizar a coleta de sêmen e imediatamente após o primeiro exame ultrassonográfico, o animal era colocado em um piquete, sem possibilidade de visualizar éguas, permanecendo ali por uma hora pós tranquilização. Durante esse tempo, uma égua em estro era contida com a utilização de uma peia, para realização da coleta de sêmen, que ocorreu sempre no mesmo local. Essas coletas foram filmadas para análises comportamentais posteriores. Terminada a coleta, o sêmen era encaminhado ao laboratório para realização das avaliações seminais (volume total e filtrado, motilidade, vigor e concentração) e o garanhão era reencaminhado ao brete de contenção para uma nova tranquilização e exame ultrassonográfico.

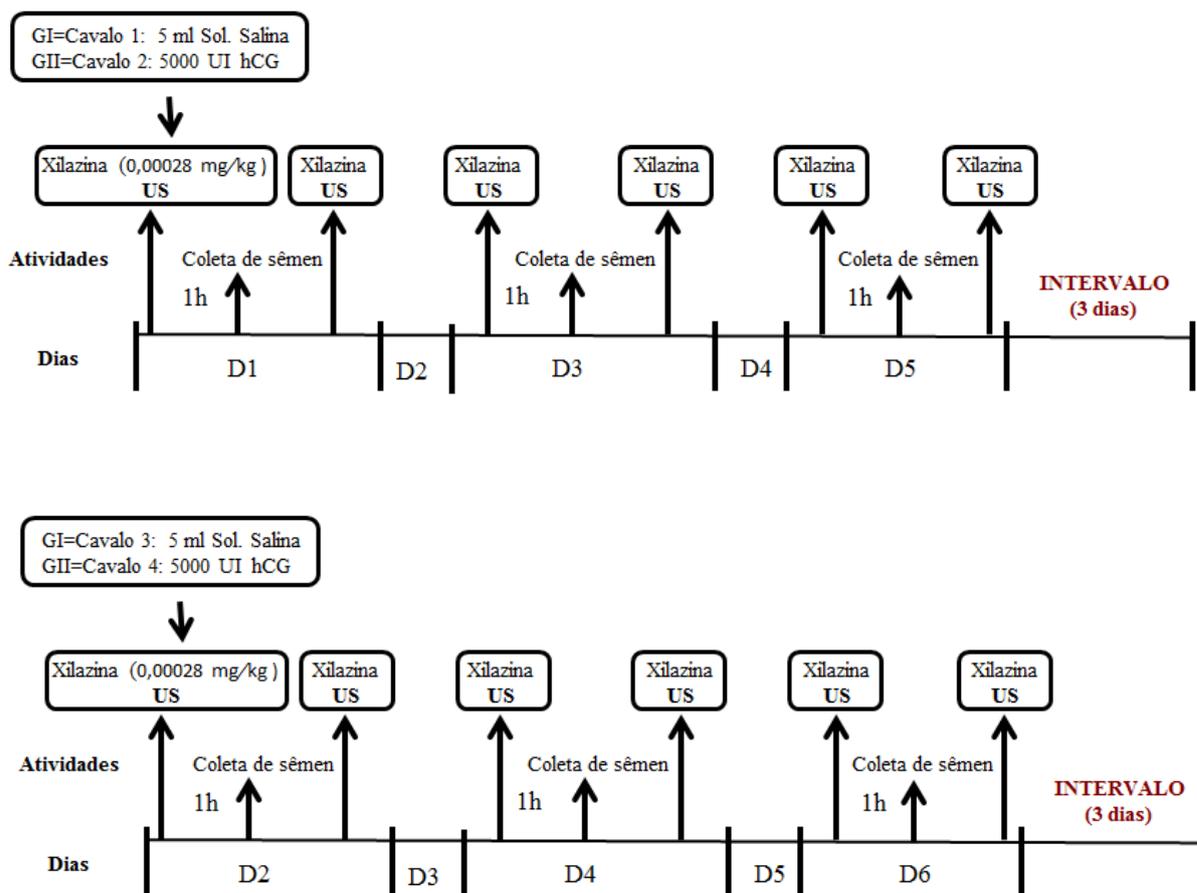


Figura 13 - Esquema das atividades diárias de cada ciclo em cada mês do experimento.
*US: ultrassonografia; i.v.: intravenoso; UI: unidade internacional; h: hora.

Nos dias intercalados em que a dupla de garanhões não passava por procedimentos experimentais, esses animais eram soltos em piquetes providos de cocho com fonte de água durante o período da manhã e, no período tarde-noite, retornavam às respectivas baias.

3.5 Exame Ultrassonográfico da Genitália Externa

O exame ultrassonográfico em tempo real foi realizado utilizando-se equipamento de ultrassom (US) Doppler Mindray, modelo Z5VET, equipado com transdutor linear 75L50EAV e emissão de onda de 5,0/7,5 MHz (5,0 MHz para imagens em modo B com sobreposição do color Doppler e 7,5MHz para imagens em modo B único, como é configurado pelo aparelho). Foram realizadas palpação e identificação das estruturas genitais externas e o exame ultrassonográfico foi executado em ambos cordões espermáticos e testículos dos garanhões.

Para realizar o exame testicular, levantava-se o testículo contralateralmente na intenção de evitar a sobreposição de imagens. Com auxílio do aparelho de US no modo B foi escaneado o parênquima testicular em três cortes, com o transdutor posicionado da seguinte forma em relação à cada testículo: vertical-cranial, vertical-caudal e horizontal-medial. Esquemas de posicionamentos do transdutor/testículo são demonstrados nas **figuras 14 e 15**.

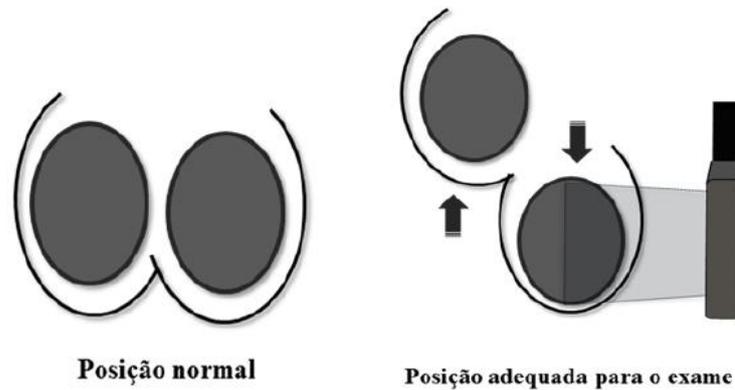


Figura 14 - Esquema de posicionamento normal dos testículos (esquerda), e posicionamento adequado dos testículos (direita) para o exame ultrassonográfico, deslocando dorsalmente o testículo contralateral ao que está sendo examinado. Fonte: cortesia de Gabriel Augusto Monteiro.

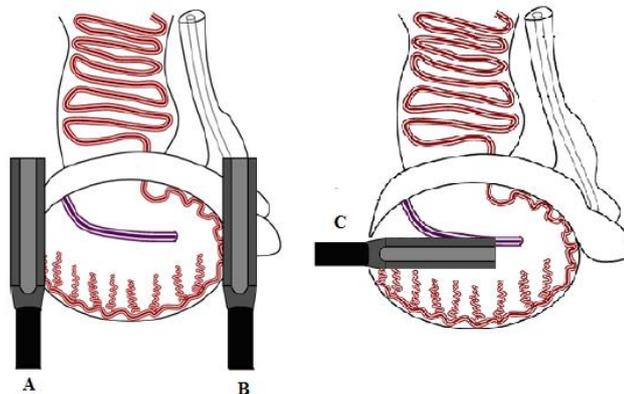


Figura 15 - Exame ultrassonográfico dos testículos. Posicionamento transdutor/testículo: A) corte vertical-cranial; B) corte vertical-caudal; C) corte horizontal-lateral. Fonte: Imagem adaptada de MONTEIRO (2017).

Com o transdutor posicionado, após a identificação das estruturas em modo B, a modalidade color Doppler foi ativada para apresentar a extensão e a direção do fluxo sanguíneo nos vasos do parênquima testicular indicados por sinais de cor (vermelho ou azul). Todas as varreduras com color Doppler foram realizadas com configurações de ganho, definição de filtro

e de faixa de velocidade constantes. A perfusão vascular foi estimada subjetivamente através da pontuação da extensão dos sinais coloridos para o fluxo sanguíneo em tempo real em um intervalo contínuo de 1 minuto (**Quadro 3 e Figura 16**). Os vídeos foram gravados e, posteriormente, avaliados por um único avaliador. Para cada varredura de color Doppler contínuo de 1 minuto foram selecionadas três imagens fixas, no momento de maior brilho caracterizando o momento de maior pulsação, que foram utilizadas para a determinação dos pontos finais relacionados à porcentagem de coloração da imagem (0-100%). As médias de porcentagem de coloração das imagens de cada corte (cranial, caudal e medial) foram utilizadas nas análises caracterizando o parênquima testicular como um todo.

Quadro 3 - Proporções de visualização da vascularização (modo subjetivo) do parênquima testicular via ultrassonografia no modo Doppler colorido.

Porcentagem de coloração	Visualização
0%	Vascularização não aparente
1% - 25%	Vascularização baixa
25% - 50%	Vascularização intermediária
50% - 75%	Vascularização alta
75% - 100%	Vascularização muito alta

Fonte: Adaptado de **Batissaco et al. (2013) apud Silva et al. (2005)**.

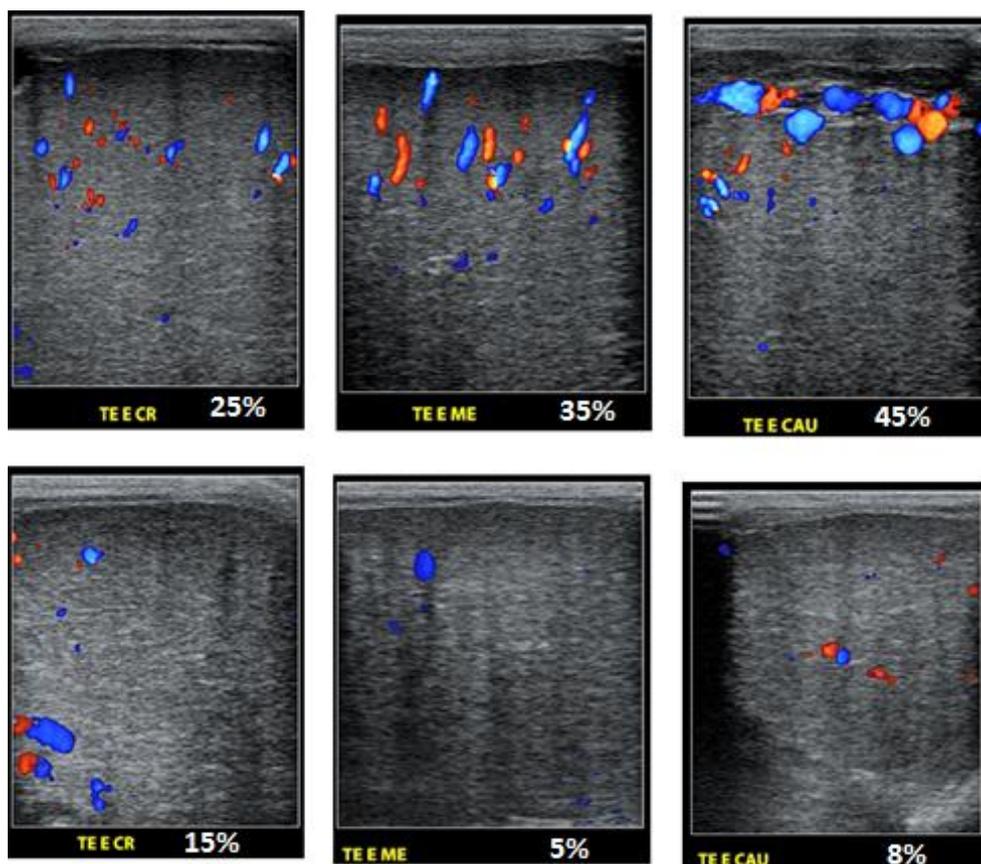


Figura 16 - Método subjetivo de pontuação (%) da extensão dos sinais coloridos para o fluxo sanguíneo em testículo de garanhão. Fonte: autor.

*TE E: testículo esquerdo; CR: corte ultrassonográfico cranial; ME: corte ultrassonográfico medial; CAU: corte ultrassonográfico caudal.

Além da avaliação em US color Doppler do parênquima testicular, foram realizados escaneamentos em US Doppler Espectral da artéria testicular no cordão espermático. O cordão espermático foi visualizado primeiramente em US no modo B, através do transdutor na posição horizontal, bem próximo ao testículo, como demonstrado na **Figura 17**. Após a identificação da estrutura, o modo color Doppler foi ativado para confirmar o posicionamento dos vasos sanguíneos a partir da coloração demonstrada, em seguida foi escolhido um corte da artéria testicular e o modo Doppler espectral foi ativado.

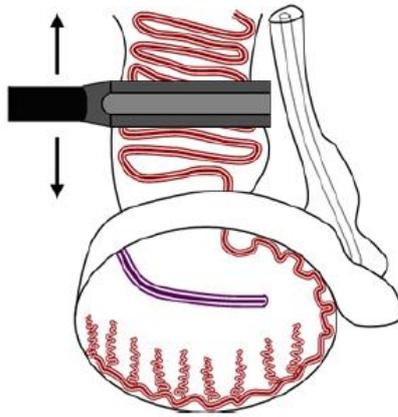


Figura 17 - Posicionamento horizontal do transdutor para exame ultrassonográfico do cordão espermático. Fonte: Imagem adaptada MONTEIRO (2017).

Seguidamente a ativação do modo Doppler espectral, foi colocado o cursor espectral sobre o ramo da artéria testicular ao nível do cordão espermático. Para os exames espectrais, a configuração das faixas de velocidade e o tamanho do portão espectral (gate), foram ajustados durante cada exame para obter uma sequência de gráficos Doppler espectral com ciclos cardíacos sistólicos e diastólicos simétricos e distintos sem *aliasing*.

Aliasing é um tipo de artefato Doppler gerado quando a velocidade do fluxo sanguíneo é maior que a velocidade do feixe de ultrassom (GINTHER, 2007). As configurações de ganho, filtros e frequência de repetição de pulso (PRF =1) foram uniformes para todos os exames espectrais. Por conta da tortuosidade dos vasos da artéria testicular no cordão espermático, como nas artérias mesometrais, ovarianas e uterinas de éguas, foi utilizado, como prevenção, um ângulo de insonação Doppler de correção de 60° dentro do cursor do portão espectral. Entretanto, como utilizado no trato reprodutivo de éguas, os índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI) não sofrem influência dessa angulação, eles sendo indicados para tais avaliações espectrais (SILVA et al., 2005; FERREIRA et al., 2010)

O espectro Doppler (gráfico) obtido foi registrado em vídeo e analisado posteriormente segundo Silva et al. (2005). Foram utilizados três pulsos do ciclo cardíaco, sendo escolhido o central como representativo real da velocidade do fluxo sanguíneo expressado pelo índice de RI, calculado automaticamente usando funções predefinidas do aparelho (**Figura 18**). Neste experimento, optou-se pela utilização do RI por ser um valor de pouca variação (0-1) e ser o índice mais sensível e comum utilizado na detecção de distúrbios do fluxo sanguíneo testiculares em humanos (BIIAGIOTTI et al., 2002; GINTHER, 2007; ORTEGA-FERRUZOLA et al., 2014).

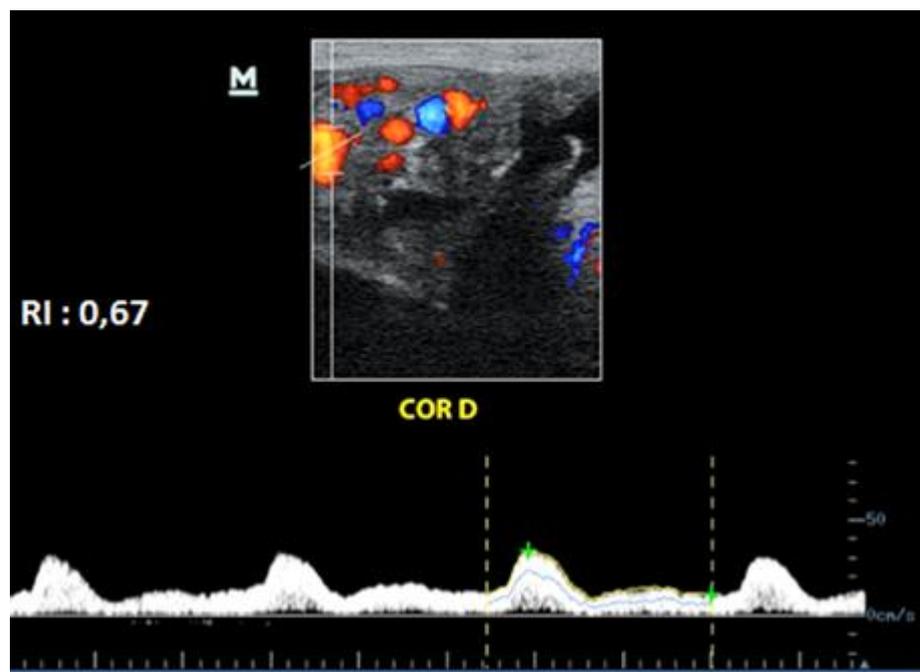


Figura 18 - Cursor sobre ramo da artéria testicular do cordão espermático direito e obtenção do espectro Doppler para medição da velocidade do fluxo sanguíneo e dos índices PI e RI Fonte: autor.

3.6 Avaliação do Comportamento Sexual

Durante o período experimental, finalizado o primeiro exame ultrassonográfico, o garanhão era encaminhado à um piquete sem acesso visual à éguas, permanecendo lá por um período de uma hora, a partir da administração do cloridrato de xilazina, que foi administrado para tranquilização durante a US. Concluído o tempo de espera no piquete o garanhão foi conduzido, em livre arbítrio comportamental, até a égua contida para coleta de sêmen. O comportamento foi filmado desde a saída do garanhão do galpão, durante a coleta de sêmen, até o animal desmontar da égua após a coleta e suas manifestações comportamentais foram avaliadas posteriormente através de vídeos gravados.

A identificação do comportamento e das interações entre garanhão e égua, e de ambos em relação ao meio-ambiente, seguiram o etograma proposto por McDonnell e Haviland (1995), analisando os seguintes parâmetros:

a) Manifestações pré-coitais:

- Número de reflexos de Flehmen manifestados na presença de uma égua em estro em cada episódio da coleta;

- Número de monta sem ereção total, durante a coleta quando demonstrar a intenção de montar na égua: considerada quando o garanhão montava sobre a égua sem exposição peniana ou com o pênis exposto sem apresentar ereção e, em seguida, desmontava.
 - Tempo de reação a ereção: tempo em segundos do início da ereção peniana após a visualização da égua manequim;
 - Manifestações de cortejo e atitudes gerais como investigação olfativa da região perineal da égua entre outros.
- b) Manifestações coitais:
- Início de monta com ereção (em segundos);
 - Tempo total da monta: tempo em segundos do momento da monta até o garanhão tocar os membros anteriores ao solo no ato da desmonta com a perda da ereção.

3.7 Análise do sêmen

Após a colheita do sêmen, o mesmo foi encaminhado imediatamente ao laboratório e foi examinado por um único avaliador. O ejaculado foi filtrado em um filtro de nylon próprio para a separação da fração gel. O volume, em mililitros (mL), do sêmen total (fração filtrada + fração gel) e volume filtrado, em separado, foram mensurados com o auxílio de uma proveta graduada aquecida a 37°C em banho-maria. Logo em seguida, foi realizada avaliação macroscópica do sêmen que se constituiu de avaliação da cor, odor e volume.

Todo material utilizado no manuseio do sêmen foi mantido em placa aquecedora, mantidos em temperatura próxima de 37°C, evitando, dessa forma, o choque térmico do sêmen durante sua manipulação.

Logo após, uma gota de sêmen *in natura* foi colocada em uma lâmina e coberta por uma lamínula, ambas de vidro, para avaliação da motilidade dos espermatozóides, realizada em microscopia óptica, em aumento de 200x, observada e registrada em dados percentuais de 0-100% de células móveis por campo visual. A determinação da intensidade do movimento dos espermatozóides (vigor) foi também realizada em microscopia óptica, em aumento de 200x, atribuindo-se escala de 0 a 5, entre os valores mínimos e máximos observados para o potencial de movimento, respectivamente.

A concentração espermática foi avaliada, utilizando uma câmara de Neubauer, em microscopia óptica com aumento de 400x. Foi realizada uma solução com diluição do sêmen

em formol-salina-tamponada numa proporção de 1:20 ou 1:50 conforme a densidade aparente do sêmen. Em seguida, foi retirada uma fração dessa solução, previamente homogeneizada, com auxílio de um micropipetador automático e os dois retículos da câmara foram preenchidos. A contagem de espermatozóides na câmara seguiu a metodologia descrita no CBRA. 2013 e foi validada quando a diferença no número de espermatozóides contados em cada retículo da câmara não ultrapassou 10%. A fórmula utilizada para obtenção do valor final da concentração também foi descrita por esses mesmos autores, obtendo-se, após o cálculo, a concentração final de espermatozóide em cada ml do ejaculado.

3.8 Análises Estatísticas

Os resultados dos parâmetros seminais, informações sobre o comportamento e dados obtidos na ultrassonografia do modo color Doppler e Espectral foram comparados entre os dias experimentais, entre os tratamentos e entre os meses pesquisados utilizando o teste ANOVA. Os dados também foram organizados em tabelas de contingência e analisados pelo teste de Qui-quadrado. Ambos os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média geral de RI obtida em todo período experimental foi de $0,76 \pm 0,05$, estando próximos com os valores descritos por Pozor e McDonnell (2002). Estes autores obtiveram médias de RI na artéria testicular do cordão espermático de 0,97 (0,72 - 1,00), em animais não sedados previamente com xilazina (0,5 mg/kg/iv) e RI=0,86 (0,6 - 1,00) com a sedação.

Os valores médios de RI encontrados para o GI e GII antes e após as coletas de sêmen nas quatro estações do ano deste experimento, se encontram na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Médias \pm desvio padrão do Índice de Resistividade (RI) no modo Doppler Espectral, de garanhões da raça Mangalarga Marchador, tratados com solução salina ou com hCG nos meses de janeiro, abril, julho e outubro (médias obtidas a partir de três três exames por grupo).

Índice de Resistividade (0-1)	Janeiro (P>0,05)			
	Sol. Salina		hCG	
Testículos	Esquerdo			
Garanhão	AC	DC	AC	DC
1	0,87 \pm 0,04	0,83 \pm 0,03	0,75 \pm 0,09	0,77 \pm 0,07
2	0,87 \pm 0,04	0,87 \pm 0,04	0,87 \pm 0,04	0,85 \pm 0,05
3	0,78 \pm 0,1	0,79 \pm 0,1	0,74 \pm 0,1	0,75 \pm 0,07
4	0,67 \pm 0,05	0,74 \pm 0,09	0,74 \pm 0,1	0,75 \pm 0,07
Total	0,79 \pm 0,11	0,80 \pm 0,09	0,77 \pm 0,12	0,77 \pm 0,08
	Direito			
1	0,67 \pm 0,005	0,83 \pm 0,02	0,83 \pm 0,04	0,83 \pm 0,2
2	0,78 \pm 0,07	0,83 \pm 0,07	0,63 \pm 0,06	0,85 \pm 0,04
3	0,80 \pm 0,06	0,69 \pm 0,1	0,62 \pm 0,07	0,58 \pm 0,1
4	0,75 \pm 0,09	0,75 \pm 0,09	0,62 \pm 0,07	0,58 \pm 0,1
Total	0,75 \pm 0,07	0,75 \pm 0,07	0,67 \pm 0,10	0,68 \pm 0,02
	Abril (P>0,05)			
	Esquerdo			
1				
2	0,87 \pm 0,04	0,88 \pm 0,1	0,96 \pm 0,02	0,96 \pm 0,02
3	0,95 \pm 0,005	0,90 \pm 0,08	0,78 \pm 0,01	0,75 \pm 0,04
4	0,82 \pm 0,04	0,74 \pm 0,03	0,80 \pm 0,03	0,74 \pm 0,03
Total	0,87 \pm 0,06	0,83 \pm 0,11	0,84 \pm 0,08	0,81 \pm 0,10

Continua na próxima página.

Abril (P>0,05)				
Índice de Resistividade (0-1)	Sol. Salina		hCG	
Testículos	Direito			
Garanhão	AC	DC	AC	DC
1				
2	0,89±0,04	0,87±0,03	0,78±0,14	0,85±0,08
3	0,62±0,05	0,60±0,07	0,74±0,18	0,55±0,02
4	0,77±0,04	0,74±0,03	0,76±0,16	0,74±0,03
Total	0,76 ±0,11	0,76±0,11	0,76±0,16	0,71±0,13
Julho (P>0,05)				
Esquerdo				
1	0,81±0,01	0,74±0,03	0,69±0,01	0,79±0,01
2	0,90±0,02	0,92±0,001	0,82±0,04	0,91±0,05
3	0,79±0,05	0,80±0,002	0,79±0,04	0,72±0,04
4	0,80±0,04	0,75±0,06	0,80±0,04	0,79±0,02
Total	0,82±0,09	0,80±0,09	0,77±0,07	0,80±0,10
Direito				
1	0,69±0,1	0,61±0,1	0,59±0,1	0,65±0,06
2	0,78±0,1	0,80±0,06	0,79±0,05	0,78±0,03
3	0,74±0,1	0,60±0,08	0,59±0,04	0,52±0,04
4	0,80±0,6	0,77±0,01	0,80±0,02	0,79±0,05
Total	0,74±0,13	0,69±0,18	0,69±0,12	0,68±0,11
Outubro (P>0,05)				
Esquerdo				
1	0,90±0,05	0,81±0,04	0,70±0,02	0,71±0,03
2	0,93±0,06	0,86±0,04	0,80±0,07	0,84±0,02
3				
4	0,81±0,005	0,81±0,005	0,78±0,03	0,70±0,02
Total	0,87±0,06	0,82±0,03	0,76±0,06	0,75±0,06
Direito				
1	0,81±0,03	0,79±0,07	0,73±0,1	0,68±0,04
2	0,77±0,04	0,78±0,01	0,79±0,08	0,77±0,04
3				
4	0,78±0,04	0,78±0,04	0,77±0,02	0,67±0,04
Total	0,78±0,04	0,78±0,01	0,76±0,04	0,70±0,06

Sol. Salina: solução salina; hCG: gonadotrofina coriônica humana; AC: antes da coleta de sêmen; DC: depois da coleta de sêmen; Linhas em cinza: Dados excluídos (Animal 1: azoospermia; Animal 3: veio a óbito).

Em relação a caracterização do fluxo sanguíneo testicular, Pozor et. al., (2006a), realizaram um trabalho utilizando tratamento com 500, 1000, 2500 e 6000 UI de hCG e efetuaram exames ultrassonográficos dos testículos no modo B e color Doppler espectral antes

do tratamento, 1 e 72 horas, e 7 dias após o tratamento. Eles observaram que houve um aumento no tempo máximo de velocidade (TAM) e taxa de fluxo sanguíneo arterial total (TABFR= fluxo sanguíneo arterial total /total testicular volume x 100) no exame realizado 1h após o tratamento com a dose de 6000 UI de hCG e não houve nenhum efeito de qualquer dos tratamentos neste fluxo após 7 dias. Os pesquisadores também observaram um aumento na concentração de testosterona após cada tratamento com hCG, sendo este efeito presente até 72h após a administração com 2500 UI e foi ainda maior após a administração de 6000 UI de hCG. Eles concluíram que houve uma significativa correlação entre o aumento na concentração de testosterona e o consequente aumento nos parâmetros ultrassonográficos no modo Doppler espectral após o tratamento com hCG.

Apesar de Pozor et. al., (2006a), terem avaliados outros parâmetros, como, PI, RI, velocidade diastólica final (EDV), TAM e fluxo sanguíneo arterial total (TABF= tempo médio da velocidade máxima x A; sendo A =corte transversal da artéria), só foi citado aumento no tempo máximo de velocidade e taxa de fluxo sanguíneo total arterial para os animais que tomaram 6000UI de hCG.

No entanto, Cochard et al. (2000), citam que para mensurações do fluxo sanguíneo em modo ultrassonográfico Doppler espectral, os valores de velocidade como EDV, são conhecidos por serem consideravelmente variáveis e não consistentes entre as medidas.

Neste experimento, optou-se pela utilização do RI por ser um valor de pouca variação (0-1) e ser o índice mais sensível e comum utilizado na detecção de distúrbios do fluxo sanguíneo testiculares em humanos de acordo com Biagiotti et al. (2002); Ginther, 2007; Pinggera, et al. (2008); Ortega-Ferruzola et al. (2014). A vantagem desses índices em relação a análise isolada de velocidade é de que os índices têm a independência da correção do ângulo, sendo eles utilizados para avaliar vasos muito pequenos e tortuosos onde é difícil a correção do ângulo (NELSON e PRETORIUS, 1988).

Avaliando o parâmetro aferido, o presente estudo observou que não ocorreu diferença estatística entre os valores de RI obtidos nos exames realizados entre os grupos GI solução salina e GII com administração de hCG, nos testículos esquerdo e direito, antes e após as coletas seminais, e nem entre as diferentes estações do ano.

Pozor et al. (2006b), relataram uma outra pesquisa avaliando o fluxo da artéria testicular com ultrassonografia no modo Doppler espectral nas quatro estações do ano. Os autores relatam que ocorrem flutuações no fluxo sanguíneo testicular entre as diferentes estações e que essa

regulação pode estar relacionada também com as mudanças demonstradas no volume testicular e na produção de espermatozoides nessas diferentes fases. A pesquisa demonstrou que houve diferenças entre as estações do ano para as seguintes variáveis: pico de velocidade sistólico (PSV), velocidade diastólica final (EDV), diâmetro arterial, taxa de fluxo sanguíneo da artéria testicular (TABF), concentração de testosterona e de estradiol. O estudo relata que a perfusão testicular aumenta durante a estação reprodutiva, correlacionando também com o aumento das concentrações de testosterona. Segundo esses autores, isso parece ser principalmente por aumento do diâmetro da artéria testicular e aumento da velocidade média do fluxo sanguíneo e portanto, as flutuações no fluxo sanguíneo testicular podem estar envolvidas na regulação das mudanças sazonais no volume testicular e na produção de espermatozoides.

Contudo, os resultados de Pozor et al. (2006b) foram obtidos em região geográfica acima da linha do equador, em local de estações climáticas mais bem definidas, discordando dos resultados da presente pesquisa, onde não ocorreu diferença significativa entre as diferentes estações do ano em relação ao RI. Esses resultados se justificam pelo fato da região onde a presente pesquisa foi realizada não ter um fotoperíodo distinto entre as diferentes estações.

Até o presente momento não foram encontradas na literatura pesquisas sobre a vascularização testicular em equinos aferida por ultrassonografia em color Doppler, mensurados por método subjetivo em porcentagem de coloração. Os resultados obtidos por essa técnica também não sofreram alterações entre os tratamentos com solução salina e com hCG, entre as diferentes estações do ano, e nem em entre antes e após as colheitas de sêmen (**Tabela 2**). Provavelmente, pelo mesmo motivo citado acima em relação ao RI, devido a localização geográfica em que pesquisa foi realizada.

Tabela 2 - Média \pm desvio padrão da porcentagem de coloração obtida através da ultrassonografia em modo Doppler colorido de garranhões da raça Mangalarga Marchador tratados com solução salina ou com hCG nos meses de janeiro, abril, julho e outubro (médias obtidas a partir de três exames por grupo).

COLOR %	Janeiro (P>0,05)			
	Sol. Salina		hCG	
Testículos	Esquerdo			
Garranhão	AC	DC	AC	DC
1	13,7 \pm 2,9	13,3 \pm 3,6	14,1 \pm 5,5	12,7 \pm 2,8
2	15 \pm 4,6	17,8 \pm 5,9	17,6 \pm 3,1	16 \pm 9,0
3	12,6 \pm 1,4	9,8 \pm 0,5	11,9 \pm 11,8	11,8 \pm 2,0
4	13 \pm 2,4	17,7 \pm 17,7	14,2 \pm 3,5	15,8 \pm 1,4
Total	13,5 \pm 1,9	14,6 \pm 3,9	14,4 \pm 4,4	14 \pm 3,3
Direito				
1	13,8 \pm 1,4	17,6 \pm 3,1	16,9 \pm 5,0	16,4 \pm 3,4
2	13,2 \pm 1,7	13,9 \pm 6,0	15,6 \pm 8,0	16,4 \pm 4,7
3	11,3 \pm 3,3	13,2 \pm 3,5	11,3 \pm 9,2	19,6 \pm 12,2
4	15,8 \pm 11,8	15,7 \pm 2,9	17,8 \pm 5,0	20,1 \pm 3,2
Total	13,4 \pm 4	15 \pm 2,8	15,3 \pm 4,7	18,1 \pm 4,3
Abril (P>0,05)				
Esquerdo				
1				
2	17,7 \pm 1,9	15,0 \pm 1,8	23,8 \pm 3,2	19,9 \pm 5,2
3	5,4 \pm 1,4	10,9 \pm 3,4	6,0 \pm 1,4	10,3 \pm 2,4
4	9,4 \pm 1,6	8,8 \pm 1,5	8,7 \pm 2,4	13,7 \pm 1,1
Total	10,8 \pm 5,3	11,5 \pm 3,5	12,8 \pm 8,2	14,6 \pm 5,1
Direito				
1				
2	10,8 \pm 1,1	10,8 \pm 1,1	10,7 \pm 3,0	19,0 \pm 5,8
3	10,0 \pm 2,5	10,0 \pm 2,5	13,9 \pm 2,5	14,8 \pm 1,1
4	10,1 \pm 1,4	10,1 \pm 1,4	11,2 \pm 2,2	13,4 \pm 0,8
Total	10,2 \pm 1,7	11,7 \pm 3,1	11,9 \pm 2,9	15,7 \pm 14,1
Julho (P>0,05)				
Esquerdo				
1	16,4 \pm 4,1	20,1 \pm 3,4	18,4 \pm 5,3	20,4 \pm 2,6
2	26,2 \pm 8,9	28,3 \pm 3,2	19,0 \pm 2,8	26,4 \pm 3,0
3	10,8 \pm 5,5	14,0 \pm 6,0	14,3 \pm 5,5	22,0 \pm 5,9
4	17,2 \pm 2,7	24,0 \pm 4,1	11,2 \pm 1,4	12,4 \pm 1,0
Total	17,6 \pm 8,1	21,6 \pm 6,8	15,7 \pm 5,2	20,3 \pm 6,1

Continua na próxima página.

COLOR %	Julho (P>0,05)			
	Sol. Salina		hCG	
Testículos	Direito			
Garanhão	AC	DC	AC	DC
	Direito			
1	18,0±1,2	19,2±3,1	23,8±2,1	24,8±2,2
2	18,7±3,3	18,7±2,8	23,8±5,1	19,9±1,1
3	17,0±3,8	16,6±5,5	21,1±4,5	21,2±4,8
4	18,3±1,9	24,8±1,4	21,8±6,6	19,8±1,0
Total	18±2,8	19,8±3,6	22,6±4,9	21,4±3,4
	Outubro (P>0,05)			
	Esquerdo			
1	22,0±2,2	26,4±2,5	24,2±8,0	27,0±3,4
2	26,9±2,2	30,6±1,6	36,8±1,9	34,4±2,1
3				
4	14,1±2,5	19,6±3,4	27,6±2,6	16,7±11,9
Total	21±5,4	25,5±5,2	29,5±7,2	30,1±3,9
	Direito			
1	21,9±2,8	30,8±4,2	30,0±2,7	30,8±4,2
2	25,4±3,6	25,3±2,2	22,6±1,7	22,4±4,8
3				
4	23,7±1,0	26,4±2,5	27,3±0,7	28,7±1,0
Total	23,6±3	27,5-3,8	26,6±3,6	27,2±5,1

Sol. Salina: solução salina; hCG: gonadotrofina coriônica humana;

AC: antes da coleta de sêmen; DC: depois da coleta sêmen; Linhas em cinza: Dados excluídos (Animal 1: azoospermia; Animal 3: veio a óbito).

Em relação às manifestações comportamentais observadas nos garanhões durante a monta, as características do número de reflexo de flehmen, número de montas sem ereção, tempo de reação à ereção e tempo total de monta, não apresentaram diferenças entre os grupos com administração de solução salina ou hCG e nem entre os períodos estudados (P>0,05) (Tabela 3).

Tabela 3 - Média \pm desvio padrão de parâmetros comportamentais (três avaliações por grupo) no ato das colheitas seminais dos garanhões, nas 4 estações do ano, tratados com hCG ou solução salina.

Comportamento (P>0,05)	Janeiro		Abril	
	Sol. Salina	hCG	Sol. Salina	hCG
R. de Flehmen(n°)	0,7 \pm 0,9	0,3 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
MSE(n°)	4,3 \pm 2,6	3,7 \pm 1,7	1,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,9
TRE (s)	20,8 \pm 40,3	24,4 \pm 42,3	27,2 \pm 20,3	20,2 \pm 10,2
IME(s)	48,1 \pm 76,8	39,5 \pm 69,9	71,1 \pm 44,2	39,1 \pm 6,3
Total TM (s)	35,7 \pm 27,1	38,7 \pm 41,5	33,2 \pm 6,9	29,8 \pm 5,5
Comportamento (P>0,05)	Julho		Outubro	
	Sol. Salina	hCG	Sol. Salina	hCG
R. de Flehmen(n°)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,7 \pm 0,9	0,7 \pm 0,9
MSE(n°)	2,3 \pm 0,9	2,3 \pm 0,9	0,7 \pm 0,5	0,7 \pm 0,5
TRE (s)	38,8 \pm 73,1	35,3 \pm 41,9	28,4 \pm 19,2	14,3 \pm 11,1
IME(s)	58,8 \pm 67,6	56,8 \pm 69	35 \pm 19,3	29,1 \pm 13,3
Total TM (s)	36,3 \pm 41,8	28,9 \pm 17,1	29,7 \pm 6,7	27,4 \pm 7,5

Sol. Salina = solução salina; **hCG**= gonadotrofina coriônica humana; **R. de Flehmen**= reflexo de flehmen; **N° MSE** = n° de monta sem ereção; **TRE**= tempo de reação à ereção; **IME**= início de monta com ereção; **TM**: tempo total de monta.

Os parâmetros médios de comportamento de garanhões da raça Mangalarga Marchador obtidos no presente experimento encontram-se dentro dos parâmetros descritos para a espécie no **Quadro 1** por McDonnel (1992) e para a raça Mangalarga Marchador de 7 a 15 anos, descrito por Oliveira, 2014: n° de reflexo de flehmen= 0,3 \pm 0,8; n° de montas sem ereção= 1,4 \pm 0,3; tempo de reação à ereção= 94,6 \pm 304,2; duração total da monta= 177 \pm 164,5.

Trabalhos realizados por Thompson et al. (1977), que utilizaram garanhões submetidos ao tratamento com luz artificial, simulando o aumento natural do fotoperíodo em uma região de latitude 40°35' ao norte, também não verificaram alterações em relação ao número de montas. No entanto, o tempo de reação foi menor nos animais que foram submetidos à luz. Este fato já havia sido relatado por Skinner e Bowen (1968) e Pickett et al. (1976), onde a média do tempo de reação tende a ser a maior durante o inverno e a menor durante a estação de monta natural. Talvez, a menor latitude em que foi realizado o presente estudo, com pouca diferença entre a duração do fotoperíodo durante as estações, dificultou a possibilidade de perceber esta diferença de comportamento dos garanhões utilizados.

Com relação aos parâmetros seminais avaliados, como volume filtrado, motilidade, vigor e concentração, os resultados obtidos não apresentaram diferenças entre os tratamentos com solução salina e com hCG e nem entre as estações do ano (P>0,05). Somente o valor de

volume total de sêmen apresentou diferença estatística entre os meses de janeiro e abril (P=0,03) e entre os meses de abril e julho (P=0,02) (Tabela 4).

Tabela 4 - Média \pm desvio padrão dos parâmetros seminais dos garanhões nos meses de janeiro, abril, julho e outubro, de 2016, tratados com hCG e solução salina, obtidas a partir de três coletas de sêmen por grupo tratado.

Volume de sêmen total (ml)								
Garanhão	Janeiro		Abril		Julho		Outubro	
	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG
1	35 \pm 2,9	10,2 \pm 2,3	S/D	S/D	7 \pm 1,6	11 \pm 7,3	75 \pm 18,4	62 \pm 5,4
2	100,7 \pm 24,4	124,7 \pm 35,3	96 \pm 27,8	161,7 \pm 39,5	76 \pm 36,0	45 \pm 11,0	104,7 \pm 12,3	156,3 \pm 12,5
3	107,3 \pm 10,4	108 \pm 32,9	51,7 \pm 7,1	124,7 \pm 19,4	47,7 \pm 14,4	68,3 \pm 5,7	S/D	S/D
4	98,3 \pm 10,1	96,7 \pm 22,8	63 \pm 35,8	87 \pm 27,9	68,3 \pm 10,0	50 \pm 7,5	73,3 \pm 13,9	84,3 \pm 13,1
Total	85,3 \pm 32,5 ^a	84,9 \pm 51,7 ^b	70,2-30,2 ^c	109,6 \pm 47,6 ^d	49,75 \pm 33,20 ^e	43,5-22,2 ^f	84,3-20,8 ^g	100,8-48,3 ^h

Números nas linhas com sobrescritos: b x d = P<0,03; d x f = P< 0,02

Volume de sêmen filtrado (ml) (P>0,05)								
Garanhão	Janeiro		Abril		Julho		Outubro	
	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG
1	26 \pm 4,9	8,5 \pm 3,1	S/D	S/D	6,7 \pm 2,1	11 \pm 7,3	38,3 \pm 2,6	42,3 \pm 3,4
2	73 \pm 21,7	88,3 \pm 26,6	58,7 \pm 8,7	46 \pm 21,6	67,7 \pm 28,6	44,3 \pm 11,7	80 \pm 1,6	61,3 \pm 1,2
3	57,7 \pm 17,0	42,7 \pm 7,4	40,3 \pm 6,5	63,3 \pm 9,3	47,7 \pm 14,4	65,3 \pm 4,7	S/D	S/D
4	76,7 \pm 8,7	53,3 \pm 18,1	51 \pm 29,5	57 \pm 5,7	65,3 \pm 8,2	47,3 \pm 6,5	55,3 \pm 6,2	62,3 \pm 10,4
Total	44,6 \pm 25	48,3 \pm 33,8	50 \pm 17	55,4 \pm 15,7	45,5 \pm 28,7	42 \pm 21,1	57,8 \pm 17,5	55,3 \pm 11,1

Motilidade total (%) (P>0,05)								
Garanhão	Janeiro		Abril		Julho		Outubro	
	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG
1	71,7 \pm 8,5	70 \pm 8,2	S/D	S/D	75,0 \pm 10,8	81,7 \pm 2,4	68,3 \pm 2,4	81,7 \pm 2,4
2	80 \pm 0	68,3 \pm 2,4	76,7 \pm 8,5	78,3 \pm 6,2	65,0 \pm 12,2	68,3 \pm 6,2	76,7 \pm 8,5	70,0 \pm 8,2
3	70,0 \pm 8,2	68,3 \pm 20,1	61,7 \pm 22,5	65,0 \pm 4,1	61,7 \pm 2,4	60,0 \pm 8,2	S/D	S/D
4	55,0 \pm 14,7	36,7 \pm 2,4	46,7 \pm 5,8	68,3 \pm 4,7	60,0 \pm 14,1	66,7 \pm 12,5	70,0 \pm 7,1	55,0 \pm 7,1
Total	69,1 \pm 13	60,8 \pm 17,7	61,6 \pm 18,7	70,5 \pm 7,6	65,4 \pm 10,8	69,1 \pm 11,3	71,6 \pm 7,4	68,9 \pm 12,6

Vigor (1 - 5) (P>0,05)								
Garanhão	Janeiro		Abril		Julho		Outubro	
	Sol. Salina	c/ hCG						
1	2,8 \pm 0,8	3,3 \pm 0,5	S/D	S/D	3,3 \pm 0,2	3,8 \pm 0,3	3,3 \pm 1,8	3,8 \pm 0,2
2	3,8 \pm 0,3	2,5 \pm 0,4	4,0 \pm 0	3,7 \pm 0,5	3,5 \pm 0,4	3,2 \pm 0,2	3,0 \pm 0,4	3,3 \pm 0,6
3	3,0 \pm 0	3,7 \pm 0,5	3,3 \pm 0,9	3,0 \pm 0	3,2 \pm 0,2	3,2 \pm 0,6	S/D	S/D
4	3,2 \pm 0,6	2,7 \pm 0,5	2,7 \pm 0,6	3 \pm 0	3,2 \pm 1,1	3,3 \pm 0,6	3,2 \pm 0,2	2,3 \pm 0,2
Total	3,2 \pm 0,6	3 \pm 0,6	3,3 \pm 0,8	3,2 \pm 0,4	3,2 \pm 0,4	3,3 \pm 0,5	3,1 \pm 0,3	3,1 \pm 0,7

Concentração espermática (x10 ⁶) (P>0,05)								
Garanhão	Janeiro		Abril		Julho		Outubro	
	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG	Sol. Salina	c/ hCG
1	37,3 \pm 29,6	22,0 \pm 7,9	S/D	S/D	75,3 \pm 6,8	385,0 \pm 81,4	60,3 \pm 2,4	298,0 \pm 137,5
2	92,3 \pm 30,2	63,5 \pm 14,7	51,0 \pm 7,9	72,8 \pm 16,2	80,8 \pm 17,9	108,0 \pm 26,7	163,0 \pm 12,8	102,3 \pm 49,1
3	90,2 \pm 10,9	54,7 \pm 27,3	92,2 \pm 18,3	45,7 \pm 10,7	161,7 \pm 33,0	89,3 \pm 25,5	S/D	S/D
4	29,5 \pm 8,2	65,0 \pm 41,1	18,2 \pm 6,0	29,8 \pm 6,6	89,3 \pm 44,3	139,3 \pm 44,5	150,7 \pm 36,7	117,2 \pm 10,8
Total	62,3 \pm 36,3	51,2 \pm 31,3	53,7 \pm 32,5	49,4 \pm 21,3	209,1 \pm 181	180,4 \pm 129,4	155 \pm 37,66	172,5 \pm 123,6

* Sol. Salina: Solução salina; c/ hCG: com gonadotrofina coriônica humana; S/D: sem dados;

O volume de sêmen total em mL (fração filtrada mais a fração gel) encontrados nesse trabalho no verão, outono, inverno e primavera, após administração de solução salina e hCG, respectivamente foram de: $85,3 \pm 32,5$ e $84,9 \pm 51,7$; $70,2 - 30,2$ e $109,6 \pm 47,6$; $49,75 \pm 33,20$ e $43,5 - 22,2$; $84,3 - 20,8$ e $100,8 - 48,3$. Apesar da alta variabilidade individual dos ganhões, os valores obtidos seguiram os padrões de volume observados na raça Mangalarga Marchador, mencionados por Freitas (2010), respectivamente durante as mesmas estações do ano: $115,4 \pm 44,6$; $35,8 \pm 11,1$; $40,9 \pm 19$; $67,2 \pm 27,3$; sendo quantitativamente maiores durante o verão e primavera.

Em um estudo realizado no hemisfério norte por Janett et al. (2003) todos os parâmetros de qualidade do sêmen mostraram um padrão sazonal claro. O volume, a contagem total de espermatozoides e a motilidade no sêmen fresco foram significativamente maiores ($P < 0,05$) no verão do que no inverno, enquanto a concentração de espermatozoides foi significativamente menor no verão em comparação com as outras estações. Um maior estímulo sexual sofrido pelos reprodutores nos dias de maior luminosidade aumenta a secreção de fluidos por parte das glândulas sexuais acessórias, em especial as glândulas vesiculares (responsáveis pela secreção da fração gelatinosa). Porém, esta variável é a menos importante, uma vez que a fração gel é pobre em espermatozoides e parece não afetar a fertilidade do ejaculado (PICKETT et al., 1974; AMANN, 1993).

Em relação aos valores médios do volume de sêmen filtrado, não houve diferença significativa entre os tratamentos, assim como entre o verão, outono, inverno e primavera, que foram de $44,6 \pm 25$ e $48,3 \pm 33,8$; 50 ± 17 e $55,4 \pm 15,7$; $45,5 \pm 28,7$ e $42 \pm 21,1$; $57,8 \pm 17,5$ e $55,3 \pm 11,1$ (valores de GI e GII respectivamente). Resultados esses, corroboram com os padrões desejáveis pelo CBRA (2013), que variam de 40 a 60 mL, e concordam com os valores demonstrados por Rua et al., (2016), que também trabalharam com a raça Mangalarga Marchador, no estado do Rio de Janeiro e obtiveram volume de $44,4 \pm 27,9$ mL.

Leme et al. (2012), no município de Botucatu-SP, verificaram que durante a estação reprodutiva, (verão) e fora da estação (inverno) o valor médio do volume do sêmen filtrado foi de, $45,6 \pm 4,69$; $39,7 \pm 4,6$ mL, que também estão de acordo com a presente pesquisa.

As diferenças observadas entre os resultados de volume do ejaculado de diversas pesquisas podem ocorrer devido à diferença entre raças avaliadas, assim como diferenças climáticas aos quais os ganhões foram submetidos em cada estudo, assim também pelo fato de sempre poder haver diferenças no volume espermático entre um animal e outro e até entre o

mesmo animal, que pode expressar diferentemente essa característica em coletas diferentes (McKINNON et al., 2011).

Durante as avaliações microscópicas do sêmen, não houve diferença estatística entre os grupos estudados, para motilidade, vigor e concentração espermática assim como entre as estações do ano. Quanto a motilidade (%), os resultados (verão: $69,1 \pm 13$ e $60,8 \pm 17,7$; outono: $61,6 \pm 18,7$ e $70,5$; inverno: $65,4 \pm 10,8$ e $69,1 \pm 11,3$; primavera: $71,6 \pm 7,4$ e $68,9 \pm 12,6$ para GI e GII respectivamente), estando de acordo com Freitas (2010), que trabalhando com garanhões da raça Mangalarga Marchador obteve valores médios para verão: $67,8 \pm 7,5$; outono: $74,6 \pm 6,9$; inverno: $74,5 \pm 5,9$; primavera, $66,4 \pm 8,9$.

No hemisfério norte, Dowsett e Knott (1996) trabalhando com outras raças como Thoroughbred, Shetland, Appalosa, Ponei, Palomino e Quarto de Milha, obtiveram porcentagem de motilidade de 71, 70, 73, 70 e 74 % respectivamente, estando próximo aos valores encontrados no trabalho em questão.

Pickett et al. (1976), no hemisfério norte, e Leme et al. (2012), no hemisfério sul, não observaram diferenças estacionais na motilidade espermática. Esses autores relataram que as diferenças estacionais na motilidade que ocorrem entre diversos estudos podem ser influenciadas pelo manejo dos animais, frequência na colheita de sêmen e condições ambientais, como temperatura e umidade.

Assim como a motilidade, o vigor espermático também não diferiu entre os grupos e entre as estações estudadas, sendo obtidos os seguintes valores, para GI e GII respectivamente: primavera: $3,1 \pm 0,3$ e $3,1 \pm 0,7$; verão: $3,2 \pm 0,6$ e $3 \pm 0,6$; outono: $3,3 \pm 0,8$ e $3,2 \pm 0,4$; inverno: $3,2 \pm 0,4$ e $3,3 \pm 0,5$. Os dados obtidos corroboram com os valores encontrados por Rua et al. (2016), em um experimento realizado também no estado do Rio de Janeiro e que obtiveram uma média de vigor espermático de $4,1 \pm 0,8$ e $4,0 \pm 0,9$, dentro e fora da estação reprodutiva respectivamente (sem diferença significativa).

Segundo Pickett (1993), o aumento do volume seminal pode chegar a 40% nos meses da estação reprodutiva, assim como o número de espermatozoides no ejaculado pode ficar 50% maior no mesmo período. Entretanto, para a Pickett et al. (1998), a motilidade progressiva e o vigor espermático não parece sofrer influência da estação do ano.

Os valores observados em relação a concentração espermática ($\times 10^6$ spztz / mL), com administração de solução salina e hCG respectivamente foram de: primavera: $155 \pm 37,66$ e $172,5 \pm 123,6$; verão: $62,3 \pm 36,3$ e $51,2 \pm 31,3$; outono: $53,7 \pm 32,5$ e $49,4 \pm 21,3$ e inverno:

209,1±181 e 180,4±129,4. Os resultados obtidos foram semelhantes aos resultados de Robalo Silva et al. (2007) em Portugal, que observaram: verão=151±16,5; outono=137±15,6; inverno=143±16,7 e primavera= 138,7±16,9, não observando diferenças entre os ejaculados nas distintas estações do ano.

Entretanto, Rua et al. (2016), no estado do Rio de Janeiro, relataram diferenças dos valores de concentração espermática entre a estação reprodutiva (507±615,9) e fora da estação (278±224,9). Diferentemente, Freitas (2010), que trabalhando com cavalos da raça Mangalarga Marchador, obteve uma maior média de concentração espermática no outono= 311,8 ± 148,3 e inverno: 358,7 ± 180,6, do que na primavera: 178,9 ± 97,0, e no verão: 191,0 ± 110,1, fato que não foi caracterizado em nosso estudo. Freitas (2010) justificou as diferenças observadas na concentração espermática ao fato do volume ejaculado ter sido maior durante a estação.

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

A influência da estação do ano na qualidade espermática de garanhões já foi caracterizada por vários autores (MAGISTRINI et al., 1987; JOHNSON, 1991; CLAY e CLAY, 1992; GERLACH e AURICH, 2000; BLOTTNER et al., 2001; JANETT et al., 2003), que evidenciam a obtenção da capacidade reprodutiva máxima ocorrendo nos meses de primavera e verão em países com marcada diferença climática. Entretanto, esta influência não tem sido verificada nos garanhões que vivem em regiões de clima tropical (LEME et al., 2012), o que confirma os resultados apresentados no presente experimento.

Acredita-se que nos trópicos seja menos provável que os animais utilizem o fotoperíodo como sinalizador para a reprodução sazonal (BRONSON e HEIDEMAN, 1994) e, mesmo na ausência da variação do fotoperíodo, os garanhões devem apresentar um ciclo reprodutivo anual, como resultado de um ciclo circanual endógeno da função testicular (CLAY e CLAY, 1992; ROSER, 2000).

Existem evidências substanciais de que os ciclos reprodutivos possam ser gerados de forma endógena, sem nenhum sinal de mudança anual dos fatores ambientais (TUREK e VAN CAUTER, 1994) e nos trópicos, é menos provável que a regulação sazonal da atividade reprodutiva seja baseada na alteração do fotoperíodo em regiões abaixo de 30° de latitude

(BRONSON e HEIDEMAN, 1994), fato que concorda com os resultados obtidos na presente pesquisa que foi realizada em latitude de 22°44'38”.

Vale ressaltar que a América do Sul é afetada pelas oscilações causadas pelo efeito El Niño, que tornam ainda mais diversificadas e imprevisíveis as condições climáticas da nossa realidade (LEME et al., 2012).

Devemos também considerar as diferenças entre as características reprodutivas que existem entre os sexos (HEIDEMAN, 1989; WOOD, et al., 1991). Pois, é bastante evidente o fato do macho de uma espécie estar sempre, ou quase sempre, apto à reprodução, enquanto a fêmea apresenta certas restrições, o que mostra uma indiscutível vantagem evolutiva dos machos em relação às fêmeas. Por isso não é estranho que a regulação ambiental da reprodução possa diferir entre os sexos (BRONSON e HEIDEMAN, 1994).

5 CONCLUSÕES

A administração de uma única dose de 5000 UI de hCG em garanhões não foi suficiente para causar alterações no fluxo sanguíneo da artéria testicular do cordão espermático, mensurado pelo índice Doppler de resistividade, e nos testículos mensurados pelo método subjetivo em color Doppler. Como também não ocasionou alterações no comportamento reprodutivo e nos parâmetros qualitativos e quantitativos do sêmen nas condições experimentais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. **J. Androl.** v.10.,p. 89-98, 1991.
- AMANN, R.P. Physiology and endocrinology. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Eds). **Equine Reproduction.** Philadelphia: Lea & Febiger, p.658-85, 1993.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function In: **Equine reproduction.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- AURICH, C., BURGMAN; F., HOPPE, H. Opioid regulation of LH and prolactin release in the horse - identical or independent endocrine pathways ? **Anim. Reprod. Sci.**, v.44, p.127-34, 1996.
- BALTHAZART, J.“Steroid metabolism and the activation of social behaviour”. In: BALTHAZART J. Ed. **Advances in Comparative and Environmental Physiology, Vol.3: Molecular and Cellular Basis of Social Behavior in Vertebrates,** Springer Verlag, Berlin, p.105-159, 1989.
- BATISSACO. L.; CELEGHINI, E.C.C.; PINAFFI, F.L.V.; OLIVEIRA, B.M.M.; ANDRADE, A.F.C.; RECALDE, E.C.S.; FERNANDES, C.B. Correlations between testicular hemodynamic and sperm characteristics in rams. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 384-395, 2013.
- BATTAGLIA, C.; GIULINI, S.; REGNANI, G.; Di GIROLAMO, R.; PAGANELLI, S.; FACCHINETTI, F. Volpe Seminal plasma nitrite/nitrate and intratesticular Doppler flow in fertile and infertile subjects. **Hum Reprod.** v.15, p. 2554–2558, 2000.
- BERGH, A.; COLLIN, O.; LISSBRANT, E. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. **Biol Reprod.** v.64, p. 13–20, 2001.
- BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **J. Anim. Sci.**, v. 44, n. 5, p. 818-83, 1977.
- BERSON, D. M.; DUNN, F. A.; TAKAO, M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. **Science**, v.295 (5557), p.1070-1073, 2002.
- BIELINSKA, M.; BOIME, I. Glycosylation of human chorionic gonadotropin in mRNAdependent cell-free extracts: post-translational processing of an asparagine-linked mannose rich oligosaccharide. In: PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 76, Proceedings : **National academy of sciences**, p. 1208– 1212, 1979.
- BIIAGIOTI, G.; CAVALINI, G.; MODENINI, F.; VITALI, G.; GIANAROLI, L. Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery. **BJU Int**, v. 90, p.903-908, 2002.

- BLOTTNER, S.; WARNKER, C.; TUCHESCHERER, A. et al. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **An. Reprod. Sci.**, v. 65, p. 75-88, 2001.
- BOLLWEIN, H.; SCHULZE, J.J.; MIYAMOTO, A.; SIEMEN, H. Testicular blood flow and plasma concentrations of testosterone and total estrogen in the stallion after administration of human chorionic gonadotropin. **J. Reprod. Dev.**, v.54, p. 335-339, 2008.
- BRONSON, F.H., HEIDEMAN, P.D. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: KNOBILL, E., NEILL, J.D. (Eds). **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, p.541-84, 1994.
- BURK, R.L.; ACKERMAN, N. Small animal radiology and ultrasonography: a diagnostic atlas and text. 2.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, p.2-22, 215-230, 1996.
- BYERS, S.W, DOWSETT, K.F., GLOVER, T.D. Seasonal and circadian changes of testosterone levels in the peripheral blood plasma of stallions and their relation to semen quality. **J. Endocrinol.**, v.99, p.141-50, 1983.
- CARTEE, R.E. The physics of ultrasound. In: CARTEE, R.E.; SELCER, B.A.; HUDSON, J.A.; FINN-BODNER, S.; PAMELA, J.; KEN, M. **Practical veterinary ultrasound**. New York: Lea and Feliger Books, chap.1, p.1-9, 1995.
- CARTEE, R.E.; POWE, T.A.; GRAY, B.W.; HUDSON, R.S.; KUHLLERS, D.L. Ultrasonographic evaluation of normal boar testicles. **Am J Vet Res**, v.47, p.2543-2544, 1986.
- CARVALHO, C.F. Técnicas de varredura da cavidade abdominal. In: Ultrassonografia em pequenos animais. São Paulo: Roca, chap.2, p.16-22, 2004.
- CARVALHO, C. F. Ultrassonografia Doppler em pequenos animais. São Paulo: Roca, 274p, 2009.
- CARVALHO, C. F.; CERRI, G. G.; CHAMMAS, M. C. Parâmetros Doppler velocimétricos das artérias renais e da aorta abdominal em gatos da raça persa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n.4, p. 1105-1110, 2009.
- CARVALHO, C. F.; CHAMMAS, M. C.; CERRI, G. G. Morfologia duplex Doppler dos principais vasos sanguíneos abdominais em pequenos animais: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 880-888, 2008a.
- CARVALHO, C. F.; CHAMMAS, M. C.; CERRI, G. G. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol. 38, n. 3, p. 872-879, 2008b.
- CELOTTI, F.; CESI, N. Anabolic Steroids: A review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, Oxford, v.43, n.5, p.469-477, 1992.
- CERRI, G.G. Avaliação dúplex do fígado, sistema portal e vasos viscerais. In **Doppler**. São Paulo: Sarvier, cap.6, p.120-121, 1998.

CHENIER, T.S. Anatomy and physical examination of the stallion. In Samper CS (ed). **Equine breedings management and artificial insemination**. Philadelphia: WB Saunders, 2009, p.1-17.

CLAY, C.M., CLAY, J.N. Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod and the peri-pubertal period in stallion. In: BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D. (Eds) Stallion management. **Vet. Clin. North Amer.**, v.8, p.31-56, 1992.

COCHARD, T.; TOAL, R.; SAXTON, A.M. Doppler ultrasonography features of thoracic limb arteries in clinically normal horses. **Am J Vet Res**, v.61,p.183-90, 2000.

COLE, L. A. New discoveries in the biology and detection of human chorionic gonadotrophin. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.26, p. 7-8, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal**.3ed.; Belo Horizonte, CBRA, 2013.

DAMBER, J.E.; BERGH, A.; DAEHLIN, L. Testicular blood flow, vascular permeability, and testosterone production after stimulation of unilaterally cryptorchid adult rats with human chorionic gonadotropin. **Endocrinology**; v.117, p.1906-1913, 1985.

DASCANIO, J.J.; MCCUE, P.M. Equine reproductive procedures. Aspen: Wiley Blackwell, 560p, cap. 17, p. 58 - 62, 2014.

DOWSETT, K.F.; KNOTT, L.M. The influence of age and breed on stallion semen. **Theriogenology**, v.46, p. 397-412, 1996.

DROST, W.T. Basic ultrasound physics. In: THRALL, D.E. **Textbook of veterinary diagnostic radiology**. 5.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, chap.2, p.38-49, 2007.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSIN, C.J.G. Tratado de anatomia veterinária, 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 813p, 2004.

EILTS, B.E.; PECHMAN, R.D. B-mode ultrasound observations of bull testes during breeding soundness examinations. **Theriogenology**, v.30, p.1169-1175, 1988.

EISENHAUER, K.M., McCUE, P.M., NAYDEN, D.K., OSAWA, Y., ROSER, J.F. Localization of aromatase in equine Leydig cells. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.11, p.291-98, 1994.

EISENHAUER, K.M., ROSER, J.F. Effects of lipoproteins, eLH, eFSH, and ePrL on equine testicular steiroidogenesis in vitro. **J. Androl.**, v.16, p.18-22, 1995.

EVANS, J.W.; ROSER, J.F.; MIKUCKIS, G.M. Comparison of the interaction of equine LH and human chorionic gonadotropin to equine testicular receptors. **Journal of Reproduction and Fertility**, p.113-21, 1982.

FERNANDES, C. E.; PIMENTEL, C. A. Características seminais e fertilidade em garanhões. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol.32, n.5, p.829-834, 2002.

FERREIRA, J.C.; IGNÁCIO, F.S.; MEIRA, C. Uterine vascular perfusion and spectral-

Doppler measurements during early gestation in mares: New concepts of evaluation. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 281-283, 2010.

FINN-BODNER, S.T.; HUDSON, J.A. Abdominal vascular sonography. *Vet. Clin. North Am. Small Pract.*, v.28, p. 887-919, 1998.

FREITAS, B.W. Parâmetros fisiológicos e seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador na região da zona da mata mineira no decorrer das estações climáticas. 72F. Tese de mestrado. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa.2010.

FREITAS, C.C., Aspectos do comportamento reprodutivo na monta natural de equinos da raça crioula. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

GERLACH, T.; AURICH, J.E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 197–213, 2000.

GHINEA, N.; HAI, M.; GROVER-PICARD, M.; MILGROM, E. How protein hormones reach their target cells. Receptor-mediated transcytosis of hCG through endothelial cells. **J Cell Biol.** v. 125, p. 87–97, 1994.

GINTHER, O.J.: Ultrasonic imaging and animal reproduction: Color – Doppler ultrasonography. 4^a edition. Cross Plains, WI: **Equiservices Publishing**. Cap. 9, p. 205-224, 2007.

GINTHER, O.J.; GARCIA, M.C.; BERGFELT, D.R. Embryonic loss in mares: Pregnancy rate, length of interovulatory intervals and progesterone concentrations associated with loss during days 11 to 15. **Theriogenology**, Amsterdam, vl. 24, n. 4, p. 409-417, 1985.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Seasonal influence on equine dynamics. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, vol. 1, n. 1, p. 31-44, 2004.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D. Doppler Ultrasound in Equine Reproduction: Principles, Techniques, and Potential, **Journal of Equine Veterinary Science – Veterinary Review**. p. 516-526, 2004.

GRANATA, A.; FIORINI, F.; ANDRULLI, S.; LOGIAS, F.; GALLIENI, M.; ROMANO, G.; SICUREZZA, E.; FIORE, C. E. Doppler ultrasound and renal artery stenosis: an overview. **Journal of Ultrasound**, Philadelphia, v. 12, p. 133-143, 2009.

GODDART, P.J. General principles. In: *Veterinary ultrasonography*. Londres: Cab International, chap.1, p.1-30, 1995.

GOSLING, R.G.; KING, D.R. Continuous wave ultrasound as an alter native and complement to x-rays in vascular examinations. **Em Cardiovascular Applications of Ultrasound**, ed. R.S. Reneman p.p. 266-282, North Rolland, Amsterdam, 1974.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7^a ed., São Paulo: Ed. Manole, 2004. 513 p.

- HAMMES, A.M.; PIMENTEL, C.A.; FERNANDES, C.E. Fertilidade em garanhões avaliada através do exame andrológico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.2, p.277-283, 1996.
- HEIDEMAN, P.D. Delayed development in Fischer's pygmy fruit bat (*Haplonycteris fischeri*) in the Phillipines. **J. Reprod. Fertil.**, v.85, p.363-82, 1989.
- HELD, J.P.; ADAIR, S.; MCGAVIN, M.D.; ADAMS, W.H.; TOAL, R.; HENTON, J. Bacterial epididymitis in two stallions. **J Am Vet Med Assoc.** Sep 1;v.197(5), p.602-4, 1990.
- HELD, J.P.; PRATER, P.; TOAL, R.L.; BLACKFORD, J.T.; MCCRACKEN, M. Sperm granuloma in a stallion. **J Am Vet Med Assoc.** v.194, n.2, p.267-268, 1989.
- HENRY, M.; McDONNELL, S. M.; LODI, L. D.; GASTAL, E. L. Pasture mating behaviour of donkeys (*Equus asinus*) at natural and induced oestrus. **J. Reprod. Fertil.**, (Suppl 44), p.77-86, 1991.
- HERSHMAN, J. M. Physiological and pathological aspects of the effect of human chorionic gonadotropin on the thyroid. **Best Practice Research Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 249-265, 2004.
- HUNT, R.J.; HAY, W.; COLLATOS, C.; WELLES, E. Testicular seminoma associated with torsion of the spermatic cord in two cryptorchid stallions. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.197, p.1484-1486, 1990.
- INQUE, J.; CERBITO, W.A.; OGURI, N.; MATSUZAWA, T.; SATO, K. Serum levels of testosterone and oestrogens in normal and infertile stallions. **International Journal of Andrology**, v.16, n.2, p.155-8, 1993.
- IRVINE, C.H.G., ALEXANDER, S. Importance of tests hormones in maintaining the annual pattern of LH secretion in the male horse. **J. Reprod. Fertil.** Suppl., v.32, p.97-102, 1982.
- IZUMI, M.; SUGIURA, T.; NAKAMURA, H.; NAGATOYA, K.; IMAI, E.; HORI, M. Differential diagnosis of prerenal azotemia from acute tubular: necrosis and prediction of recovery diseases by Doppler ultrasound. **American Journal of Kidney Diseases**, New York, v. 35, n. 4, p. 713-719, 2000.
- JANETT, F.; THUN, R.; NIEDERER, K.; BURGER, D.; HASSIG, M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. **Theriogenology**, vl. 60, p. 453-461, 2003.
- JEE, W.H.; CHOE, J.K.; BYUN, J.Y.; SHINN, K.S.; HWANG, T.K. Resistive index of the intrascrotal artery in scrotal inflammatory disease. **Acta Radiol**; v.38, p. 1026-30, 1997.
- JOHNSON, L. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. **Biol. Reprod.**, v.44, p. 284-291, 1991.
- JOHNSON, L., THOMPSON, D.L. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population daily sperm production and serum concentration of FSH, LH and testosterone in stallions. **Biol. Reprod.**, v.29, p.777-789, 1983.

- KHALIL, A.M.; MURAKAMI, N.; KASEDA, Y. Relationship between Plasma Testosterone Concentrations and Age, Breeding Season and Harem Size in Misaki Feral Horses. **J. Vet. Med. Sci.**; v. 60 (5), p. 643-645, 1998.
- KAWAKAMA, J.; KODAIRA S.; CERRI, G.G. Física. In: CERRI, G.G.; ROCHA, D.C. **Ultra-sonografia abdominal**. São Paulo: Sarvier, p.1-14, 1993.
- KEALY, J.K.; McALLISTER, H.; GRAHAM, P.J. Radiografia e ultrassonografia do cão e gato. 5ª Ed. Rio de Janeiro p.17, 2012.
- KEAY, S. D.; VATISH, M.; KARTERIS, E.; HILLHOUSE, E. W.; RANDEVA, H. S. The role of hCG in reproductive medicine. **International Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 111, p. 1218–1228, 2004.
- KELLER, L. Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites. **Insectes Soc.** vol. 45, p.235–246, 1998.
- KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Hastings-EUA.: **Society for Theriogenology**, 1983.
- KING, A.M.: Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. **The Veterinary Journal**. v.171 p. 408-420, 2006.
- KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. v.2, p.119-134., 2004.
- LAGARES, M. A.; MEIRELLES, L.S.; WALD, V.B.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Efeito de diferentes diluentes sobre a membrana plasmática do espermatozóide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, vol. 7, n. 3, p. 153-156, 2000.
- LAPTHORN, A. J.; HARRIS, D. C.; LITTLEJOHN, A.; LUSTBADER, J. W.; CANFIELD, R. E.; MACHIN, K. J.; MORGAN, F. J.; ISAACS, N. W. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. **Nature**, v. 369, p. 455–461, 1994.
- LEME, D.P.; PAPA, F. O.; ROSER, J. F. Reproductive characteristics of stallions during the breeding and non-breeding season in a tropical region. **Tropical Animal Health and Production**, v.44, n. 7, p. 1703-1707, 2012.
- LIMA, S. B.; WISCHRAL, A.; FERREIRA, F.; VERRESCHI, I. T. N. Resposta esteroidogênica induzida por hCG em garanhões jovens Mangalarga: testosterona e sulfato de estrona plasmáticos. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. I, p. 52-55, 2000.
- LISE, M.L.Z.; GAMA E SILVA, T.S.; FERIGOLO, M.; BARROS, H.M.T. O abuso de esteróides anabólicoandrogênicos em atletismo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, São Paulo, v.45, n.4, p.364-370, 1999.
- LOVE, C.C. Ultrasonographic evaluation of the testis, epididymis, and spermatic cord of the stallion. **Vet Clin North Am Equine Pract.** n.8, vol.1, p.167-182, 1992.

- MAGISTRINI, M., CHANTELOUB, P., PALMER, E. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen fro freezing. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n.35, p.127-33, 1987.
- MARTINOLI, C.; DERCHI, L. E.; RIZZATO, G.; SOLBIATI, L. Power Doppler sonography: general principles, clinical applications, and future prospects. **European Radiology**, Berlin, v. 8, p. 1224-1235, 1998.
- McDONNELL, S.M. Reproductive Behavior of the stallion. **Veterinary Clinics of North America: Equine Pract.** v. 2 (3), p. 535-555. 1986.
- McDONNELL, S.M. Normal and abnormal sexual behavior. In: Blanchard, T.L., Varner, D.D.(eds.), Stallion Management, **Vet. North Am. Equine Pract.**, vol. 8, p. 71-89. 1992.
- McDONNELL, S. M. Stallion Behavior and Endocrinology: What Do We Really Know? **Equine Reproduction**, vol. 41, p.18-19, 1995.
- McDONNELL, S.M. Reproductive behavior and mares: comparison of ree-running and domestic in-hand breeding. **Animal Reproduction Science**, vol. 60-61, p.211-219, 2000.
- McDONNELL, S.M. & HAVILAND, J.C.S. Agonistic ethogram of the equid bachelor band. **Applied Animal Behavior Science**. v. 43, p.147-188, 1995.
- McKINNON, A.O. Exames para avaliação da fertilidade do garanhão. **Brazilian Journal of Equine Medicine**, v.29, p.112-129, 2010.
- McKINNON, A. O.; EDWARD, L.; SQUIRES, E. L.; WENDY, E. V.; DICKSON, V. D. (Eds.). **Equine reproduction**. 2.ed. Ames: Wiley-Blackwell, 3288p. 2011.
- McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. 2. ed. Philadelphia: Williams and Wilkins, 1137f., 1993.
- MEDEIROS, S. F. D.; NORMAN, R. J. Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 1, p. 69-95, 2009.
- MELO, C.M.; PAPA, F.O.; PRESTES, N.C.; ALVARENGA, M.A. LAUFER-AMORIM, R. Bilateral Leydig Cell Tumor in Stallion, **Journal of Equine Veterinary Science**, n.10, v.1.27, p.450-453, 2007.
- MERRITT, C. R. B. Física do Ultra-som. In: RUMACK, C. M.; WILSON, S. R.; CHARBONEAU, J. W. **Tratado de ultra-sonografia diagnóstica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2 ed., p. 3-29. 1999.
- MIDDLETON, W.D.; THORNE, D.A.; MELSON, G.L. Color Doppler ultrasound of the normal testis. **Am J Radiol.**, v.152,p.293-7, 1989.
- MONTEIRO, G.A. Ultrassonografia aplicada ao exame andrológico em garanhões. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.157-168, jan./mar. 2017.

MORISHIMA, A.; GRUMBACH, M.M.; SIMPSON, E.R.; FISHER, C.; QIN, K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v.80, n.12, p.3689-3698, 1995.

NELSON, N. C.; DROST, T.; LERCHE, P.; BONAGURA, J. D. Noninvasive estimation of central venous pressure in anesthetized dog by measurement of hepatic venous blood flow velocity and abdominal venous diameter. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v. 51, n. 3, p. 313-323, 2010.

NELSON, T. R.; PRETORIUS, D. H. The Doppler signal: where does it come and what does it mean? **American Journal of Roentgenology**, Leesburg, v. 151, p. 439-447, 1988.

NEWCOMBE, J. R. Human chorionic gonadotrophin. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**. 2. ed. [S.l.], Wiley Blackwell, p. 1804-10, 2011.

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

NOVELLAS, R.; ESPADA, Y.; GOPEGUI, R. R. Doppler ultrasonographic estimation of renal and ocular resistive and pulsability indices in normal dogs and cats. **Veterinary, Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v. 48, n. 1, p. 69-73, 2007.

NOUE, P.; BÉRNABE, J.; RAMPIN, O. et al. Sexual behavior of stallions during in-hand natural service and semen collection: an observation in French studs. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 161-169, 2001.

NUNES, M. T. A glândula hipófise. In: AIRES, M. M. **Fisiologia Animal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 782-811, 1999.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GRACIA-CALVO, L. A.; EZQUERRA, J.; PENA, F. J. Use of Colour and Spectral Doppler Ultrasonography in Stallion Andrology. **Reproduction of Domestic Animals**, Cáceres, v. 49, n.4, p. 88-96, 2014. ISSN:0936-6768.

PANG, S. F.; LI, L.; AYRE, E. A. Neuroendocrinology of melatonin in reproduction: recent developments. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, New York, v. 14, n. 3-4, p. 157-166, jun. 1998.

PAPA, F. O., DELL' AQUA JÚNIOR, J. A. Efeito do tipo de envasamento e método de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade de sêmen congelado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, vol. 25, n.1, p. 458-46, 2001.

PICKEREL, T. M.; CROWELL- DAVIS; S. L. CAUDLE; A. B. ESTEP, D. Q. Sexual preferences of mares (*Equus caballus*) for individual stallions. **Applied Animal Behaviour Science**, vol. 38, p.1-13, 1993.

PICKETT, B.W. Factor affecting sperm production and output. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Eds). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Fabiger, p.689-704. 1993.

- PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. O., VOSS, J. L. (Eds.). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea e Febiger. p. 769-789, 1993.
- PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; SEIDEL JR, G.E.; BERNDTSON, W.E.; VOSS, J.L. Reproductive physiology of stallion. VI: Seminal and behavior characteristics. **J.Am.Vet. Assoc.**, v. 43, p.617-625, 1976.
- PICKETT, B. W.; GEBAUER, M. R.; SEIDEL, G. E. Jr; VOSS, J. L. Reproductive physiology of the stallion: spermatozoal losses in the collection equipment and gel. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 165, p. 708-710. 1974.
- PICKETT, B.W., VOSS, J.L. Managment of shuttle stallion for maximum reproductive efficiency – Part 1. **J. Equine Vet. Sci.**, vol.18, p.214-24, 1998.
- PICKETT, B.W., VOSS, J.L., CLAY, C.M. Managment of shuttle stallions for maximum reproductive efficiency – Part 2. **J. Equine Vet. Sci.**, v.18, p.280-7, 1998.
- PINGGERA, G.M.; MITTERBERGER, M.; BARTSCH, G. STRASSER, H. GRADL, J.; AIGNER, F.; PALLWEIN, L.;FRAUSCHER, F., Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis. *BJU Int* v.101; p.722–726, 2008.
- POULSEN NAUTRUP, C. Technical principles. In: POULSEN NAUTRUP, C.; TOBIAS, R. **Diagnostic ultrasonography of the dog and cat. 2.ed.** Hannover: Manson, p.31-59, 2001.
- POURCELOT, L. Application clinique de léxamen Doppler transcutane. In: PERONNEAU, P. **Velocimetrie ultrasonore Doppler**. Paris: Inserm, p. 213-240, 1974.
- POZOR, M.A. Diagnostic applications of ultrasonography to stallion’s reproductive tract. **Theriogenology**, v. 64, p. 505–509, 2005a.
- POZOR, M.A. How to evaluate a Stallion’s Scrotum Using Ultrassound. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP** – Seatle, Washington, USA, 2005b.
- POZOR, M.A. Evaluation of Testicular Vasculature in Stallions. **Clinical Techniques in Equine Pract**, v.6, p.271- 277, 2007.
- POZOR, M.A. MACPHERSON, M.L., TROEDSON, M.H.T., VERSTEGEN,J. Effect of a single administration of human chorionic gonadotropin (hCG) on testicular blood flow in stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 94. P. 146-147, 2006(a).
- POZOR, M.A.; MACPHERSON, M.L.; TROEDSON, M.H.T.; VERSTEGEN, J. Effect of seasonality on testicular blood flow in mature stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 144–145, 2006(b).
- POZOR, M.A.; MCDONNEL, S.M. Doppler ultrassound measures of testicular blood flow in stallions. **Theriogenology**, v. 58, n. 2, p. 437 – 440. 2002.
- POZOR, M.A.; MCDONNEL, S.M. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. **Theriogenology**, v.61, p.799–810, 2004.

POZOR, M.A.; NOLIN, M.; ROSER, J.; RUNYON, S.; MACPHERSON, M.L.; KELLEMAN, A. Doppler indices of vascular impedance as indicators of testicular dysfunction in stallions. **Journal of Equine Veterinary Science** , v.34 , Issue 1 ,p. 38 – 39, 2014.

RIESEN, S.; SCHIMID, V.; GASCHEN, L.; BUSATO, A; LANG, J. Doppler measurement of splanchnic blood flow during digestion in unsedated normal dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v. 43, n. 6, p. 554-560, 2002.

RIFKIN, M.D.; NEEDLEMAN, L.; PASTO, M.; KURTZ, A.B.; FOY, P.M.; MCGLYNN, E.; CANINO, C.; BALTAROWICH, O.H.; PENNELL, R.G.; GOLDBERG, B.B. Evaluation of renal transplant rejection by duplex Doppler examination: value of the resistive index. *AJR*, v.148,p.759, 1987.

ROBALO SILVA, J.; AGRÍCOLA, R.; BARBOSA, M.; LOPES da COSTA, L. Variação sazonal do volume testicular, da produção e qualidade do sêmen e do comportamento sexual de cavalos Lusitanos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, vol. 102, p. 119-125. 2007.

ROSENFELD, C.R.; ROY, T.; COX, B.E. Mechanisms modulating estrogen-induced uterine vasodilation. **Vascul Pharmacol**, v. 38, p. 115–125, 2002.

ROSER, J.F. Endocrine profiles in fertile, subfertile, and infertile stallions: testicular response to human chorionic gonadotropin in infertile stallions. **Biol Reprod Mono.** v.1,p. 661–669,1995.

ROSER, J.F. Reproductive endocrinology of the stallion. In: SAMPER, J.C. (Ed). **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: WB Saunders Company, p.41-52. 2000.

ROSER, J. F. Reproductive endocrinology of the stallion. In J. C. Samper (Ed.), **Equine breeding management and artificial insemination**, Missouri: Saunders ELSEVIER, 2nd ed., p. 17-31, 2009.

ROSER, J.F., McCUE, P., HOYE, E. Inhibin activity in the mare and stallion. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.11, p.87-100, 1994.

RUA, M.A.S.; QUIRINO, C.R.; BARTHOLAZZI JUNIOR, A.; NASCIMENTO, P.S.; RIBEIRO, M.S.; VEGA, W.H.O.; BARRETO, M.A.P. Repetibilidade das características seminais, espermáticas e fertilidade de garanhões. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Universidade Federal Rural de Pernambuco- Pernambuco, Brasil v. 11, núm. 2, pp. 124-131, 2016.

RUBENS, D.J.; BHATT, S.; NEDELKA, S.; CULLINAN, J.: Doppler artifacts and pitfalls. **Ultrasound Clinics.**, v. 1, p 79-109, 2006.

SAMPER, J. C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2009.

SETCHELL, B.P.; SHARPE, R.M. Effect of injected human chorionic gonadotrophin on capillary permeability, extracellular fluid volume and the flow of lymph and blood in the testes of rats. **J Endocrinol**, v. 91, p. 245–254, 1981.

SHARP, D.C., CLEAVER, B.D., DAVIS, S.D. Photoperiod. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Fabiger, p.179-85, 1993.

SIEME, H.; KATILA, T.; KLUG, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 769-784, 2004.

SIEMS, J. Diagnostic ultrasound. In: HAN, C.M.; HURD, C.D. **Practical diagnostic imaging**. New York: Mosby, chap.9, p. 228-270, 2000.

SIGEL, B. A brief history of Doppler ultrasound in the diagnosis of peripheral vascular disease. **Ultrasound in Medicine e Biology**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 169- 176, 1998.

SIGNORET, J. P.; BALTHAZART, J. Sexual Behaviour. In: **Reproduction in Mammals and Man**: Thibault, C., Levasseur, M.C., Hunter, R. H.F. (eds.) Edition Marketing, Paris, France, 1993.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology Reproduction**, v. 72, p. 755–761, 2005.

SILVA, L. D. M.; SOUZA, M. B.; BARBOSA, C. C.; PEREIRA, B. S.; MONTEIRO, C. L. B.; FREITAS, L. A. Ultrassonografia bidimensional e Doppler para avaliação do trato reprodutor de pequenos animais, **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 22, n. 1, p. 339-353, 2012.

SKINNER E.L., BOWEN J. Puberty in the Welsh stallion. **Journal of Reproduction and Fertility**; v.16; p.133-135.1968.

SZATMÁRI, V. SÓTONYI, P.; VÖRÖS, K. Normal duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v.42, n.2, p.93-107, 2001.

STENMAN, U.H.; TIITINEN, A.; ALFTHAN, H.; VALMU, L. The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG. **Hum Reprod Update**, v.12, p.769–784, 2006.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F.; GIROUARD, J.; FRENETTE, G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cell Mol Dis**, v.35, p.1-10, 2005.

TARHAN, S.; GUMUS, B.; GUNDUZ, I.; AYYILDIZ, V.; GOKTAN, C. Effect of varicocele on testicular artery blood flow in men—color Doppler investigation. **Scand J Urol Nephrol.**, v.37, p. 38–42, 2003;

, L., ST. GEORGE, R.L., GARZA, F. Concentrations of prolactin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in pituitary and serum of horses: effect of Sex, season and reproductive state. **J. Anim. Sci.**, v.63, p.854-60, 1986.

THOMPSON, D. L., JR., B. W. PICKETT, W. E. BERNDTSON, J. L. VOSS AND T. M. NETT. Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behavior and concentration of LH and testosterone in serum. **Journal of Animal Science**, p.44:656.1977.

THOMPSON, D.L., PICKETT, B.W., NETT, T.M. Effect of season and artificial photoperiod on levels of estradiol-17 β and estrone in blood serum of stallions. **J. Anim. Sci.**, v.47, p.184-92, 1978.

TILLBROOK, A.J., CLARKE, I.J. Negative feedback regulation of the secretion and action of gonadotropin-releasing hormone in males. **Biol. Reprod.**, v.64, p.735-42, 2001.

TUREK, F.W., VAN CAUTER, E. Rhythms in reproduction. In: KNOBILL, E., NEILL, J.D. (Eds) **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press., p.519-22, 1994.

TURNER, R.M. Ultrasonography of the genital tract of the stallion. In: Reef VB (ed). **Equine Diagnostic Ultrasound**. WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, p.446-479, 1998.

TURNER, J. W.; KIRKPATRICK, J. F. Androgens, behaviour and fertility control in feral stallions. **J. Reprod. Fertil.** (Suppl. 32), p.79-87, 1982.

VAITKUS, P. J.; COBBOLD, R. S. A comparative study and assessment of Doppler ultrasound spectral estimation techniques part I: estimation methods. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 661-672, 1988.

VAN DER HOLST, W. A study of morphology of stallion semen during the breeding and non-breeding seasons. **J. Reprod. Fertil.** Suppl., n.23, p.87-9, 1975.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L. et al. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, vol.29, p.1043-1055, 1988.

VERMILLON, R.P. Basic physical principles. In: SNIDER, A.R. et al. **Echocardiography in pediatric heart disease**. 2.ed. Missouri: Mosby, cap.1, p.1-10, 1997.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Woburn, vol. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

WARAN, N.K. Can studies of feral horse behaviour be used for assessing domestic horse welfare? **Equine Vet. J.** v. 29(4), p.249-251, 1997.

WEBER, J.A.; WOODS, G.L. Transrectal ultrasonography for the evaluation of stallion accessory sex glands. **Vet Clin North Am Equine Pract.**, v.8, p183-190, 1993.

WIELGOS, M.; BABLOK, L.; FRACKI, S.; MARIANOWSKI, L. Doppler flow measurements in testicular artery of aging males. *Gin Pol*; v.69(6), p.537-40, 1998.

WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. Ação hormonal de esteróides. In: CLARK, J.H.; SCHRADER, W.T.; O'MALLEY, B.W. Williams: **Tratado de Endocrinologia**. 7 ed. São Paulo: Manole, v.1, cap. 3, p. 42, 1988.

WOOD, R.I., EBLING, F.J., I'ÄNSON, H., FOSTER, D.L. Timing of neuroendocrine sexual maturity in the male lamb by photoperiod. **Biol.Reprod.**, v.45, p.82-88, 1991.

YANIK, L. The basics of Doppler ultrasonography. **Veterinary Medicine**, v. 3, p. 388-400, 2002.

ZIRKIN, B.R., AWONIYI, C., GRISWOLD, M.D., RUSSEL, L.D., SHARPE, R. Is the FSH required for adult spermatogenesis ? **J. Androl.**, v.15, p.273-76, 1994.