

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Estudo preliminar para a caracterização de sémen Equino da
Raça Puro Sangue Lusitano**

Análise do processamento de criopreservação

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Maria Filipa Caeiro De Castro Alexandre

Orientadora: Prof^a Dr.^a Ana Celeste Andrade Martins de Carvalho Bessa



Vila Real, 2017

Os resultados deste trabalho encontram-se publicados:

| Semen cryopreservation in Puro Sangue Lusitano horses

M Alexandre¹; A Costa²; M Bliebernicht²; D Assunção²;
L Cardoso¹; A Martins-Bessa¹

¹Department of Veterinary Sciences, School of Agrarian and Veterinary Sciences, University of Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal; ²Embriovet® Prestação de Serviços Veterinários Lda, Salvaterra de Magos, Portugal

Reproduction in Domestic Animals 2016; 51 (S2): 66-67

Agradecimentos

Quero agradecer inicialmente à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro a qual nunca pensei frequentar e tendo sido a minha última opção para a candidatura acabou por me proporcionar 6 anos que tanto pelas dificuldades como pelas felicidades me fizeram a pessoa que sou hoje, com a profissão e o cão (Gambit fiel companheiro) que desde os 4 anos de idade sonhei ter, e onde conheci as pessoas mais bonitas e especiais que hoje são os meus amigos para a vida. Pelos Professores que fizeram parte da minha formação, deixo esta grande instituição com um grande Obrigada, por tudo o que me proporcionou.

À professora Ana Celeste Bessa pela orientação e paciência nesta longa jornada. E ao professor Lucas que nos acompanhou desde o início desta jornada e sem o qual não teria sido possível finalizá-la.

Aos meus pais que em todas as fases passadas da minha vida me moldaram na pessoa que hoje sou. Aos meus avós (especialmente a elas) que ainda me acompanham e sempre me apoiaram, em diferentes medidas e que me sinto feliz e agradecida por os ter.

Não poderia deixar de agradecer às pessoas que moldaram e me ajudaram nas minhas escolhas e caminho profissional: ao meu amigo Diogo Assunção que sempre me acompanhou nos receios, escolhas e expectativas porque foste o primeiro e serás sempre, apesar da distância e do tempo. A toda a equipa da Embriovet, à Dr^a. Ana Costa que foi a primeira ainda longe do final do curso que me “aturou” as primeiras asneiras e me ensinou a querer saber sempre as respostas às perguntas e a querer sempre estudar mais; ao Dr. Miguel Bliebernicht que sempre me repreendeu e ajudou quando precisei e também teve a palavra certa em momentos certos; Dr^a. Inês Ferreira que me fez sorrir quando eu precisava e se riu de mim fazendo-me acreditar em mim própria; à Dr^a. Mariana Correia colega da UTAD que escolheu o mesmo caminho que eu e nunca mostrou rivalidades e ao invés disso sempre me apoiou e ajudou como pouquíssimos teriam feito obrigado a todos.

À Dr^a. Sue McDonnell demasiado nova para minha avó e demasiado velha para minha mãe, (nas palavras dela) que me deu todas as oportunidades que sonhei e mais ainda, obrigada por tudo o que me proporcionou e ensinou, mas especialmente por me ter ajudado na mudança de estudante, para Médica Veterinária e me ter feito crescer como pessoa, nunca lhe poderei nem conseguirei agradecer tudo o que me deu. À Dr^a. Brett Dolente que me apoiou e foi a minha maior força nos meses árduos de estágio americano, deu-me teto, conselhos

para a vida e amizade, ajudou-me em tudo o que precisei e que será uma inspiração para toda a minha vida.

Agradecimento mais emotivo à minha irmã de coração Raquel Paixão que me acompanha desde que me lembro de ser pessoa e que sempre teve presente, apesar da distância a que este curso nos deixou, serás sempre parte de mim e eu de ti, sabemos nos de cor onde quer que a vida nos leve. Nunca serei capaz de te agradecer tudo o que fazes por mim (especialmente na fase de redação desta tese), irei sempre precisar de ti na minha vida. Contigo trouxeste-me a Andreia Duarte fizeste a mulher, és mais velha e madura que nós todas juntas. Muitas vezes obrigado por teres crescido assim, para me conseguires suportar também me terás sempre.

Ao meu amigo João Calado pela ajuda na formatação desta tese, mas também por todo o apoio na reta final deste curso.

Tenho de deixar um agradecimento a todas as pessoas que a Medicina Veterinária me trouxe que nunca esquecerei não esquecendo nenhuma, algumas destacaram-se durante este anos às quais tenho de deixar um agradecimento especial:

Diana Fernandes foi este curso que nos juntou, obrigado por tudo todas as lágrimas, sorrisos e discussões valeram a pena, sem ti não tinha sido capaz, seja qual for o nosso caminho fazes parte de mim, vais ter-me por todo o sempre.

Silvana Machado como sempre as palavras custam, mas obrigado pelos “abre olhos” e frontalidade eu sei que sempre que precisar estarás do outro lado.

Mariana Rodrigues, minha afilhada de praxe foste tu que me escolheste e assim ficaste, és a minha pequena mesmo quando cresceres, apoias-me e eu preciso de ti em igual medida do que eu te apoio a ti. A ti e á tua família que sempre me recebeu como mais uma filha, um especial obrigado.

Tenho de agradecer aos amigos que a cidade de Vila Real de Trás-os-Montes me trouxe os amigos da vida convosco partilhei a minha vida e ficaram no meu melhor e nos meus piores momentos e nunca me deixaram. Estiveram comigo nas alegrias, mas foi nas tristezas que permaneceram este agradecimento é para vocês, Miguel Machado Lima, Pedro Pimenta e Raul Silva irei guardar-vos para sempre comigo.

Resumo

A raça Puro Sangue Lusitano (PSL) é uma raça equina autóctone portuguesa sobre a qual não existe muita informação relativamente ao modo como o sémen se comporta e suporta as técnicas de criopreservação. Assim, constituíram objetivos deste trabalho (utilizando semén proveniente de animais desta raça) se existiam diferenças entre diferentes métodos: • de quantificação da concentração espermática (Spermacue, Minitube® vs. Câmara de Neubauer); • de aferição da mobilidade espermática (avaliação subjetiva da mobilidade vs. avaliação com recurso ao sistema CASA); • de criopreservação (manual e com recurso a uma máquina de criopreservação automática) e protocolos de centrifugação do sémen. Avaliou-se ainda o número total de espermatozóides (spz) e mobilidade espermática durante a estação reprodutiva e fora dela. Foram avaliados 327 ejaculados de 29 garanhões PSL, tendo-se concluído que a variação do nº total de spz durante a época reprodutiva e fora dela apresenta diferenças significativas ($p=0,006$) e a mobilidade total não se encontraram diferenças significativas ($p < 0,001$) e na mobilidade progressiva foram encontradas diferenças significativas no sémen fresco e centrifugado ($p=0,007$). Foram comparados 2 protocolos de centrifugação: I-600 x g durante 10 a 15 min; II- 2000 e 2400 x g durante cinco minutos as percentagens de perda para o número total de espermatozóides foram 41% e 42% respetivamente. Relativamente à mobilidade total existiam diferenças significativas entre a categoria I e II no sémen criopreservado enquanto que para a mobilidade progressiva existiam diferenças significativas entre as categorias I e II para o sémen fresco e centrifugado. Ao comparar criopreservação manual e com recurso a uma máquina de criopreservação automática verificou-se que existiam diferenças significativa para a mobilidade total e progressiva enquanto que em relação ao número total de spz não existiam diferenças significativas $p=0,278$. Ao comparar o Spermacue, Minitube® vs. Câmara de Neubauer verificou-se que existiam diferenças significativas. Ao comparar avaliação subjetiva da mobilidade vs. avaliação com recurso ao sistema CASA verificou-se que existiam diferenças significativas na mobilidade total e progressiva. Verificou-se também que existiam correlações negativas e significativas entre a concentração espermática e a mobilidade total do sémen criopreservado ($Rho = - 0,239$; $p = 0,02$) e também com a mobilidade progressiva no sémen criopreservado ($Rho = - 0,216$; $p = 0,03$).

Abstract

The Lusitano breed is a Portuguese native breed and there aren't a lot of studies performed about how the semen behaves and supports cryopreservation techniques. It is known that we need to collect more knowledge about equine spermatozoa (spz) in relation how semen behavior during cryopreservation. For this reason all the information collect is important in order to characterize semen behavior face to cryopreservation so that we can better predict fertility. The aim of this study was to evaluate only on Lusitano breed animals if there were differences on: sperm concentration measured with Spermacue, Minitube ® vs. Neubauer chamber); sperm motility measured subjectively vs. CASA system; cryopreservation method (programmable freezing machine vs. liquid nitrogen vapour); centrifugation protocols and semen parameters during or out of breeding season. During the study 327 samples of 29 stallions were evaluated and it was concluded that: the total number of spz during and out the breeding season showed significant differences ($p = 0.006$), total motility showed no significant differences ($p < 0.001$) and progressive motility showed significant differences when fresh and centrifuged were compared ($p = 0.007$). Three centrifugation protocols were compared: I-600 x g for 10 to 15 min; II-1800-1960 x g for 5 minutes. The loss percentage on the total number of spz were 41% and 42% respectively. For the total motility significant differences were found between the categories I and II in cryopreserved semen while for progressive motility significant differences were found between the category I and II in centrifuged and fresh semen. When programmable freezing machine and liquid nitrogen vapour cryopreservation were compared significant differences were found for total and progressive motility in spite of when the total number of spz was considered no significant differences were found ($p = 0.278$). When Spermacue, Minitube ® and Neubauer Chamber were compared significant differences were found. When comparing subjective assessment of motility with the assessment using the CASA system significant differences were found in total and progressive motility. It was also found there were significant negative correlations between and sperm concentration and total motility on cryopreserved semen ($Rho = -0.239$; $p = 0.02$) and also with the progressive motility on cryopreserved semen ($Rho = -0.216$; $p = 0.03$).

Índice Geral

Agradecimentos	III
Resumo.....	V
Abstract.....	VII
Índice Geral.....	IX
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Tabelas.....	XII
Lista de abreviaturas	XIII
I. Introdução.....	1
II. Revisão bibliográfica.....	5
Sémen equino	5
Avaliação do garanhão / Avaliação do sémen / Exame de fertilidade potencial	10
Recolha do sémen	13
Concentração espermática.....	17
Mobilidade espermática.....	20
Morfologia espermática	23
Processamento do sémen para criopreservação.....	25
Descongelação e avaliação final do sémen.....	37
III. Objetivos	39
IV. Materiais e Métodos	41
Recolha de Sémen.....	42
Avaliação de sémen fresco	43
Spermacue.....	46
Câmara de Neubauer	46
Diluição de sémen.....	49
Centrifugação	50
Criopreservação	52

Avaliação do sémen criopreservado.....	54
Análise estatística.....	55
V. Resultados.....	57
1) Sazonalidade	57
2) Centrifugação.....	59
3) Métodos de aferição da concentração espermática.....	60
4) Método de criopreservação	62
5) Mobilidade espermática.....	64
6) Impacto do Protocolo de Centrifugação.....	66
7) Impacto do método de aferição da mobilidade espermática na aferição da mesma	70
8) Impacto do método de criopreservação na mobilidade espermática	73
9) Correlações entre a concentração espermática a mobilidade espermática total e progressiva.....	75
VI. Discussão	77
1. Impacto da Sazonalidade	77
2. Protocolos de Centrifugação	78
3. Método de criopreservação	81
4. Métodos de aferição da concentração espermática	82
5. Métodos de aferição da mobilidade.....	83
6. Correlações entre a concentração espermática a mobilidade espermática total e progressiva.....	84
VII. Conclusões	85
VIII. Bibliografia	89

Índice de Figuras

Figura 1 - Vagina Artificial Colorado, (Hoogewijs, 2010).	14
Figura 2 - Vagina Artificial Missouri, (Hoogewijs, 2010).	14
Figura 3 - Vagina Artificial Hannover,(Hoogewijs, 2010).	15
Figura 4 - Vagina Artificial Cracóvia, (Hoogewijs, 2010)	15
Figura 5 - Spremacue®,na clínica Embriovet	18
Figura 6 - Esquema hemocitómetro (World Health Organization, 2010)	19
Figura 7 – CASA (clínica Embriovet®).	22
Figura 8 - Representação esquemática dos espermatozóides após centrifugação com recurso a um colóide,(Hoogewijs, 2010)	31
Figura 9: Manequim de recolha, Embriovet Laboratório A.	41
Figura 10 – Vários modelos de vaginas artificiais, Embriovet.	42
Figura 11- Microcuvete do Spemacue®, Embriovet	46
Figura 12 - L Shape, (World Health Organization, 2010) .	48
Figura 13 - Centrifuga NF 400 da nüve, Embriovet.	50
Figura 14 – Esquema do estudo.	51
Figura 15 - Máquina de Criopreservação Automática, (Embriovet).	53
Figura 16 - Número total de espermatozóides Estação/ Contra-Estação.	57
Figura 17 - Percentagem de perda de espermatozóides consoante a época reprodutiva. _	58
Figura 18 –Número total de espermatozóides distribuídas por categoria de centrifugação.	59
Figura 19 - Percentagem de perda de espermatozóides por categoria de centrifugação.. _	60
Figura 20 - Diferenças da concentração espermática consoante o método de aferição da mesma.	61
Figura 21 - Diferenças do número total de espermatozóides consoante o método de aferição da concentração espermática	61
Figura 22 - Número total de espermatozóides consoante o método de congelamento. ____	62
Figura 23 - Percentagem de perda de espermatozóides consoante o método de congelamento.	63
Figura 24 -Mobilidade Total consoante a sazonalidade.	64
Figura 25 -Mobilidade progressiva consoante a sazonalidade.	65
Figura 26 - Mobilidade Total consoante a categoria de centrifugação.	67
Figura 27 -Mobilidade Progressiva consoante a categoria de centrifugação.	68
Figura 28 -Mobilidade Total consoante o método de aferição da mesma.	71
Figura 29 - Mobilidade espermática progressiva consoante o método de aferição da mesma.	72

Figura 30 - Mobilidade Total do sémen criopreservado consoante o método de criopreservação.	74
Figura 31 - Mobilidade Progressiva do sémen criopreservado consoante o método de criopreservação.	75

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição de diferentes diluidores para centrifugação, preservação e criopreservação (Hoogewijs, 2010).	2
Tabela 2 - Síntese de protocolos de centrifugação de autores diversos	28
Tabela 3 - Resumo de protocolos de criopreservação (Sieme, 2008)	35/36
Tabela 4 - Diferença aceitável entre duas contagens consecutivas Adaptado- World Health Organization, 2010	49
Tabela 5 - Distribuição do número total de espermatozóides da amostra	58
Tabela 6 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática total	66
Tabela 6 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática progressiva	68
Tabela 7 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática total	70
Tabela 8 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática progressiva	71
Tabela 9 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática total	73
Tabela 10 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática progressiva.	74

Lista de abreviaturas

CASA: Computer-assisted sperm analysis

CTc: Concentração do sémen criopreservado

CTf: Concentração do sémen fresco

DIC : *differential interference contrast microscopy* – microscopia de contraste diferencial

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FSH: Hormona folículo estimulante

GnRH: Hormona libertadora de gonodotrofina

IA: inseminação artificial

IGF-I: insulin like growth factor

LH: Hormona Luteinizante

Ntf: Número de espermatozóides total no sémen fresco

PSL : Raça Puro Sangue Lusitano

ROS: Reactive Oxygen Species

Rpm: Rotações por minuto

SFT: Society for Theriogenology:

Spz: espermatozoides

VA: Vagina Artificial

Vi: Volume espermático inicial

Vf: Volume espermático final

I. Introdução

A reprodução assistida em equinos tem atualmente grande importância assim sendo nos últimos 20 anos o número de éguas inseminadas com sémen congelado aumentou para um nível que torna a utilização de sémen congelado um procedimento de rotina (McKinnon, 2011). Tendo sido este aumento motivado pela liberdade que a utilização de sémen criopreservado permite realizar a inseminação artificial descartando as restrições impostas pelo *timing*, agenda e localização da recolha do sémen (Blottner et al., 2001).

Existe uma procura crescente por sémen congelado que se deve, principalmente ao carácter internacional da produção de equinos para fins desportivos (Aurich, 2006). Aquando de escolha dos cruzamentos os fatores que se têm em consideração são: o *pedigree* e a performance. Uma vez que o objetivo é alcançar um progresso genético assim poucas vezes é tida em conta a eficiência reprodutiva dos animais (Barbacini, 2013).

Um fator importante a considerar é que existem garanhões que apresentam uma fertilidade normal considerando cobertura natural ou inseminação artificial utilizando sémen fresco mas cuja fertilidade decresce consideravelmente quando se considera o sémen refrigerado ou criopreservado. Deste modo torna-se extremamente difícil avaliar com fiabilidade a fertilidade dos garanhões utilizando dados como a taxa de gestação no primeiro ciclo, a cada ciclo da época reprodutiva (Barbacini, 2013).

A otimização de resultados atualmente permite uma taxa de gestação por ciclo que ronda os 45%, utilizando sémen cuja motilidade progressiva é superior ou igual a 35% (McKinnon O. A. et al. 2011).

Contudo podemos verificar uma diminuição da fertilidade, em diferentes espécies, quando se utiliza sémen congelado comparando com a utilização de sémen refrigerado. Por isso os esforços atuais prendem-se com o desenvolvimento de novos métodos de avaliação do processo de criopreservação do sémen de modo a obter a melhor qualidade possível (Digrassie, W. A., 2000).

Para a obtenção de uma qualidade ótima é importante ressaltar adoção de procedimentos durante a criopreservação que permitam uma qualidade ótima do sémen. Assim é necessário fazer um controle de qualidade regular durante cada etapa da criopreservação (Barbacini, 2013).

A Raça Puro Sangue Lusitano (PSL) é a principal raça portuguesa autóctone de equinos portuguesa e sobre esta não existem muitos estudos acerca da sua eficiência reprodutiva da mesma aquando da utilização de sémen criopreservado. É de referir num estudo só com animais PSL verificou-se que no final de uma época reprodutiva a percentagem de éguas gestantes foi de 90%, dentro dos valores esperados (71% - 96%) destas a taxa de fertilidade em éguas cobertas por cobrição natural (n=14) foi de 78,6% e por IA (n=36) era de 94,4%. Nas éguas inseminadas a taxa de fertilidade com sémen fresco (n=16) foi de 93,8%, com sémen refrigerado (n=19) foi de 94,7% e com sémen congelado (n=1) foi de 100%. Neste estudo verificou-se também que não há relação estatística entre a idade das éguas e a taxa de gestação, contrariamente ao que é referido na bibliografia, o que se deverá provavelmente ao tamanho da amostra (n=50) (Fradinho et al., 2013). Por isso, é necessário a realização de mais estudos, com mais indivíduos de modo a ser feita uma melhor caracterização das características reprodutivas desta raça.

Durante o meu período de estágio tive a oportunidade de observar recolhas e posterior congelação de sémen em vários Centros reprodutivos, Hospitais e Clínicas na Europa e nos Estados Unidos da América e daí surgiu o interesse em averiguar qual seriam as alterações do sémen após todo o processo de criopreservação, uma vez que em cada local existiam procedimentos e protocolos diferentes e se estes estariam de acordo com os que a bibliografia atual nos apresenta.

Deste modo iniciei uma recolha de dados na Clínica Embriovet Prestação de serviços veterinários, Lda. onde realizei Estágios durante os anos de 2013 e 2014; com o objetivo de fazer uma avaliação da eficiência do processo de congelação usado.

Os dados obtidos remontam desde o ano de 2008 até 2014 em recolhas efetuadas por duas equipas distintas: uma na Clínica Embriovet em Muge, Portugal; e a segunda no centro reprodutivo do Haras de la Gesse em Bologne-sur-Gesse, França, onde a mesma empresa presta serviços.

O meu estágio curricular foi efetuado em vários locais durante o ano letivo de 2014/2015, estes foram:

- Centro Reprodutivo do Haras de la Gesse (Boulogne-sur-Gesse, França), iniciado em Julho até Setembro de 2014. Durante este período desenvolvi atividades no âmbito de clínica de reprodução em equinos. Assim tive a oportunidade de observar recolhas e

processamento de doses e todo o processo para congelamento de sémen; acompanhamento de ciclo éstrico através ecografias seriadas; sincronização do ciclo éstrico e indução da ovulação; culturas e lavagens uterinas; inseminação artificial com sémen fresco, refrigerado e congelado; transferência de embriões.

- Embriovet (Muge, Portugal), iniciado em Novembro até dia 23 de Dezembro 2014. Durante este período desenvolvi atividades no âmbito de clinica de reprodução e serviço de ambulatório/medicina interna em equinos assim como medicina preventiva e sanidade em Bovinos. No âmbito da reprodução de equino de destacar a realização de recolha de sémen espermogramas e processo de avaliação do sémen para seu congelamento e congelação de sémen.
- Horses Therapy Services (Lisboa, Portugal), iniciado em Janeiro até Fevereiro de 2015. Durante este período desenvolvi atividades no âmbito de medicina desportiva e medicina interna de equinos.
- Rood & Riddle Equine Hospital (Lexington, KY Estados Unidos da América) iniciado em 1 Março até dia 22 de Março de 2015. Durante este período desenvolvi atividades no âmbito serviço ambulatório, medicina interna e reprodução de equinos. No âmbito da reprodução de equino de destacar a realização de recolha e congelação de sémen; acompanhamento de ciclo éstrico através ecografias seriadas; culturas e lavagens uterinas; sincronização dos ciclos e indução da ovulação; aspiração ecoguiada de ovócitos; distócias e cesarianas; acompanhamento patologias reprodutivas como endometrites; ovariectomias para remoção de tumor; endoscopia e trato reprodutor masculino com remoção de possível carcinoma de células escamosas.
- Hagyard Equine Medical Institute (Lexington, KY Estados Unidos da América) iniciado a 23 de Março até 12 Abril de 2015. Durante este período desenvolvi atividades no âmbito serviço ambulatório, cirurgia e reprodução de equinos. No âmbito da reprodução de equino de destacar a realização de recolha de sémen; acompanhamento patologias reprodutivas como endometrites recorrentes e seu tratamento e acupuntura (acompanhamento de várias sessões); endoscopias uterinas; remoção de quistos endometriais através de laser; lavagem de oviductos; distócias e cesarianas; transferência de embriões.

- Lexington Equine Surgery and Sports Medicine (Lexington, KY Estados Unidos da América) iniciado a 15 de Abril até 29 de Abril. Durante este período desenvolvi atividades no âmbito de cirurgia e medicina desportiva de equinos.

- University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine participação como Havemeyer Summer Veterinary Research Fellow at the Havemeyer Equine Behavior Lab at New Bolton Center (Kennett Square, PA Estados Unidos da América) iniciado a 1 de Maio até 12 de Julho. Durante este período desenvolvi atividades no âmbito de reprodução e comportamento de equinos assim como investigação em comportamento de equinos. No âmbito da reprodução e comportamento de equinos são de destacar as seguintes actividades desenvolvidas: participação bi-semanal nas rondas hospitalares supervisionadas por 4 diplomados acreditados pela *American College of Theriogenology* (ACT). Observação e participação nas aulas com os garanhões e éguas de ensino. Assistência nas aulas e programa de ensino comportamental relacionado com abordagem inicial a um equino em ambiente hospitalar, exame físico, medicações e tratamentos para os alunos a realizar as rotações de reprodução. Participação e assistência em casos de comportamento tendo ficado como encarregue de um caso próprio. Treino introdutório para realizar avaliação clínica de comportamento através de vídeo. No âmbito da investigação, desenho e recolha de dados para um projeto de investigação próprio com tutoria e formação contínua acerca de métodos de pesquisa de comportamento. Assistência na sanidade anual e recolha de dados (como sangue, pêlos para mapeamento genético, fotografias), resenhas gráficos de poldros numa manada de póneis semi-selvagens.

II. Revisão bibliográfica

Sémen equino

O sémen é o fluido expelido através da uretra aquando da ejaculação; apresentando em condições normais um pH neutro que pode variar entre 6,2 e 7,8 e osmolaridade cerca de 300 a 334 mOsm/Kg. Este é composto por duas partes: figurada constituída pelos espermatozoides que são produzidos nos testículos e maturados no epidídimo (considerando a sua maturação); e uma líquida, isto é, o plasma seminal que é proveniente da atividade das vias espermáticas e glândulas anexas (ampola, glândulas seminais, bulbo-uretral e próstata) (McKinnon, et al. 2011).

Características do sémen equino

No garanhão o sémen é expelido por múltiplas ondas ejaculatórias, podendo-se distinguir física e quimicamente cerca de 5 a 10 frações num período compreendido entre 8 a 10 segundos. A primeira fração pode-se intitular de pré-espermática, é expelida antes das primeiras contrações penil-uretrais e possui uma aparência aquosa. Esta é rica em cloro e ácido láctico (12mg/100ml) e aparentemente resulta da atividade das glândulas bulbo-uretrais. A segunda fração do sémen, é constituída por fluído libertado em vários jatos, esta é rica em espermatozoides, ergotioneína (procedente da ampola) e glicerilfosforilcolina (procedente do epidídimo). A atividade da próstata e da ampola começa antes da ejaculação e mantém-se até às primeiras contrações penil-uretrais deste modo a maioria das secreções que constituem a segunda fração são oriundas destas glândulas

O plasma seminal contém vários tipos de vesículas de entre as quais se destacam os proteossomas (ricos em colesterol proteínas e cálcio), estes são produzidos nas células epiteliais prostáticas. Estes podem ser recrutados e fundir-se com os espermatozoides como respostas à libertação de progesterona libertada pelas células do *cumulus* (que constituem a granulosa e se diferenciam aquando da formação dos antros foliculares) e que por sua vez libertam cálcio como um sinalizador que permite aos espermatozoides ganhar hipermotilidade e sofrer reação acrossómica (Aallberts, M., et al. 2013).

No sémen humano a pensa-se que função dos proteossomas prende-se com a sua interação com os espermatozoides, protegendo-os das condições hipotónicas e acídicas que encontram

no ambiente vaginal. Os prostasomas equinos possuem menor conteúdo em ácidos gordos e por isso apresentam maior fluidez e são em menor quantidade (comparativamente com o sémen humano). Teoriza-se que estas diferenças se devam a que a deposição do sémen nas vias genitais da égua ocorrer no útero (enquanto nos humanos ocorre no fundo vaginal) e os spz rapidamente deixam para trás o plasma seminal no seu trajeto pelas trompas uterinas (Gamboa, 2011).

É importante referir que na espécie equina as secreções provenientes da ampola não contêm frutose. O sémen equino possui uma concentração muito baixa em frutose (0,02 mg/ml) quando comparado com outras espécies como é o caso dos touros ou carneiros; possuindo uma concentração mais elevada de glicose (0,82 mg/ml) (McKinnon O. A., et. al, 2011).

O ejaculado equino possui uma porção gelatinosa que aparentemente é produzida pelas glândulas vesiculares e uma vez que a atividade destas é dependente da testosterona, pode-se afirmar que a produção de gel aumenta durante a época reprodutiva. Do mesmo modo e pelo mesmo motivo varia o volume do plasma seminal. A sua composição varia consoante o animal e ejaculados, idade, raça e frequência das colheitas (Gamboa, 2011).

Sazonalidade

A espécie equina caracteriza-se por uma reprodução sazonal (mais ou menos marcada consoante a localização geográfica) e apesar de no garanhão este processo não ser ainda completamente conhecido, sabemos que o controlo endócrino do sistema reprodutivo é influenciado por um mecanismo de *feedback* onde os estímulos luminosos recebidos pelas células ganglionares da retina que contêm o fotopigmento melanopsina. Estes são enviados via nervo ótico e núcleo supraquiasmático à glândula pineal consequentemente influenciando a secreção de melatonina (esta é suprimida durante os períodos de luminosidade) (Silva, 2010).

No garanhão não ocorre cessação da espermatogénese durante a contra-estação, porém existem variações hormonais e nas características seminais e alguns autores referem alterações no comportamento sexual. Alguns autores sugerem que com o avançar da época reprodutiva os garanhões se tornam refratários à influência da melatonina enquanto outros demonstram evidências que os poldros são condicionados e desenvolvem um padrão de secreção de melatonina numa fase precoce da vida (7-11 semanas) (Gamboa, 2011).

Na espécie equina durante a época do ano em que o fotoperíodo é mais prolongado as concentrações séricas de FSH, LH, testosterona e prolactina são maiores assim como o peso testicular a concentração de testosterona intra-testicular o número de células de Sertoli e Leydig, número de espermatogónias e DSO (*Daily Sperm Output- DSO*) (Dickson D. V., et al., 2011).

Endocrinologia & Espermatogénese

O hipotálamo reconhece as diferentes dinâmicas da melatonina, desconhecendo-se como é descodificada a nível celular de forma a regular a função reprodutiva, sabe-se que atua sobre os neurónios dopaminérgicos, serotoninérgicos e aminoacidológicos e estes por sua vez irão atuar sobre os neurónios GnRH. (Silva, 2010)

Facto é que a melatonina afeta a secreção de GnRH por parte do hipotálamo através de um mecanismo de feedback negativo. A GnRH induzirá então a produção de gonodropinas (Hormona folículo estimulante- FSH, Hormona Luteinizante – LH) por parte do lobo anterior da hipófise que são lançadas na corrente sanguínea de modo a atuarem sobre o testículo. (Gamboa, 2011)

A produção de espermatozóides ou espermatogénese ocorre nos testículos, particularmente no interior dos túbulos seminíferos que por si só representam 72% do parênquima testicular. Estes dispõem-se em lamelas, dando origem a lóbulos coniformes que divergem a partir do mediastino testicular. Ambas as extremidades dos tubos seminíferos desembocam diretamente na *rete testis* que por sua desembocam no epidídimo e ducto deferente por onde são expelidos os espermatozóides (Dickson D. V., et al., 2011).

A espermatogénese relaciona-se intimamente com o eixo hipotálamo- pituitário-testicular, a secreção pulsátil de GnRH pelo hipotálamo, que através de uma modulação endócrina-parácrina-autócrina regula a libertação pulsátil de gonadotrofinas pela pituitária anterior (LH e FSH) que irá afeta as células testiculares. Deste modo a LH atua sobre as células de Leydig, levando á produção de testosterona e estrogénios. E por sua vez a FSH atua sobre as células de Sertoli, provocando a libertação de estrogénios, inibina, activina, proteína ligante de androgéneos (ABP), transferrina, fator de crescimento insulínico-1 (IGF-1) e outros fatores necessários à espermatogénese (Silva, 2010).

No parênquima intersticial entre os túbulos seminíferos são predominantes as células somáticas parenquimatosas, as células de Leydig, estas possuem um elevado número de recetores de LH, sendo assim responsáveis pela produção de testosterona e estrogénios que desempenham um papel fundamental no mecanismo de *feedback* e assim de regulação do eixo hipotálamo-hipófise e das glândulas anexas ao aparelho reprodutor (Gamboa, 2011).

Os tubos seminíferos são formados numa camada mióide celular que rodeia a lâmina basal nesta assentam as células somáticas, células de Sertoli, e germinativas, as espermatogónias. As células de Sertoli desempenham várias funções: têm a função de suporte e nutrição das células germinativa; estão envolvidas no movimento de células do compartimento basal para o adluminal e espermiação - isto porque possuem projeções citoplasmáticas que permitem que as várias células de Sertoli se liguem entre si formando a barreira hemato-testicular, esta divide o epitélio germinal em compartimento basal e adluminal. As células de Sertoli estão também envolvidas na fagocitose de células germinativas em degeneração; possuem recetores para a FSH e testosterona produzem estrogénios, inibina e outros fatores parácrinos-autócrinos como *insulin like growth factor* (IGF-I), transferrina entre outros (Roser, 2008).

Os requisitos hormonais para o normal funcionamento da espermatogénese são desconhecidos em carneiros, a FSH é estritamente necessária para que ocorra espermatogénese e pensa-se que a LH desempenhe uma ação direta sobre a regulação da divisão das espermatogónias para além de estimular a produção de testosterona. Aparentemente, as células de Sertoli medeiam o normal desenvolvimento das espermátides através função da FSH. Contudo a conclusão acerca do controle hormonal da espermatogénese em equinos deve aguardar por dados obtidos em garanhões uma vez que existem diferenças entre espécies (Dickson D. V., et al., 2011).

A espermatogénese na espécie equina prolonga-se por 57-58 dias e encontra-se dividida em três fases:

1. Espermatocitogénese, tem a duração de aproximadamente 19 dias e caracteriza-se pela ocorrência de divisões mitóticas. As espermatogónias encontram-se na periferia dos túbulos seminíferos e encontram-se interligadas através de pontes intercitoplasmáticas o que permite a coordenação das mitoses e produção das novas gerações de espermatogónias. A partir destas originam-se os espermatócitos I iniciando-se assim a espermatogénese.

2. Meiose dos espermatócitos, dura aproximadamente 19 dias. Esta origina os espermatócitos secundários passando assim de células diplóides para células haplóides. De seguida ocorre uma diferenciação morfológica, em que as células passam assim de uma forma esférica inicial a um formato alongado, de núcleo condensado e providas de axonema passando a denominarem-se espermatídes. Simultaneamente as células passam a orientar-se em direção ao lúmen tubular dos tubos seminíferos.
3. Espermiogénese, ocorre num período de cerca de 18 dias. Nesta ocorre a maturação e diferenciação dos espermatídios. Esta fase termina com a espermição que corresponde à libertação sincronizada no lúmen tubular dos tubos seminíferos, em intervalos de 12 dias. O final da espermiogénese coincide então com uma nova espermatocitogénese.

As etapas acima descritas podem ser confirmadas através de cortes histológicos de tubos seminíferos de equino, tendo sido demonstrado que existem oito diferentes estádios celulares da espermatogénese que constituem o ciclo do epitélio seminífero (Silva, 2010).

Os spz são libertados no lúmen do túbulos seminíferos sendo removidos hidrostaticamente como fluído escoado para a *rete testis*. E daqui para os ductos extragonadais: epidídimo e ductos eferentes para maturação e armazenamento (Dickson D. V., et al., 2011).

Espermatozóide

O espermatozoide equino é uma célula haplóide (32 cromossomas) extremamente especializada estruturalmente está dividido em cinco partes: cabeça, pescoço, peça intermédia, peça principal, peça terminal (Len, 2008).

A cabeça do spz é elíptica, achatada dorsoventralmente sendo a porção posterior mais espessa apresentando aproximadamente 5,33 µm a 6,62 µm de comprimento por 2,75 µm a 3,26 µm de largura. Podendo-se enumerar as seguintes partes da mesma: núcleo, invólucro nuclear, acrossoma, segmento equatorial, região pós-acrossoma e anel posterior (D. Burger, et al., 2015).

O núcleo ocupa a maioria da cabeça definindo a sua forma. Constitui-se por ácido desoxirribonucleico (DNA) complexado maioritariamente com protaminas, estas são proteínas que apresentam carga positiva ricas em resíduos de arginina e cisteína que sustentam as

histonas em 85% do DNA aquando de espermiogénese e que permitem a compactação do DNA (Gamboa, 2011).

Avaliação do garanhão / Avaliação do sémen / Exame de fertilidade potencial

Antes de iniciar o processo de criopreservação é necessário avaliar o animal de modo a indagar se possui condições para ser utilizado para reprodução, enquanto garanhão e conhecer as características do sémen produzido. Quando a intenção é a de congelar o sémen de determinado animal procede-se posteriormente a testes de congelação.

A avaliação do garanhão deverá focar-se nas seguintes etapas:

Obtenção do historial médico geral e história reprodutiva

Dados que se deverão obter para uma caracterização da história reprodutiva: número de éguas que beneficiaram do sémen do garanhão e método de reprodução medicamente assistida utilizado; taxa de prenhez por ciclo, no primeiro ciclo e por época reprodutiva; taxa de conceção e incidência de abortos ou perda embrionária precoce; se existiram sinais de inflamação uterina nas éguas reproduzidas anteriormente; se existiu alguma alteração repentina na qualidade do sémen, o tamanho testicular; quando foi a ultima vez que o animal foi utilizado como reprodutor (Bedford-Guaus, 2014).

Exame de estado geral

O exame físico deverá incluir a avaliação do sistema locomotor (parte músculo-esquelética e neurológica) assim como a avaliação da função visual. Durante a avaliação da condição física do garanhão devesse prestar especial atenção à capacidade do garanhão em abordar e montar com sucesso a égua, qualquer afeção ou problema de conformação que afete negativamente a capacidade do garanhão em montar a égua deve ser identificada e corrigida antes que o macho desenvolva problemas psicológicos que o façam desenvolver uma relação negativa com a monta. Exemplos de condições a que se deve dar atenção serão todas aquelas que provoquem dor nas costas e membros posteriores (osteoartrite, bursites) (Equine Section, Department of Animal Sciences, 2009).

Outro parâmetro a que se deverá dar especial atenção será a condição corporal uma vez que uma fraca condição corporal poderá indicar uma nutrição inadequada o que poderá um efeito prejudicial na qualidade do sémen (Equine Section, Department of Animal Sciences, 2009).

Inspeção dos órgãos reprodutores externos

A inspeção do pênis e prepúcio poderá ser realizada no momento em que se efetua a lavagem dos mesmos, aquando da ereção o pênis deverá estar totalmente exposto de modo a avaliar a existência de possíveis lesões, cicatrizes ou corpos estranhos, este deverá ser agarrado atrás da glândula de modo a observar também o processo uretral (Equine Section, Department of Animal Sciences, 2009).

A inspeção do escroto, testículos e epidídimo é uma das componentes mais sensíveis deste exame na qual se deverá ter especial cuidado com a segurança individual uma vez que frequentemente os animais mostram-se relutantes ao toque destas e se possível deverá ser realizada após a ejaculação. Os testículos deverão mover-se livremente no saco escrotal e são palpáveis através do mesmo a sua presença (assim como do epidídimo), tamanho, simetria e consistência deverão ser avaliados (Equine Section, Department of Animal Sciences, 2009).

Inspeção dos órgãos reprodutores internos

A inspeção das glândulas acessórias compreende a avaliação das glândulas vesiculares e bulbouretrais, próstata e da porção terminal do ducto deferente ou ampola. Estas deverão ser inspecionadas através de palpação rectal (durante a sua realização dever-se-á igualmente examinar os anéis inguinais) e ultrassonografia (Brinsko, 2011).

Rastreio de doenças infecciosas

Dependendo do país e área geográfica será necessário a colheita de sangue para a realização de rastreio de doenças infecciosas como a anemia infecciosa equina (Turner, 2005).

Realização de zaragatoas

A realização de zaragatoas é efetuada com o intuito de realizar culturas bacteriológicas para a detecção de microrganismos com potencial de transmissão venérea como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Taylorella equigenitalis*. Idealmente deveriam ser realizadas zaragatoas antes da lavagem do pénis á fossa uretral prepúcio e glânde; e posteriormente à lavagem do pénis fossa uretral pré e pós ejaculação (Turner, 2005).

Avaliação do comportamento reprodutivo e libido

Recolha e avaliação do sémen

1. Volume, cor e pH;
2. Concentração espermática;
3. Aferir o número total de spz morfologicamente normais e de mobilidade progressiva;
4. Longevidade da mobilidade espermática no sémen fresco e diluído em amostras armazenadas à temperatura ambiente e a 4º C;
5. Concentração, mobilidade e morfologia espermática (Turner, 2005).

Recolha do sémen

Tem-se vindo a verificar que a recolha do sémen é um dos passos com maior impacto na qualidade do mesmo, uma vez que o protocolo de recolha utilizado afetará a composição do plasma seminal, a concentração espermática e a contaminação bacteriana. Para se proceder à congelação de sémen a amostra desejada deverá apresentar menor volume com elevada concentração espermática e mínima contaminação bacteriana e para isso deve-se adaptar o protocolo de recolha a cada ganhão (Aurich, 2008).

Existem vários métodos para efetuar a recolha do sémen e cada um acarreta vantagens e desvantagens. Destes podemos enumerar o uso de vagina artificial, preservativo, indução farmacológica da ejaculação, estimulação manual o recolha epididimal. A recolha recorrendo ao uso da vagina artificial é o método mais amplamente utilizado (McKinnon, et al., 2011).

O processo de recolha de sémen evoluiu ao longo dos tempos. Outros métodos eram utilizados como uma esponja ou preservativos de borracha, que eram colocados no interior da vagina de uma égua estes métodos apresentavam inúmeras desvantagens e assim atualmente recorre-se por rotina à utilização de vaginas artificiais, para realizar a recolha de sémen (Hoogewijs, 2010).

O uso da vagina artificial (VA) tem como vantagens uma maior eficiência económica, reduzindo os riscos associados à cobertura (quer para o ganhão quer para a égua) aumentando a fertilidade (Guimarães, 2014). De um modo simplista, pode-se descrever o efeito da VA como um conjunto entre efeitos térmicos e mecânicos que levam à ejaculação do ganhão (Gamboa, 2011).

Existem vários tipos de VA que são utilizados consoante a preferência dos clínicos e a conformação do ganhão, sendo que as mais comumente utilizadas podem ser divididas em quatro modelos:

- Colorado: este modelo é assim denominado uma vez que foi desenvolvida pelo Laboratório de Reprodução Animal de Fort Collins da Universidade de Colorado. Este é um modelo robusto e pesado que necessita de cerca de 4,5kg de água para ser enchido, mede 59 cm de comprimento, tem diâmetro interno de 15 cm. A água deverá estar a 60°C de modo a obter uma temperatura interna de cerca de 46°C. Tem como vantagem, devido ao grande volume de água, uma boa manutenção da temperatura.

As desvantagens apontadas são o elevado peso que dificulta o seu manuseamento e a ejaculação ocorrer na porção da VA com água aquecida, este facto faz com exista propensão para que o sémen sofra choque térmico (uma vez que este ocorre a temperaturas superiores a 43°C).

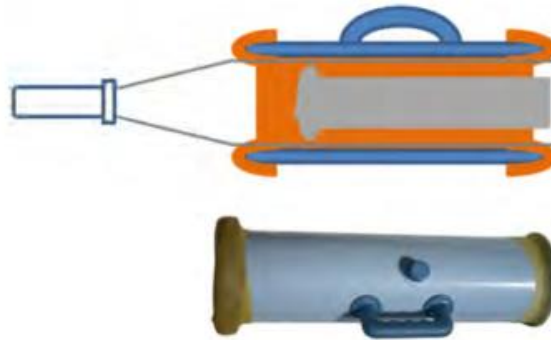


Figura 1 - Vagina Artificial Colorado, esquema onde a cinzento é representada a posição do pénis na VA (Hoogewijs, 2010).

- Missouri: é constituída por duas partes de borracha pesadas seladas em conjunto que são suportadas por um invólucro de couro. A parte de couro suporta conferindo a pressão necessária às partes de interiores em borracha que entre si formam um forro a ser enchido com água. Este é provavelmente o modelo mais utilizado em todo o mundo, tem como vantagens a facilidade de preparação, baixo peso, a ejaculação ocorrer numa localização não aquecida (menor propensão para o choque térmico), permite ainda a realização de uma técnica concebida para auxiliar a ejaculação e garanhões relutantes à ejaculação em VA. Esta técnica caracteriza-se a utilização de uma toalha saturada em água muito quente, que é aplicada entre a proteção de couro e a manga de borracha na abertura proximal da VA que pode ser utilizada aquando da manipulação do pénis durante a recolha e assim proporcionar um estímulo extra que pode facilitar a ejaculação (isto deve ser efetuado com extrema precaução de modo a evitar a contaminação do sémen com água). Tem como principal desvantagem a tendência a baixar a temperatura rapidamente.

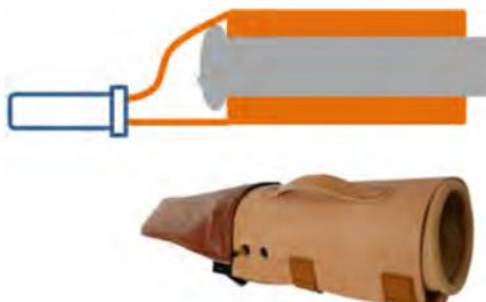


Figura 2 - Vagina Artificial Missouri, esquema onde a cinzento é representada a posição do pénis na VA (Hoogewijs, 2010).

- Hannover: é formada por um invólucro exterior de plástico resistente. A abertura proximal da VA possui um diâmetro consideravelmente maior do que a abertura distal. Esta possui um pequeno diâmetro de modo a evitar que a glândula do pénis ultrapasse a porção aquecida, numa tentativa de imitar a anatomia do fórnix vaginal da égua. Este modelo tem como vantagens a boa aceitação por parte do garanhão, fácil montagem e manuseamento. Tem como desvantagem o facto de a ejaculação ocorrer na parte aquecida da VA existindo assim uma propensão para que os spz sofram choque térmico.

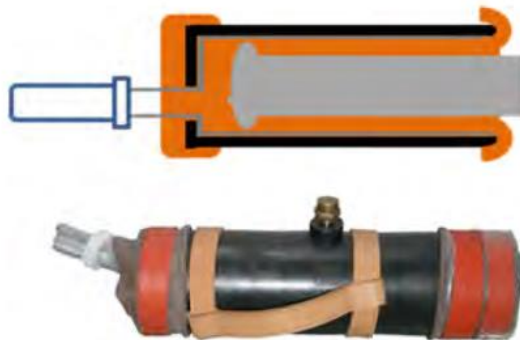


Figura 3 - Vagina Artificial Hannover, esquema onde a cinzenta é representada a posição do pénis na VA (Hoogewijs, 2010).

- Cracóvia: Pode ser descrito como é uma modificação do modelo “Colorado”, que se caracteriza por ser bastante mais pequena. Nesta a ejaculação ocorre fora da porção aquecida. Este modelo é frequentemente utilizado com a abertura distal aberta o que permite que o garanhão ejacule fora da VA, permitindo assim a recolha fracionada (recolha do gel separadamente da fração rica em spz).



Figura 4 - Vagina Artificial Cracóvia, esquema onde a cinzenta é representada a posição do pénis na VA (Hoogewijs, 2010)

As vaginas artificiais usadas não se limitam às descritas anteriormente, podendo ser usadas vários tipos de modificações das mesmas combinando diferentes características de cada uma delas evitando as desvantagens inerentes a cada uma das mesmas (Hoogewijs, 2010).

A preparação da VA é um passo fundamental para o sucesso da utilização da mesma que deve ser realizada com o mínimo de contaminação bacteriana possível. Para isso a preparação da VA inicia-se com a introdução de uma manga sanitária de plástico flexível, este passo é facultativo podendo ser substituído pela utilização de uma só VA para cada ganhão, sendo dependente do modelo de VA utilizado e da sensibilidade do ganhão (a utilização de manga sanitária em ganhões com reduzida libido tende dificultar a ereção *(McDonnel, comunicação pessoal New Bolton Center, 2015)*).

De seguida adapta-se um copo coletor de sémen à extremidade distal da VA ou à manga sanitária, este passo deve realizar-se o mais próximo possível da recolha de modo a reduzir a contaminação. Como proteção extra poder-se-á colocar uma luva de palpação rectal por forma a proteger o interior da VA cuja extremidade proximal deverá ser revertida sobre a parte exterior da VA e fixada com um elástico forte.

O enchimento da VA deverá ser realizado imediatamente antes da recolha e a temperatura e quantidade de água (que influenciará pressão sobre o pénis) deve ser adaptada a cada indivíduo (Gamboa, 2011). Contudo deverá ter-se como referência para a temperatura interna da vagina o intervalo entre 44-48°C, esta é superior à temperatura da vagina de uma égua (38,5°C) mas tem-se vindo a verificar que quando se procede a recolha com recurso a VA os ganhões necessitam desta elevação como estímulo extra, podendo alguns animais necessitar de temperaturas até 63°C (Guimarães, 2014). Nestes casos há que ter especial atenção para reduzir ao mínimo o contacto do sémen com a porção aquecida da VA, pelo que esta deve ser tombada rapidamente de modo a escoar o sémen para o copo coletor de modo a reduzir o choque térmico (dependendo do modelo de VA utilizado) (Hoogewijs, 2010).

Habitualmente é aplicado no interior da VA um lubrificante não-espermicida. Alguns autores referem que o uso de lubrificantes à base de petróleo deve ser evitado devido a apresentarem alguma toxicidade para o sémen, enquanto outros referem que deve ser favorecida a utilização de lubrificantes solúveis em água pela sua inatividade osmótica (Devireddy., et al., 2002).

Para se proceder à recolha poderá ser utilizada uma égua peada (que de preferência deverá estar em cio), o manequim de recolha ou a recolha poderá ser feita em estação. As recolhas consideradas no presente estudo foram efetuadas em estação ou recorrendo a um manequim de recolha.

Devido questões práticas como: o tempo, segurança dos animais das pessoas envolvidas no processo de recolha do sémen, disponibilidade de uma égua com bom temperamento que aceite a monta do garanhão e em cio (impossível de encontrar durante a época de contra estação) a recolha utilizando uma égua peada tem vindo a decair principalmente em grandes centros reprodutivos e quando se pretende congelar o sémen recolhido.

A popularidade da recolha em estação tem vindo a aumentar como alternativa às recolhas realizadas utilizando um manequim, existindo uma preocupação crescente com os efeitos que a monta poderá acarretar sobre os membros posteriores em garanhões utilizados para fins desportivos. A recolha em estação permite ainda a recolha em animais que não conseguem suportar o seu peso nos membros posteriores ou que apresentem lesões/dor (o que por vezes tem um efeito negativo sobre a libido). Assim, quando comparados os parâmetros espermáticos de recolhas em estação com recolhas efetuadas com recurso a um manequim não foram encontradas diferenças significativas na mobilidade e a viabilidade do sémen, contudo, nas recolhas em estação verificou-se que o volume do fluído seminal e o número total de espermatozóides era menor enquanto o tempo até se atingir a ejaculação e o número de tentativas até esta ser atingida foram mais elevadas (Burger, D., et al, 2015).

Concentração espermática

Conhecer o erro associado aos diferentes métodos de uma avaliação é de extrema importância, uma vez que é aceite que existe uma diferença significativa no rigor e repetibilidade entre os vários métodos usados para a contagem de células espermáticas, sendo assim necessário uma uniformização e estabelecimento de protocolos de controlo de qualidade de modo a se assegurar uma concordância entre os diferentes métodos utilizados atualmente. Por este motivo a World Health Organization afirmou que estes métodos requerem validação previamente à sua aceitação visando a sua implementação como análises de rotina (Correia, M., et al, 2015). Por este motivo decidiu-se descrever com maior profundidade, os diferentes métodos de avaliação da concentração e mobilidade espermática.

De seguida, serão descritos os diferentes métodos e tipos de dispositivos mais comumente usados para a aferição da concentração espermática:

Métodos fotométricos

Os métodos fotométricos para avaliação do sémen são provavelmente o tipo de dispositivo usado com maior frequência para a aferição da concentração espermática. Esta é realizada com base na absorção de um feixe de luz por parte dos espermatozóides que assim sofrem alterações quando transmitida através da amostra. As alterações então observadas no feixe de luz irão corresponder à concentração espermática, uma vez que medem a densidade óptica da amostra de um modo rápido e com precisão, desde que a concentração do sémen se situe entre $100 \text{ a } 300 \times 10^6/\text{spz/mL}$ e a amostra não possua pús, sangue ou detritos sendo que um diluidor pela sua composição também poderá afetar a estimativa da concentração espermática (Hoogewijs, 2010).

Exemplo de um dos equipamentos que segue este tipo de funcionamento é o SpermaCue®, Minitube é um equipamento que tem por base um sistema espectrofotométrico que foi especialmente calibrado para sémen equino e que só permite a aferição da concentração em semen fresco. Este equipamento tem um custo económico mais reduzido (quando comparado com citometria de fluxo ou NucleoCounter Sp-10®) e o tempo que se despende para aferir a concentração espermática é muito reduzido (comparativamente com todos os outros métodos disponíveis). E ainda que se saiba que o Spermacue possui uma maior margem de erro e só pode ser usado para aferir a concentração do sémen fresco, uma vez que os diluidores influenciam os resultados obtidos. Ainda assim este equipamento é utilizado amplamente (Comerford, 2009).



Figura 5 - Spremacue®, na clínica Embriovet

Funcionamento da Câmara de Neubauer melhorada

O hemocitómetro ou câmara de Neubauer melhorada é o método considerado “gold standard”, contudo nem sempre é o mais utilizado na prática clínica devido ao tempo que é necessário despendar (Lu, 2007). Ainda assim é de salientar que cerca de 64% dos laboratórios que realizam análises a sémen utilizando a câmara de Neubauer (Bailey, E., et al., 2007).

Esta é considerada como um método de eleição por possuir menor variabilidade de resultados quando comparada com câmaras descartáveis, e não apresentar diferenças significativas de resultados quando comparada com métodos automatizados (como a câmara Mackler®, Leja slide®, Cell Vu®, ou até mesmo o CASA) e ser o método menos dispendioso disponível, apesar de ser o que consome mais tempo. É importante referir que na câmara de Neubauer não se faz sentir o efeito de Segre-Silberberg (SS) (que ocorre em câmaras com

profundidade inferior a 100 μm) este efeito é responsável pela movimentação dos espermatozóides no sentido das paredes da câmara e causa uma distribuição não uniforme das células espermáticas e consequentemente aquando da ocorrência deste efeito os resultados obtidos não são suficientemente fiáveis (Correia, 2015).

Para aferir a concentração espermática é necessário proceder à diluição do sémen utilizando um fixador que imobilize os spz. Esta, deverá ser colocada em ambas as câmaras do hemocitómetro de modo a que os espermatozóides imóveis sedimentem sobre a sua grelha de modo a se poder proceder à contagem dos espermatozóides para posteriormente calcular a concentração espermática.

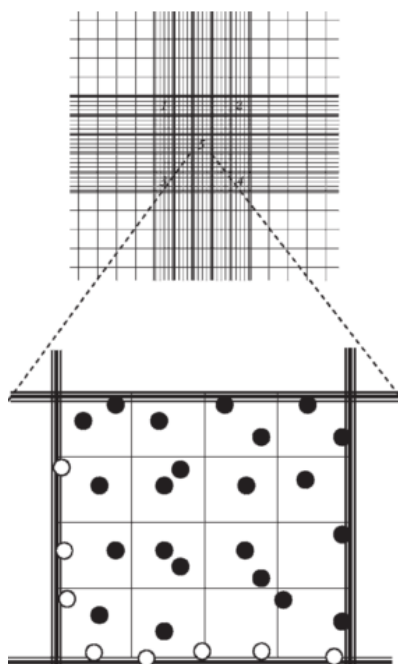


Figura 6 - Esquema representativo Grelha de contagem de um Hemocitómetro (World Health Organization, 2010)

Funcionamento do NucleoCounter SP-100

O dispositivo NucleoCounter SP-100, (ChemoMetec A/S, Allerød) que analisa a imagem utilizando fluorescência microscópica continuando a ser um método de medição da concentração espermática através de densidade óptica (Anzar, et al., 2009).

Este é um dispositivo recente no qual o sémen é tratado com um detergente (S100 Reagent) e introduzido em cassetes descartáveis revestidas com iodeto de propídio (um corante fluorescente que penetra as células lisadas de modo a corar de vermelho o DNA no núcleo dos spz) aferindo assim o número de spz em 1 µL de sémen para se poder estimar a concentração espermática (Anzar et al., 2009).

NucleoCounter SP-100 pode ser utilizado para aferir a concentração espermática em sémen fresco, diluído ou congelado com a vantagem de que os detritos não afetaram não interferem com os resultados obtidos possuem maior repetibilidade e precisão (Hoogewijs, 2010).

Mobilidade espermática

Esta é considerada um dos mais importantes critérios para avaliar a fertilidade do garanhão (Len, 2008). Várias características dos spz são associadas à fertilidade na espécie equina existe uma forte associação entre a fertilidade e a mobilidade e morfologia daí a importância da sua avaliação (Love, et al., 1998).

Observação subjetiva

A mobilidade espermática pode ser estimada de uma forma subjetiva, para isso coloca-se uma gota de sémen entre uma lâmina e uma lamela de modo a se observar a preparação através de microscopia óptica estimando visualmente em percentagens a mobilidade total, mobilidade progressiva e imóveis. Torna-se então de extrema importância referir que a avaliação subjetiva da motilidade continua a ser a técnica mais utilizada na rotina laboratorial e tem a grande utilidade de rapidamente permitir diferenciar a qualidade do sémen (Arruda, et al., 2011).

Computer-assisted sperm analysis: CASA

A utilização de métodos automatizados permite a avaliação da mobilidade que se revela de extrema importância uma vez que esta é importante na determinação do potencial de fertilidade do espermatozóide (Arruda, et al., 2011).

O Computer-assisted sperm analysis (CASA) identifica os espermatozoides móveis observados capturando imagens sucessivas dos mesmos isto estabelecer as suas trajetórias estas são processadas matematicamente, permitindo estabelecer as suas trajetórias de forma numérica sendo que o seu processamento reflete-se numa série de parâmetros que permitem estabelecer o movimento exato de cada espermatozoide (Arruda, et al., 2011).

Para isto equipa-se um microscópio com uma câmara as células espermáticas e o CASA após reconhecer as trajetórias atribui então uma percentagem a cada uma das categorias de movimento dos espermatozoides:

- Mobilidade total (MT), são todos os espermatozoides que possuem uma velocidade mínima determinada;
- Mobilidade progressiva (MP), espermatozoides que se movimentam ativamente e progressivamente que no caso da espécie equina descrevem uma trajetória elíptica, excluem-se desta categoria aqueles spz imóveis ou que se movimentam em pequenos círculos, cuja cauda se move com dificuldade sem impulsão da cabeça
- Imóveis (IM), são todos os espermatozoides cuja velocidade do movimento é nula (Arruda, et al., 2004).

Para além destas conseguem-se obter os seguintes parâmetros relativamente ao movimento dos espermatozoides:

- Velocidade de Trajetória (VAP, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média que o espermatozóide adquire na sua trajetória (não sendo contabilizados os momentos e que a célula não se move);
- Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média percorrida em linha reta;
- Velocidade Curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), que é a velocidade média medida de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula;

- Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, μm), é a largura média da oscilação da cabeça durante o movimento do spz;
- Frequência de Batimentos (BCF, Hz), é a frequência com que a cabeça do espermatozóide se move durante um trajeto;
- Retilinearidade (STR, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VAP;
- Linearidade (LIN, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VCL;
- Velocidade Rápida (Arruda, et al., 2004).



Figura 7 – CASA (clínica Embriovet®).

Uma das maiores vantagens deste sistema é possuir uma boa repetibilidade e a ausência de subjetividade ainda que “standards” para a análise tenham de ser estabelecidos *a priori*, uma vez que tem sido demonstrado que diferentes configurações técnicas e preparação das amostras influenciam os resultados da análise, sendo estes foram estudados para diferentes espécies (Hoogewijs, 2010). Apesar das vantagens de se poder analisar os vários parâmetros que se obtêm através da utilização do CASA não se conhece ainda com total clareza qual das

características do movimento espermático é capaz de prever a fertilidade ou a taxa de fertilização (Arruda, et al., 2004).

O maior desafio que recai sobre a utilização do CASA será a padronização dos procedimentos laboratoriais para avaliação do sémen e proporcionar uma maior uniformização dos resultados. Para isso alguns aspetos deverão ser preservados: manter a concentração espermática (25 a 50×10^6 espermatozoides/ml), o que se pode tornar uma tarefa mais difícil com sémen fresco. A amostra deverá ser diluída com recurso a meios/diluidores que não levem a uma diminuição da mobilidade devido a depressão do sistema gerador de adenosina trifosfato (ATP) da célula (como o tampão fosfato PBS e meio Talp), ou por formação de resíduos (diluidores com gema de ovo), sendo que na presença de partículas do tamanho da cabeça dos espermatozoides, o sistema irá reconhecê-las como uma célula imóvel (Arruda, et al., 2011).

Morfologia espermática

Um dos erros que atualmente ainda é muito difundido é o de que a morfologia não desempenhar um papel importante na fertilidade tendo menos relevância que a mobilidade isto porque, no passado falhou-se em demonstrar a relação entre uma morfologia anormal do espermatozoide e a fertilidade do gado (Brito, et al., 2011).

Para a avaliação da morfologia espermática a Society for Theriogenology (SFT) recomenda a preparações de *wet mounts* e a utilização de *differential interference contrast microscopy* – DIC (microscopia de contraste diferencial) para a avaliação contudo não são descritas as diferenças entre as *wet mounts* eo esfregaço tradicional. A coloração recomendada pela SFT para avaliação espermática em touros é eosina/nigrosina, que devido à sua fácil utilização faz com que a sua utilização seja bastante ampla; em oposição, a WHO recomenda a utilização da coloração Papanicolaou para sémen humano (Brito, et al., 2011).

Segundo Brito (2011), a utilização de *wet mounts* em microscópios de fase de contraste facilita a observação de defeitos de acrosoma, vacúolos nucleares, gotas citoplasmáticas uma vez que as proporções destes aumentaram quando comparadas com as observações de esfregaços corados. Neste estudo, também se observou que aparentemente ao utilizar *wet mounts* existiu uma aparente redução de artefactos como cabeças destacadas em oposição a um aumento de outros como peças intermédias dobradas; em conclusão, consideraram que a utilização de DIC para avaliação da morfologia espermática é um método mais sensível.

Contudo, alguns autores desencorajam a utilização deste método devido à falta de experiência dos operadores na sua utilização, à dificuldade no armazenamento das amostras; contudo poderá proceder-se ao armazenamento das imagens em suporte digital o que permite a reavaliação por diferentes operadores, para realização de controlo de qualidade sem alterações danosas das amostras ao longo do tempo (o que não acontece com o armazenamento de lâminas).

De modo a obter-se uma imagem mais fidedigna acerca da qualidade e funcionamento da espermatogénese é preferível enumerar todos os defeitos num só espermatozóide o que aumenta grandemente o valor preditivo relativamente à fertilidade a partir da avaliação da morfologia espermática. Alguns autores, referem ainda que se deve reportar a percentagem de espermatozóides com um e com múltiplos defeitos, uma vez que quando existem vários defeitos existiram distúrbios mais severos da espermatogénese o que poderá influenciar o prognóstico. Contudo a adoção de um sistema de classificação e standard com nomenclatura específica para os diversos defeitos teria grandes benefícios tanto para investigação e consequentemente para uma melhor interpretação por parte dos veterinários do exame de fertilidade potencial (Turner, 2005).

Refira-se ainda que os formulários da *Society for Theriogenology* para o exame de fertilidade potencial do garanhão possuem os seguintes itens (percentagens):

- Espermatozóides normais;
- Cabeças e acrossomas anormais;
- Cabeças destacadas;
- Gotas proximais e distais;
- Peças intermédias normais e anormais;
- Caudas dobradas e enroladas;
- Presença de outras células como: eritrócitos, leucócitos, neutrófilos ou células germinais (Turner, 2005)

Idealmente, para além dos itens referidos anteriormente, também deveriam ser indicados:

- Defeitos acrossômicos;
- Defeitos de cabeça: microcefalia (pequenas, sobdesenvolvidas), macrocefalia (aumentadas ou gigantes), piriformes, afuniladas ou com outras formas, vacúolos nucleares, múltiplas cabeças;
- Defeitos de peça intermédia: aplasia, segmentada, dobradas (Turner, 2005).

Processamento do sémen para criopreservação

Apesar do seu uso ser bastante comum nas espécies domésticas é aceite que a criopreservação do sémen provoca danos no mesmo, sendo que um número significativo de espermatozoides perde o seu potencial fertilizador após o congelamento criopreservação. É conhecimento geral que existem variações individuais que influenciam a resistência dos spz durante o processo de criopreservação justificando assim o porquê de alguns animais serem bons congeladores e outros maus congeladores ainda que não existam diferenças no espermograma de rotina (Borges et al. , 2014). Por esse motivo, a criopreservação permitiu a identificação das falhas existentes nos métodos de rotina, avaliação do sémen ainda assim é apreciada uma diminuição da fertilidade quando comparando sémen refrigerado com congelado (DiGrassie, 2000).

Freezability do sémen é um termo habitualmente usado para quantificar as taxas de sobrevivência dos spz aferida com testes laboratoriais após criopreservação e descongelamento. Resultados de três estudos diferentes sugerem que 20 a 50 % dos ganhões possuem sémen cuja *freezability* não é aceitável. E por norma, salvo raras exceções, a fertilidade pós descongelamento é menor do que a apresentada no sémen refrigerado ou fresco (Salazar, et al., 2011).

Atualmente os protocolos de criopreservação não estão estandardizados pelo que o sucesso da criopreservação varia substancialmente e na espécie equina comparativamente com outras espécies domésticas, as taxas de sucesso são mais baixas (Blottner et al., 2001). Alguns dos aspetos onde se pode observar a falta de estandardização, são os métodos de criopreservação onde se destacam as técnicas de centrifugação, tipo de diluidor, taxas de congelamento, sistemas de embalagem e *timing* de IA (Samper et al., 1998). Um dos pré-requisitos para que se possa criopreservar o sémen equino é uma elevada qualidade inicial (avaliada rotineiramente tendo em conta a mobilidade, concentração e morfologia) (Blottner, et al., 2001).

Atualmente nos protocolos de inseminação artificial com sémen criopreservado de garanhão as doses usadas situam-se entre 250×10^6 a 500×10^6 espermatozoides móveis congelados a uma concentração que pode variar entre 100×10^6 a 500×10^6 espermatozoides/ml em palhetas de 0.25 a 5mL (Clulow, et al., 2008).

É assumido que o sémen criopreservado sofre danos significativos, por esse motivo procura-se ainda o aperfeiçoamento dos métodos de criopreservação de sémen equino, onde não existam perdas significativas de viabilidade e fertilidade. Estas perdas devem-se a danos celulares irreversíveis incluindo rutura da membrana plasmática e capacitação prematura do acrossoma. Foi demonstrado que vários fatores estão envolvidos na diminuição da qualidade do sémen, pós-criopreservação de sémen equino tais como a técnica de congelação e a composição do diluidor crioprotector e o tipo de crioprotector utilizado (Pojprasatha, et al., 2011).

O processo de congelamento de sémen é constituído por vários passos, que são universais e independentes do método de congelação, estes são descritos de seguida:

Diluição

Independentemente dos procedimentos que se adotem após a recolha do sémen este deve ser misturado com um diluidor apropriado pré-aquecido a (37°C) no menor tempo possível após a recolha, de modo a maximizar a longevidade do sémen. Neste momento o rácio de diluição apropriado deverá ser entre 1:1 a 1:2. Em garanhões cujo sémen é extremamente sensível ao choque térmico poder-se-á adicionar o mesmo volume de diluidor pré-aquecido - ao volume expectado do ejaculado – que é colocado antes da recolha na garrafa de recolha acopolada na VA. Generalizando, é aceite que o sémen equino necessite de ser diluído a um rácio de 1:3 (Hoogewijs, 2010). Sendo que o plasma seminal deverá ser diluído para níveis menores ou iguais a 25% do que se recolhe inicialmente de modo a obter-se uma preservação ótima sendo que a concentração espermática deverá situar-se entre 25 a 50×10^6 /ml (Varner et al., 1988). Satisfazer todos estes pormenores nem sempre é possível por isso mesmo, se a concentração espermática inicial é demasiado baixa para usar uma diluição apropriada a centrifugação é aconselhada (Hoogewijs, 2010)

Uma grande variedade de diluidores têm vindo a ser desenvolvidos e a maioria deles contém na sua composição gema de ovo, leite, produtos derivados do leite ou substâncias químicas para regular a osmolaridade e o pH (Tabela 1). Atualmente os diluidores com maior

popularidade são semelhantes na sua composição ao diluidor originalmente publicado por Kenney e colaboradores (1975). Estes diluidores têm um baixo custo, são fáceis de preparar e podem facilmente ser congelados para seu armazenamento por maiores períodos de tempo (Hoogewijs, 2010).

Tabela 11 - Composição de diferentes diluidores para centrifugação, preservação e criopreservação (Hoogewijs, 2010).

a) modified lactose EDTA (Martin et al., 1979)		b) lactose EDTA egg yolk (Tischner, 1979)		c) INRA82 for freezing (Palmer, 1984)		d) Modified INRA82 (Magistrini et al., 1992)		
Centrifugation medium	Glucose	6.0 g	Lactose	11 g	Glucose	2.5 g	Glucose	2.5 g
	Na ₂ -EDTA	370 mg	EDTA	100 mg	Lactose	150 mg	Lactose	150 mg
	Na-citrate	375 mg	Na-citrate	89 mg	Raffinose	150 mg	Raffinose	150 mg
	Na-bicarbonate	120 mg	Na-bicarbonate	8 mg	Na-citrate	30 mg	Na-citrate (5.5 H ₂ O)	30 mg
	Streptomycin	50 mg	Streptomycin	50 mg	K-citrate	41 mg	K-citrate (H ₂ O)	41 mg
	Penicillin	50 IU	Penicillin	50 IU	Gentamycin	5 mg	Hepes	476 mg
Distilled water	100 mL	Egg yolk	1.6 g	Penicilin	500 IU	Gentamycin	50 IU/mL	
Freezing medium	Lactose (11%, w/v)	50 mL	Glycerol	3.5 mL	Distilled water	50 mL	Penicillin	50 IU/mL
	Centrifugation medium	25 mL	Distilled water	100 mL	UHT sterilized skimmed milk	50 mL	Distilled water	50 mL
	Egg yolk	20 mL			Centrifugation medium	INRA82 + 2% egg yolk	UHT skimmed milk	50 mL
	OrvusEs paste	0.8 mL			Freezing medium	INRA82 + 2% egg yolk + 2.5% glycerol	pH	7.1
	Glycerol	5 mL						

Concentração do sémen e remoção da fração seminal

O plasma seminal dos mamíferos contém um mecanismo de defesa antioxidante que se constitui por antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Contudo, durante os procedimentos de acondicionamento para criopreservação, o sémen é diluído de modo a produzir múltiplas doses inseminantes a partir de um só ejaculado o que leva a uma diminuição dos antioxidantes naturais referidos anteriormente o que provoca um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigénio (ROS) a concentrações acima dos limites fisiológicos. Todos os componentes celulares incluindo lípidos, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares são alvos potencialmente lesados pelos ROS pelo que a concentração dos mesmos deve ser limitada à menor concentração possível de modo aos espermatozóides manterem o seu funcionamento normal. A quantidade de ROS excessiva pode ser neutralizada através da restituição do sistema de defesa antioxidante para isso recorre-se à adição de antioxidantes ao diluidor, como é o caso da vitamina E, cisteína, entre outros melhorando deste modo a

longevidade e a qualidade tanto do sémen refrigerado como criopreservado em várias espécies (Salam, et al., 2011).

A diluição do plasma seminal é realizada através da adição de um diluidor ao sémen fresco e centrifugação, contudo os efeitos da centrifugação no sémen equino não foram ainda completamente esclarecidos. Alguns estudos referem que existe um efeito prejudicial na mobilidade e viabilidade espermática uma vez que os efeitos não são completamente conhecidos por norma são usadas forças de centrifugação conservativas (400 a 650 × g) e estas levam a perdas no número de espermatozoides na ordem dos 20 a 30% (Len, 2008).

Habitualmente é descrita uma percentagem de recuperação espermática de 75% após a aplicação do protocolo de centrifugação tradicional (400 a 600× g durante 10 a 15 minutos) assumindo-se assim perdas de 25% contraditoriamente existem resultados na literatura que apresentam percentagens de recuperação na ordem dos 98 % usando o mesmo protocolo (Hoogewijs, 2010).

Tabela 12 - Síntese de protocolos de centrifugação de autores diversos.

	Força G	Tempo (minutos)	% de recuperação	% de perda
Hoogewijs, 2010	400 a 600	10 a 15	75	25
Len, 2008	400 a 650		80 a 70	20 a 30
Squires et al. 1999	400	12	80	20
Ferrer et al. 2012	400 a 600	10 a 15	80	20
Waite et al.2011	500	10	85 a 75	15 a 25
Ferrer et al.2004	900	10	91	9
Heitland et al. 1996	400	10	81	19
		16	83	17
		20	87	13
		24	95	5
Cochran et al. 1984	400	10	67	33
	650	15	70	30

Uma das principais preocupações ao maximizar a percentagem de recuperação espermática aquando da centrifugação do sémen são os efeitos adversos que a mesma pode ter sobre a integridade espermática. Tipicamente um aumento do tempo ou da força gravitacional leva a uma aumento da percentagem de recuperação mas pode também conduzir a uma diminuição

da mobilidade espermática ou qualidade do sémen devido ao facto de as forças mecânicas provocarem compactação excessiva dos spz. Vários estudos e autores tentaram inúmeras combinações entre forças de centrifugação e tempo com o intuito de otimizar os resultados obtidos como se resumiu na tabela 2.

Neste sentido, em 1984 Cochran e colaboradores descreveram uma técnica onde uma solução de grande densidade era colocada sob o sémen diluído no fundo do tubo de centrifugação (3.5 ml ou 5ml num tubo de centrifugação de 50 ml). Esta solução foi colocada com o intuito de que funcionasse como amortecimento para os espermatozóides durante a centrifugação, e por isso é chamada de *cushion* permitindo assim o recurso a maiores forças de centrifugação e tempo (Hoogewijs, 2010).

Quando se hipotetizou a utilização de uma solução de elevada densidade como o *cushion*, foi inicialmente testada uma solução composta por glucose e EDTA esta foi posteriormente substituída por outra, cuja constituição era gema de ovo e glicerol a 4 %, e nestas publicações iniciais foram descritos efeitos benéficos na mobilidade pós-centrifugação comparativamente aos protocolos de centrifugação utilizados por rotina á data. Posteriormente uma solução de iodixanol a 60% foi colocada sob o sémen diluído e sujeita a uma centrifugação a $1000 \times g$ durante 25 minutos o que resultou na não compactação do sémen no fundo do tubo apesar das elevadas forças aplicadas e em mais 30% de células vivas e morfológicamente normais comparativamente aos protocolos de centrifugação utilizados por rotina à data (Waite, et al., 2008).

Recentemente utilizando centrifugação a elevadas velocidades com recurso a 3,5 a 5 ml em tubos de 50 ml de *cushion* com características semelhantes ao referido anteriormente foram obtidas elevadas percentagem de recuperação. Uma variação nesta técnica foi descrita na qual um pequeno volume (30 μ L) de *cushion* que é colocado no fundo de um tubo especial (*nipple centrifugation tube*), e de seguida sujeita a centrifugação a $400 \times g$ por 20 min. Esta apresentou resultados com qualidade espermática *in vitro* ligeiramente superiores e possui ainda a vantagem de não ser necessária a aspiração do mesmo posteriormente á centrifugação tendo esta técnica (Waite, et al., 2008).

Deste modo, maiores forças de centrifugação e elevadas percentage de recuperação tornaram-se possíveis com a técnica do *cushion*. A utilização de uma solução de densidade elevada e específica (por exemplo, Cushion Fluid®, MinitÜb, Tiefenbach, Germany; Eqcell-sire®, IMV, L'Aigle, France) sendo possível centrifugar o sémen a $1000 \times g$ durante 20 minutos

sem danos severos no sémen. Após a centrifugação é necessário proceder-se à aspiração do sobrenadante e antes de se proceder à resuspensão do pellet com o diluidor crioprotetor é necessário remover o *cushion* muito cuidadosamente. Aparentemente este é o passo crítico para o sucesso da técnica sendo que quando todo o processo decorre em condições ideais se poderá alcançar uma taxa de recuperação que pode ultrapassar os 90% (Aurich, 2008).

Centrifugação utilizando um colóide

A centrifugação do sémen através de uma ou mais camadas de colóide pode ser usada para selecionar uma subpopulação de espermatozóides com boa mobilidade, viabilidade e integridade acrossômica (Hoogewijs, 2010). Os diferentes constituintes de um ejaculado: espermatozóides, detritos, leucócitos, ROS e plasma seminal possuem diferentes densidades. Adicionalmente, espermatozóides com diferentes propriedades como viabilidade, mobilidade, integridade da cromatina, plasma e acrossoma possuem diferentes densidades. A nível de exemplo, células espermáticas apresentaram uma densidade superior a 1.12 g/ml, apresentando estas uma maior densidade que células espermáticas imaturas; os leucócitos apresentam uma densidade inferior 1.12 g/ml (Stuhtmann, 2011).

Durante este tipo de centrifugação irão permanecer numa localização do gradiente de densidade correspondente à sua própria densidade que é chamado de ponto isopícnico. Contudo uma seleção eficiente dos espermatozóides é dependente do volume, da densidade das camadas da substância utilizada para formar o gradiente de densidade, do diluidor utilizado, do tempo e forças de centrifugação (Stuhtmann, 2011).

Ao deslocarem-se até ao seu ponto isopícnico os espermatozóides irão formar o *pellet* espermático, este é posteriormente resuspendido num diluidor de sémen fresco e lavado através de uma segunda centrifugação. Percoll® foi o primeiro colóide utilizado para seleção de espermatozóides contudo em 1996, a sua utilização foi restrita a usos não clínicos devido à sua toxicidade. Diferentes colóides têm vindo a ser desenvolvidos o que resultou em produtos específicos para cada espécie sendo a sua utilização permitida atualmente. A maior desvantagem da utilização deste tipo de produto prende-se com a limitação do volume que se pode processar em cada um dos tubos de centrifugação, o tempo consumido na preparação das diferentes camadas do *Density Gradient Centrifugation* (DGC). Contudo, foi também descrito em alternativa à DGC a *Single Layer Centrifugation* (SLC) para processar sémen animal que resulta em resultados e qualidade espermática semelhantes, podendo ser

processados volumes maiores por tubo de centrifugação permitindo o processamento de um ejaculado de garanhão (Hoogewijs, 2010).

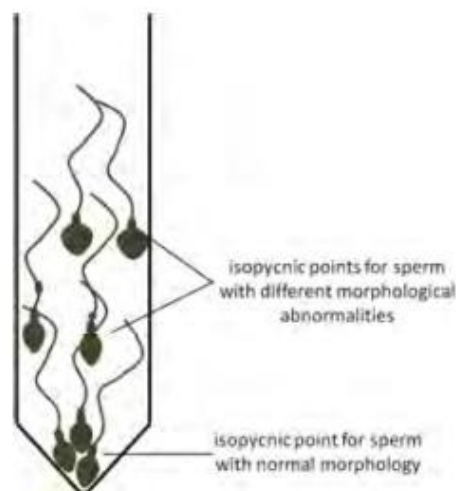


Figura 8 - Representação esquemática dos espermatozoides após centrifugação com recurso a um colóide, com localização dos mesmos de acordo com as suas diferenças isopínicas devido a diferentes morfologias (Hoogewijs, 2010)

Foi demonstrado que a *Single layer centrifugation* (SLC) utilizando um colóide revestido de silano com uma base de sílica otimizado para sémen equino (Androcoll-E®; SLU, Sweden) permite a seleção de espermatozoides com melhor mobilidade, morfologia normal e integridade acrossômica. As suas vantagens prendem-se com a simplicidade de utilização, poupança de tempo comparativamente com DGC aplicada no passado a sémen equino não tendo sido demonstradas diferenças na qualidade do sémen quando as duas técnicas são comparadas (Morrell, J. M., et al., 2009).

Por norma o sémen é centrifugado após a primeira diluição com o objetivo que cada palheta de sémen criopreservado tenha um número suficiente de espermatozoides, apesar disso é a segunda diluição que determina a concentração a que as palhetas serão enchidas e criopreservadas. Foi descrito que a concentração espermática durante a criopreservação influencia a qualidade espermática durante a criopreservação sendo que concentrações espermáticas superiores a 400×10^6 /mL podem influenciar negativamente a mobilidade pós criopreservação. Apesar disto Leipold et al. (1998) não observou diferenças na mobilidade quando o sémen foi criopreservado a uma concentração de 1600×10^6 /mL (Hoogewijs, 2010).

Resuspensão com diluidor crioprotector

A composição do diluidor crioprotector desempenha um papel fundamental na viabilidade do sémen congelado. Ainda que vários diluidores sejam usados em sémen equino, com satisfatórias provas dadas, ao manterem a viabilidade espermática e taxas de prenhez, numa grande percentagem de animais são ainda necessários diluidores alternativos e modificações nas técnicas de congelamento. Açúcares como a glucose, frutose e sorbitol estão naturalmente presentes no plasma seminal e outros como a lactose, sacarose, glucose e trealose são frequentemente adicionados aos diluidores de congelação em várias espécies domésticas, onde atuam como crioprotectores não-penetrantes, substratos energéticos têm também uma ação protetora contra lesões osmóticas e a formação de gelo intracelular principalmente quando aliados a crioprotectores penetrantes (Pojprasatha, et al., 2011).

Estudos comparativos diretos entre diluidores de congelação para sémen equino em condições controladas são ainda escassos, sendo que existem grandes variações entre ejaculados do mesmo garanhão ou entre ejaculados de vários garanhões relativamente á resposta do sémen ao processo de criopreservação. Dois diluidores foram popularizados no passado e variações destes continuam a ser amplamente usados sendo conhecidos na atualidade como INRA e Kenney. Segundo Martin et al. uma maior mobilidade pós descongelação é conseguida com o uso de diluidores constituídos por lactose, ovo, gema-glicerol suplementados com EDTA e bicarbonato de sódio quando comparado com diluidores constituídos apenas por lactose, ovo e gema-glicerol; em relação ao primeiro diluidor referido. Referindo-se uma taxa de prenhez por ciclo de 63%. Palmer et al. propôs o uso de um diluidor constituído por leite desnatado, ovo, gema-glicerol suplementado com uma seleção de açúcares e eletrólitos ao qual foi popularizado sobre o nome de INRA82. Ecot et al. reportou que a fertilidade é mais elevada quando se usa o diluidor INRA 82 comparativamente com o diluidor Kenney (Salazar, et al., 2011).

Acondicionamento do sémen para Criopreservação

Historicamente uma grande variedade de sistemas de acondicionamento para o sémen congelado tem vindo a ser utilizada. Inicialmente, o sémen era congelado em *pellets* que eram produzidos criando orifícios cilíndricos em blocos de gelo seco, que eram posteriormente armazenados em tubos, que eram colocados em nitrogénio líquido. A técnica descrita tinha como maiores desvantagens a falta de uma identificação adequada e o elevado risco de contaminação. Estas desvantagens foram evitadas quando o sémen passou a ser congelado

em embalagens de alumínio achatadas que eram colocadas sobre a superfície do nitrogénio líquido, ou em recipientes de cobre que eram submersos no nitrogénio líquido. Mais tarde, este tipo de sistema de acondicionamento com grandes volumes (20-25 ml a 10-12 ml) foi substituído por palhetas com grandes volumes (4 – 5 ml) que podiam assim armazenar uma única dose. Recentemente, diminui ainda mais para 1.0 ml ou 0.5 ml uma vez, que menores volumes permitem uma temperatura mais uniforme em toda a amostra, durante o processo de criopreservação e o arrefecimento da mesma à alcançado mais rapidamente (Hoogewijs, 2010).

A utilização de *cryotube vials* (3,5 ml) com sucesso em sémen criopreservado em humanos levou à comparação deste sistema de acondicionamento com as palhetas de 0,5 ml, contudo, quando os *cryotube vials* foram utilizados em sémen equino verificou-se que a mobilidade espermática pós descongelação diminuía consideravelmente. A grande desvantagem da utilização das palhetas é a necessidade de utilizar várias palhetas para perfazer uma dose inseminante, o que faz com que leve a um maior manuseamento do sémen, aquando da inseminação e potencialmente a erros no cálculo da dose inseminante (Hoogewijs, 2010).

A utilização de palhetas com menor volume 0.25 ml (utilizadas com frequência em sémen bovino criopreservado) aparentemente não têm influência na qualidade pós-descongelação de sémen criopreservado equino comparativamente com as palhetas de 0.5 ml (Nascimento, 2008).

Refrigeração e Criopreservação

Comparando protocolos e métodos de criopreservação e instruções de inseminação de éguas com sémen criopreservado, estão longe de serem standardizadas como demonstrado pelas diferenças na tabela 3 que resume algumas das diferenças nas diretrizes para o processamento, criopreservação e acondicionamento e descongelamento de sémen equino referenciadas por vários autores (Sieme, 2008).

A velocidade com que se reduz a temperatura do sémen a partir de 37°C é um dos fatores mais importantes para o sucesso do processo de criopreservação, uma vez que as lesões celulares dependem da curva de arrefecimento. O frio também provoca um choque térmico, que afeta as membranas plasmáticas dos espermatozóides, e este é mais pronunciado quando o arrefecimento é demasiado rápido. Os espermatozóides são mais sensíveis à mudança de temperatura na faixa entre 20°C e 0°C. Segundo Watson (1995) a faixa de

temperaturas crítica situa-se entre 12°C e 2°C; Quinn et al. (1980) refere que esta será entre 15°C e 0°C, e Moran et al. (1992) localiza-a entre 19°C e 8°C (Fürst, 2005).

Um dos problemas inerentes a esta primeira fase do processo de criopreservação é a formação de gelo intracelular, as chamadas “lesões de arrefecimento” surgem quando a temperatura do sémen é reduzida dos 37°C para aproximadamente 8°C a taxas de arrefecimento de 0,3°C/ min. Quando as taxas de arrefecimento são superiores a 0,3°C/min as lesões do choque térmico fazem-se sentir e incluem: padrões anormais de movimento (circular ou para trás), rápida perda de mobilidade, lesões de acrossoma, lesões da membrana plasmática, redução do metabolismo e perda de componentes intracelulares (R. Devireddy, 2002).

O autor R. Devireddy 2002, utilizou a técnica *differential scanning calorimetry* (DSC), o que melhorou a compreensão do transporte de água no espermatozóide equino. No estudo em questão é sugerido que a taxa de arrefecimento mais indicada para sémen equino será aproximadamente 29°C/min e que quando é utilizado o diluidor Kenney ou Lactose-EDTA a taxa de arrefecimento apropriada é de 60°C/min. Estas taxas de arrefecimento são indicadas assumindo que não existe formação de gelo intracelular e que os 5% de volume de água osmoticamente activa aprisionada dentro dos spz a – 30°C irá levar a formação de gelo intracelular inócuo.

No protocolo para criopreservação de sémen equino e após se proceder ao arrefecimento gradual/curva de arrefecimento do sémen popularizou-se ao longo dos anos, a utilização de um dispositivo que contém uma raque que se mantém 3cm acima do nível do nitrogénio líquido onde, são depositadas as palhetas ou macrotubos numa posição horizontal com a intenção de congelar o sémen. Neste sistema, a taxa média de congelamento do sémen é de -70° C /minuto (Fürst, 2005).

Tabela 13 - Resumo de protocolos de criopreservação (Sieme, 2008)

Fonte	Diluição	Diluidor de Centrifugação	Forças de Centrifugação	Diluidor de criopreservação	Concentração de Glicerol (%)	Acondicionamento	Criopreservação	Descongelação
Tischer 1979	Colheita da fração rica em spz			Lactose-EDTA-EY	3,5	Tudos de alumínio (20 a 25 ml)	7 a 9 min, Vapores de N ₂	40 C°, 50s
He (1986)	1:1	11% sacarose	350-450 g, 12 min	Sacarose-leite-EY	4-5	Frascos de vidro 1 ml	Vapores de N ₂	Sacarose-Leite
Martin et al.(1979)	1:1	Glucose-EDTA	650 g, 10 min	EDTA- Lactose-EY	5	Macrotüb ® (palheta 4 ml)	Vapores de N ₂ , 20 min	50 C°, 40 s
Loomis et al. (1983)	1:1	Glucose-EDTA	650 g, 15 min	EDTA-Glucose-EY	5	Palheta de 0,5 ml	10 min, Vapores de N ₂ +20→-15 °C: 10 °C/min;	38 °C, 30 s 37 °C, 30 s or 75 °C, 7 s
Cochran et al. (1984)	50×10 ⁶ spz/ml	Citrato-EDTA (20°C) cushion	400g,15 min	Lactose-EDTA-EY	5		+20→-15 °C: 10 C°/min	37 °C, 30 s ou 75 °C, 7 s 37
Palmer (1984)	1:4	INRA82-EY	600 g, 10 min	INRA82-EY	2,5		+4→-140 °C: 60 C°/min	75 C °, 7s e de seguida 35 C°, 10 a 30 s

Fonte	Diluição	Diluidor de Centrifugação	Forças de Centrifugação	Diluidor de criopreservação	Concentração de Glicerol (%)	Acondicionamento	Criopreservação	Descongelação
HÅrd and HÅrd (1991)	50 a 80 ×10 ⁶ spz/ml	Citrato EDTA (30 C°) com cushion	400 g, 15 min	Lactose-EDTA	5		+20→-10 °C: 10 °C/min; -10→-140 C°	75 C°, 7s e de seguida 35 C°, 10 a 30 s
Vidament (2005)	2,5×10 ⁹ spz/50 ml por tubo	Leite desnatado UHT (37C°)	600 g, 10 min	INRA 82-EY	2,5		25 °C/min →+4 °C: 1 h 15 min; +4→-140 °C: 40-60 C°/min	37 °C, 30 s

Descongelação e avaliação final do sémen

Na indústria reprodutiva de equinos são usadas maioritariamente duas taxas de descongelamento. Na taxa mais popular, as palhetas são descongeladas (aquando da IA da égua) sendo colocadas num banho a 37°C por 30 segundos. Esta taxa começou a ser rotina uma vez que nos primórdios da utilização de IA com sémen criopreservado foram realizados estudos em sémen bovino criopreservado tendo-se chegado à taxa em questão, começando então a ser utilizada também para sémen equino criopreservado. Recentemente outra taxa de descongelação tem vindo a ser utilizada com maior frequência, uma vez que se detectou uma melhoria na mobilidade espermática pós-descongelação, contudo esta taxa em que as palhetas são colocadas num banho a 75°C durante 7 segundos seguido de uma imersão de curta duração em água a 37°C não é frequentemente utilizada (Bradford et al., 2002). Existindo exceções a estas taxas como são exemplo os estudos brasileiros com o sémen criopreservado utilizando o diluidor BotuCrio® este é sempre descongelado a uma taxa de descongelamento de 46°C durante 20 segundos (Hoogewijs, 2010).

Segundo Bedford-Guaus (2014), ao testar várias taxas de descongelamento verificou que a taxa mais rápida testada (75°C durante sete segundos) levou a um aumento significativo da percentagem de spz progressivamente móveis e viabilidade comparativamente com as restantes taxas testadas (37°C durante 30 segundos e 60°C durante 8 segundos).

Para que os spz fertilizem um oócito este deverá possuir vários atributos incluindo mobilidade, morfologia normal, integridade da membrana plasmática e um metabolismo suficientemente ativo para produzir energia. A avaliação do sémen após o processo de criopreservação é realizada de modo a predizer o sucesso/fertilidade da amostra, aquando da IA. A mensuração de apenas um dos parâmetros anteriormente referidos irá falhar na deteção de defeitos noutros parâmetros e assim sobrestimar o número de spz férteis por amostra. Apesar disto na indústria reprodutiva equina é aceite como critério de seleção comercial para sémen se este possuir 30 a 35% de spz progressivamente móveis morfologicamente normais (Kuisma, 2006).

Existem inúmeros estudos utilizados para predizer a fertilidade do sémen criopreservado realizados *in vitro* contudo não existem muitos estudos nos quais tenha sido examinada ou demonstrado a ligação entre os testes laboratoriais e a fertilidade *in vivo* do sémen criopreservado. A avaliação da mobilidade para predizer a fertilidade do sémen é o parâmetro utilizado com maior frequência em equinos, contudo o modo como esta se relaciona com a

fertilidade está longe de ser esclarecido e particularmente com sémen criopreservado, não sendo uma medida exata para predizer o potencial de fertilização. Outro parâmetro frequentemente utilizado é a morfologia espermática no entanto, estão descritas fracas correlações entre esta e a fertilidade em sémen fresco. É frequentemente assumido que as condições de sobrevivência dos espermatozóides pré e pós criopreservação são semelhantes. Todavia, existem resultados que suportam que mesmo os espermatozóides que sobrevivem à criopreservação são afetados por este motivo, poder-se-á esperar que os métodos de examinação aplicados ao sémen fresco não sejam tão fidedignos para a avaliação do sémen (P. Kuisma, 2006).

III. Objetivos

O presente estudo teve como objetivos:

- Recolher e analisar a informação de modo a caracterizar o comportamento e características do sémen da raça PSL face ao processo de criopreservação;
- Verificar se existem diferenças entre os seguintes métodos de determinação da concentração espermática: Spermacue, Minitube ® vs. Câmara de Neubauer;
- Verificar se existem diferenças entre dois métodos de determinação da mobilidade espermática: avaliação subjetiva de mobilidade vs. avaliação automatizada (sistema CASA);
- Quantificar a percentagem de perda do número total de espermatozóides após centrifugação para dois protocolos de centrifugação (tempo e força de centrifugação);
- Verificar quais os efeitos na mobilidade de dois protocolos de centrifugação (tempo vs. g's);
- Verificar se existem diferenças na mobilidade e número total de espermatozóides e mobilidade espermática consoante o método de congelação manual e com recurso a uma máquina de criopreservação automática;
- Verificar se as variações na concentração e mobilidade espermática se alteram consoante a época do ano em que foi realizada a colheita do sémen (época reprodutiva vs. contra estação).

IV. Materiais e Métodos

Os dados usados no estudo são referentes a recolhas de sémen para congelamento efetuadas:

1. Na Clínica Veterinária Embriovet, localizada em Muge (de 2008 a 2014) sendo a amostra de ejaculados de 20 garanhões – Laboratório A.
2. No Pólo de Reprodução do Haras de la Gesse, localizado em Boulougne-sur-Gesse, França pelo qual a Clínica Embriovet é responsável pelo manejo reprodutivo. Os dados recolhidos correspondem a colheitas realizadas de 2012 a 2014 correspondendo a amostra a ejaculados de 9 garanhões – Laboratório B.



Figura 9: Manequim de recolha, Embriovet Laboratório A.

Recolha de Sémen

Durante este período a recolha, processamento e congelação do sémen foram sempre efetuados seguindo os mesmos protocolos que de seguida serão descritos pormenorizadamente. ®



Figura 10 – Vários modelos de vaginas artificiais, Embriovet.

As recolhas eram iniciadas com a lavagem peniana para remover o esmegma e sujidade de modo a reduzir a contaminação do sémen, sendo esta realizada utilizando papel e água morna. De seguida, os garanhões eram levados ao manequim onde recorrendo a vaginas artificiais do tipo Hannover ou Missouri se procedia à recolha do sémen que era de imediato transportado para o laboratório, onde o primeiro passo era a separação do gel recorrendo-se à utilização de filtros de celulose para sémen, 150×60mm (Minitube®), com o intuito de separar o gel do ejaculado.

Era então aferido o volume do ejaculado e colocado o mais rapidamente possível no banho-maria a 37°C. Neste momento era recolhida uma amostra de sémen, para posterior análise da concentração e da mobilidade espermática.

Anteriormente à recolha o diluidor INRA 96® era mantido também num banho-maria de modo a ficarem ambos à mesma temperatura (37 °C). Este era então adicionado ao sémen a uma proporção mínima de 1:2 (v/v), sendo que o diluidor adicionava-se sempre e obrigatoriamente sobre o sémen em pequenas porções, fazendo-se escorrer pelas paredes do saco onde o sémen se encontrava de modo a atenuar os choques térmico e osmótico.

Avaliação de sémen fresco

Mobilidade espermática

No âmbito deste estudo, a mobilidade espermática foi aferida recorrendo a estes diferentes métodos (observação subjetiva recorrendo ao microscópio óptico vs. CASA) de modo a aferir se existiam diferenças significativas entre os dois métodos.

Os métodos de avaliação da mobilidade variaram consoante o laboratório e o material disponível, assim em cada um destes foram adotados diferentes procedimentos:

Laboratório A – A mobilidade do sémen fresco era avaliado recorrendo ao Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA). A utilização de métodos automatizados permite a avaliação da motilidade que se revela de extrema importância uma vez que esta é importante na determinação do potencial de fertilidade do espermatozóides (Arruda, et al., 2011). Ao se equipar um microscópio com uma câmara de vídeo as células espermáticas e as suas trajetórias são analisadas automaticamente após serem reconhecidas, sendo atribuída então uma percentagem a cada uma das categorias:

- Mobilidade Total (MT);
- Mobilidade Progressiva (MP);
- Imóveis (IM).

Os dados obtidos no laboratório A a concentração espermática utilizada era aferida recorrendo a câmara de Neubauer e a mobilidade era estimada utilizando o sistema CASA. Para avaliação da mobilidade espermática uma gota de sémen com cerca de 10 µL era observada; que por vezes quando o sistema CASA não conseguia aferir a mobilidade em caso de elevadas concentrações era necessário diluir em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

Laboratório B –A avaliação da mobilidade era realizada através de uma avaliação subjectiva, para isso duas gotas de sémen com cerca de 10 µl, eram colocadas entre uma lâmina e lamela para realizar uma observação de forma subjetiva da mobilidade espermática, ao microscópio óptico. Para isto, a base do microscópio de platina aquecida era ligado a 37°C dez minutos previamente à colheita ser efetuada. As duas gotas eram colhidas a partir do ejaculado o mais rápido possível de modo a evitar que os spz sedimentassem sendo a observação feita a uma ampliação de 400 ×.

Para realizar uma melhor aferição da mobilidade algumas premissas devem ser títas em conta: observar as preparações evitando os limites da lâmina (sempre a mais de 5mm do limite), fazer a categorização do movimento escolhendo os campos aleatoria e rapidamente de modo a evitar uma sobre estimativa, sendo no mínimo observados 5 campos de observação (deslocando a lâmina em “zigzag”, de modo a evitar observação do mesmo campo múltiplas vezes).

O movimento dos espermatozóides era categorizado sendo atribuídas percentagens para:

- Mobilidade Total (MT);
- Mobilidade Progressiva (MP);
- Imóveis (IM).

Esta avaliação era realizada sempre pelos mesmos dois observadores que se mantiveram durante todo o estudo, sendo que estes também avaliaram o vigor (energia) do movimento dos spz e atribuíram uma classificação de 1 a 5, mas devido à subjetividade deste parâmetro e à falta de bibliografia acerca da importância do vigor decidiu-se não utilizar este parâmetro no estudo.

Número total de espermatozoides

Laboratório A e B

O cálculo da concentração espermática é aferido por rotina aquando da recolha de sémen uma vez que é necessário calcular a quantidade de diluidor crioprotector que se poderá adicionar ao sémen colhido aquando da criopreservação, de modo a satisfazer a dose inseminante de 500×10^6 espermatozóides móveis. Contudo, o objetivo da sua obtenção neste estudo prende-se com o cálculo do número total de spz no sémen fresco (*Ntf*) com o intuito de realizar a comparação deste com o número total de espermatozóides no sémen criopreservado (*NTc*).

Em ambos os laboratórios a concentração espermática era avaliada mais comumente utilizando o Spermacue (Minitube®), devido à rapidez da obtenção do resultado contudo sempre que possível e durante o período de estágio para fins de comparação a concentração espermática era aferida também com a câmara de Neubauer.

Para calcular o número total de spz no sémen fresco (*Ntf*) foi obtida a concentração espermática utilizando a câmara de Neubauer ou Spermacue (Minitube ®). Isto é, a concentração espermática (*CTf*) representa o número espermatozóides no sémen fresco (*Ntf*) no volume do ejaculado (*Vi*) ou $CTf = Ntf \div Vi$.

Assim realizou-se, para todos os ejaculados no estudo, o cálculo do produto entre a concentração total espermática e o volume inicial do ejaculado, sendo que $Ntf = CTf \times Vi$, e assim se poder aferir *Ntf*.

Spermacue

Recorrendo a uma micropipeta CAPP® uma gota de sémen puro era retirado aquando do início da avaliação do sémen imediatamente após a colheita do mesmo. Esta gota era utilizada para medir a concentração espermática no Spermacue (Minitube®), que se obtém a concentração espermática em [spz] 10^6 /ml.

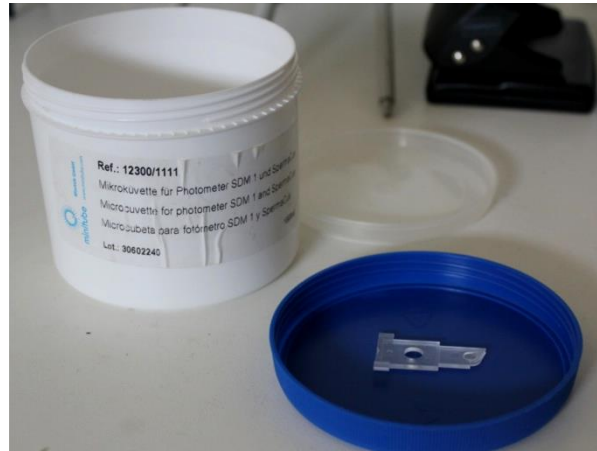


Figura 11- Microcuvete do Spermacue®, Embriovet

Deste modo no laboratório A e B, uma gota de cerca de 10 μ l de sémen fresco era colhida (aquando da aferição do volume do ejaculado) e colocada numa microcuvete específica que era inserida no Spermacue ®. Posteriormente aparecia no visor do equipamento a concentração espermática expressa em spz $\times 10^6$ /ml sendo que o intervalo de resultados era expresso de 20 a 600 milhões de spz por mL.

Câmara de Neubauer

Durante o período do estágio, sempre que possível, assim como em múltiplas amostras colhidas anteriormente era também aferida a concentração espermática utilizando um hemocitómetro que é considerado o método *gold standart* para a aferição da concentração espermática. Com o objetivo de se conhecerem as diferenças entre a concentração obtida utilizando o hemocitómetro e a que se obtia aquando da utilização do Spermacue, (Minitube®). Este procedimento que podemos considerar como controlo de qualidade será de extrema importância para o estudo uma vez que concentração inicial irá influenciar o cálculo da diferença no número total de espermatozóides pré e pós centrifugação.

Deste modo em ambos os laboratórios A e B, era colhida uma segunda gota de sémen fresco, recorrendo a uma micropipeta CAPP, com 25 μ L que era diluída a uma razão de 1:400 (partindo do pressuposto que um número mínimo de 200 spz era contado) numa solução formol salina a 2.3% que era mantida num tubo de Falcon com o intuito de aferir a concentração espermática com recurso à câmara de Neubauer.

Esta foi a câmara escolhida a utilizar no estudo uma vez que esta se afirma como um método standard e de eleição por possuir menor variabilidade de resultados quando comparada com câmaras descartáveis, e não apresentar diferenças significativas de resultados quando comparada com métodos automatizados (como a câmara Mackler®, Leja slide®, Cell Vu®, ou até mesmo o CASA).

Segundo as directrizes de 2010 da WHO se certos procedimentos corretos forem adoptados o intervalo de confiança é de 95% deste modo todos os procedimentos a serem descritos de seguida respeitam as mesmas com as salvaguardas necessárias devido às diferenças que o sémen equino possui em relação ao sémen humano (nomeadamente a concentração que na espécie equina é bastante mais elevada).

Assim sendo, para realizar a contagem de células espermáticas no retículo da câmara de Neubauer um dos fatores com maior importância é a montagem e enchimento da mesma. De seguida é o método utilizado para todas as amostras consideradas no estudo:

1. Aspirar o volume da solução indicado, 10 μ L, (sémen/formol 1:400), utilizando uma ponta de pipeta limpa sem tocar na ponta da mesma.
2. A aspiração só era efetuada após homogeneização. Num espaço de tempo o mais curto possível de modo a evitar a deposição dos spz no fundo do tubo de Falcon.
3. Molhar suavemente os pilares do hemocitómetro com água purificada e pressionar firmemente uma lamela contra os mesmos. Confirmar a presença de múltiplos anéis de Newton para assegurar que a perfeita coaptação da lamela à câmara de Neubauer (a presença de apenas uma ou duas linhas é indicadora de variações na profundidade da câmara).
4. Aproximar e tocar cuidadosamente com a ponta da pipeta no limite inferior de uma das câmaras na zona da ranhura em forma de V.
5. Pressionar lenta e continuamente o êmbolo da pipeta de modo a encher o retículo do hemocitómetro por capilaridade (passivamente) ter em atenção que esta deve ser totalmente preenchida mas deve-se ter o cuidado de não a encher em excesso também. A lamela não deve mexer durante esta ação.

6. Homogeneizar a solução e recolher uma segunda amostra de 10 μ L como descrito anteriormente de modo a preencher o segundo retículo da câmara.
7. Manter a câmara de Neubauer numa posição horizontal por um período mínimo de 4 minutos numa câmara húmida à temperatura da sala, (por exemplo numa placa de *petri* onde se coloca um papel de filtro molhado) de modo a evitar que a preparação seque e que as células sedimentem e consequentemente se imobilizem (World Health Organization, 2010).

A contagem dos spz era efetuada na grelha central da câmara de Neubauer, sendo que nesta área apenas os spz completos (com cabeça e cauda) eram tidos em conta. O limite para a área em que se contavam os spz era definido pela linha intermédia (das três linhas limitofres) presentes nas quadrículas marginais (do grelha central). De modo a evitar contar a mesma célula duas vezes em quadricúlas adjacentes só eram considerados os spz que se sobrepunham às lateral esquerda e superior (“L shape”) como demonstrado na figura 12.

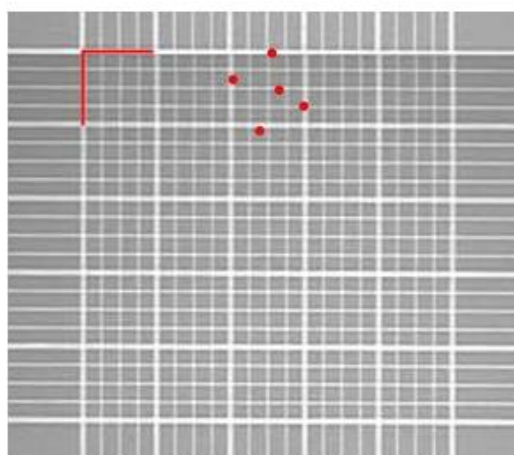


Figura 12 - L Shape, nos limites das quadrículas só as células que se sobrepõem às linhas vermelhas devem ser contadas.

As contagens foram efetuadas utilizando um microscópio óptico na objetiva de 40 $\times$ e com uma ocular de 10 $\times$ e a contagem dos spz foi efetuada nas duas câmaras do hemacitómetro. O resultado final da contagem era apenas aceite/registado se a diferença observada nas duas fosse aceitável para um intervalo de confiança de 95% (como demonstrado na Tabela 4) calculando-se assim a média entre estes dois valores, uma vez que é imprescindível que as contagens sejam representativas da amostra inicial.

Tabela 14 -Diferença aceitável entre duas contagens consecutivas Adaptado- World Health Organization, 2010.

Contagem de espermatozóides	Diferença aceitável	Contagem de espermatozóides	Diferença aceitável
144-156	24	329-346	36
157-169	25	347-366	37
170-182	26	367-385	38
183-196	27	386-406	39
197-211	28	407-426	40
212-226	29	427-448	41
227-242	30	449-470	42
243-258	31	471-492	43
259-274	32	493-515	44
275-292	33	516-538	45
293-309	34	539-562	46
310-328	35	563-587	47

O próximo passo para aferir o número total de spz no ejaculado foi efetuar o cálculo da concentração:

Concentração = [nº de spz/nº de quadriculas contadas] × fator de diluição × 10 000

É de notar que o número total de spz no sémen e concentração são termos diferentes.

Diluição de sémen

O próximo passo na preparação do sémen era a adição do diluidor INRA 96 IMVTechnologies® (mantido a 37°C) sendo a diluição do sémen no mínimo de 1:2 partes diluidor, esta era feita cuidadosamente derramando o diluidor em pequenas quantidades sobre o sémen de modo a evitar um choque térmico e osmótico que poderia danificar os spz. Posteriormente, o sémen, a ser mantido à temperatura ambiente, igual a 21°C, sendo a sala mantida a esta temperatura utilizando-se um ar condicionado.

Após a adição do diluidor realizava-se uma nova avaliação subjectiva do sémen no microscópio óptico avaliando: Mobilidade Total (MT); Mobilidade Progressiva (MP); Imóveis (IM). Estes dados eram retirados apenas como controlo de qualidade do processo de criopreservação, contudo estes não foram tidos em conta no estudo devido a não existirem registos suficientes dos mesmos.

Centrifugação

De seguida procedia-se à centrifugação do sémen numa centrifugadora NF 400 da nüve, para isso o volume total de sémen era distribuído por um número par de tubos Falcon contendo cada um igual volume. Aqui a escolha do protocolo de centrifugação dependia de testes realizados anteriormente em recolhas pré-criopreservação a cada um dos garanhões que permitiram adotar o protocolo que inferia menos danos ao sémen de cada um dos animais.

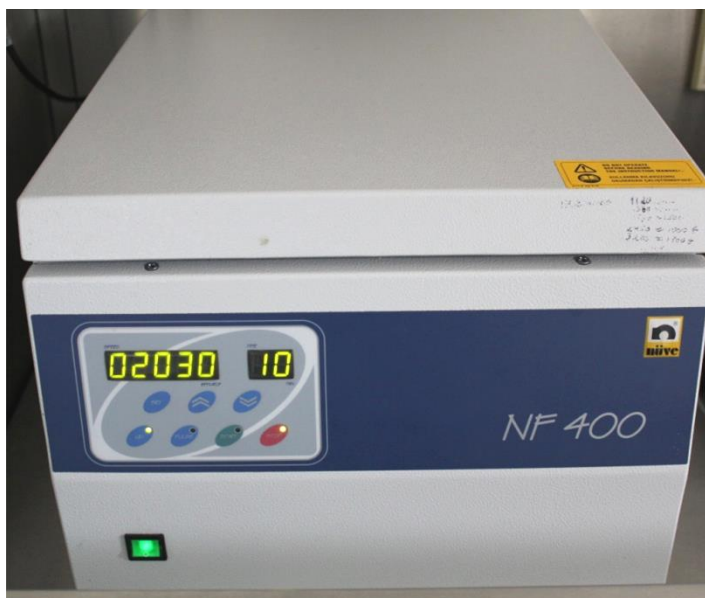


Figura 13 - Centrifuga NF 400 da nüve, Embriovet.

Os protocolos mais usados foram divididos em 2 categorias de modo a analisar qual a contribuição das diferenças no tempo e força de centrifugação, quer na mobilidade quer nas perdas de spz após a mesma, as categorias eram:

I : 600 x g durante 10 a 15 min;

II : 2000 e 2400 x g durante 5 minutos.

Para verificar as diferenças na concentração antes e pós-centrifugação, idealmente ter-se-ia recolhido o sobrenadante após a centrifugação e estimar-se-ia o número de espermatozóides presentes no mesmo, contudo, tal não foi possível uma vez que se tratou de um estudo retrospectivo.

Após a centrifugação o sobrenadante era retirado sendo deixada uma pequena parte (cerca de 5%) de diluidor com o *pellet* que eram mantidos no fundo do tubo Falcon.

De seguida procedia-se à re-suspensão do *pellet* com o diluidor de congelação. Para todos os ganhões e correspondentes amostras analisadas no estudo o protocolo de congelação utilizado foi o Protocolo Gent.

O fabricante do diluidor Gent (Minitube®) não faz acompanhar o diluidor de indicações específicas em como realizar o congelamento do sémen; por este motivo (em ambos os laboratórios) o protocolo específico que foi escolhido pelos clínicos.

Os métodos de congelação utilizados irão variar consoante a data e o laboratório, em 26 dos ganhões observados o congelamento do sémen foi efetuado manualmente, tendo sido as amostras dos restantes 9 ganhões realizada por um congelador automático. As diferenças entre os dois métodos serão analisadas futuramente.

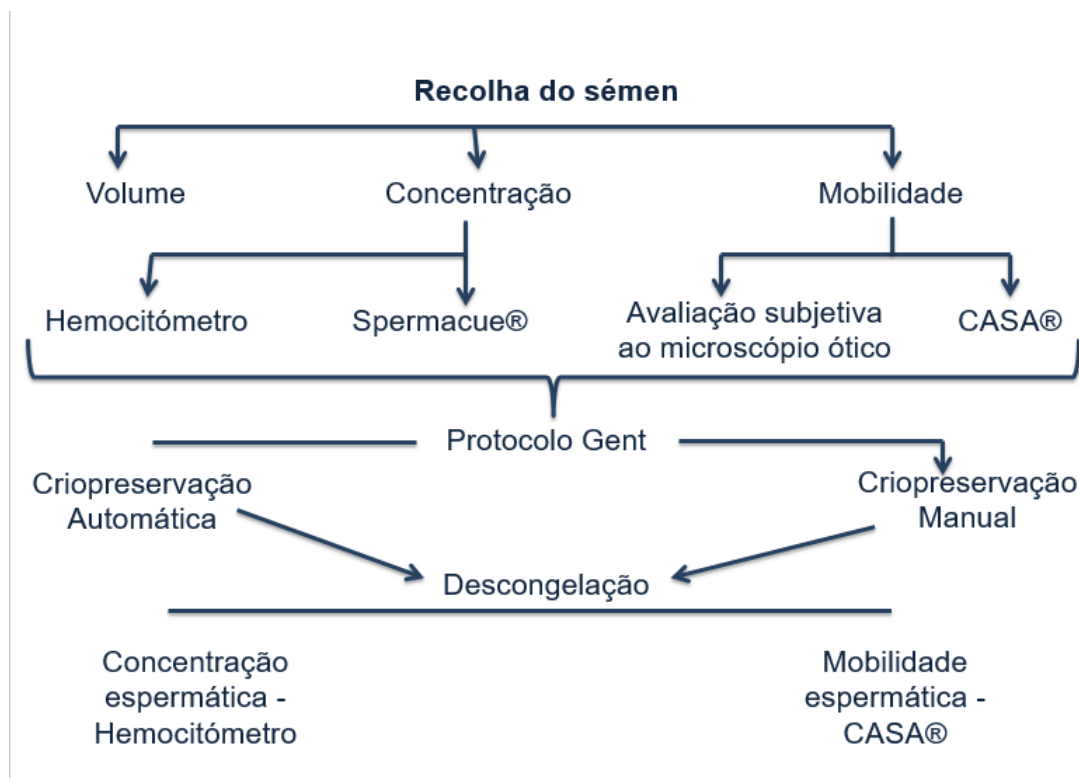


Figura 14 – Esquema do estudo.

Criopreservação

Criopreservação Manual

O processo de criopreservação manual caracterizava-se pelos seguintes passos:

- Enchimento das palhetas de 0,5 ml que eram seladas;
- As palhetas eram colocadas num recipiente que por sua vez era colocado no frigorífico por 30 minutos a uma taxa de arrefecimento de 0,3°C/minuto de modo a baixar a temperatura do sémen de 37°C para 8°C.
- De seguida eram retiradas do frigorífico e eram colocadas em posição horizontal numa “rack” de suporte. Esta era colocada numa caixa de material isolante com azoto líquido de modo a arrefecerem gradualmente por efeito dos vapores do azoto, durante 20 minutos até alcançarem uma temperatura mínima de -20°C, a dez centímetros de altura.
- Ainda na caixa as palhetas eram imersas no azoto líquido sendo arrefecidas a uma taxa de 25 °C/minuto de modo a baixar a temperatura do sémen dos -20 °C até -120 °C.
- As palhetas eram então colocadas num tanque criogénico submersas em azoto líquido a uma temperatura média -196 C°.

Criopreservação Automática

O processo de criopreservação automatizado caracterizava-se pelos seguintes passos:



Figura 15 - Máquina de Criopreservação Automática, (Embriovet).

1. As palhetas eram colocadas em posição vertical na máquina de criopreservação.
2. Já no interior da máquina de criopreservação as palhetas eram arrefecidas a $0,30\text{C}^\circ/\text{minuto}$ até o sémen alcançar temperatura de 5C° ;
3. De seguida a temperatura decaía a uma taxa de $10\text{C}^\circ/\text{minuto}$ até o sémen alcançar os $-0,25\text{C}^\circ$.
4. E por último a temperatura decaía a uma taxa de $25\text{C}^\circ/\text{minuto}$ até o sémen atingir -140C° .
5. As palhetas eram então colocadas num tanque de criogénico submersas azotos líquido a uma temperatura média -196C° .

Avaliação do sémen criopreservado

Laboratórios A e B

De modo a estimar o número total espermático e a mobilidade do sémen após o processo de criopreservação era necessário proceder-se à descongelação do mesmo. Para isso uma palheta era colocada num recipiente com água a 37°C, sendo submersa por 30 segundos.

Número total de espermatozoides no sémen criopreservado

Para se estimar o número total de espermatozoides no sémen criopreservado seguia-se o mesmo princípio utilizado para estimar este valor no sémen fresco, tendo que $NTc = CTc \times Vf$, onde CTc corresponde à concentração total do sémen criopreservado, NTc ao número total de spz no sémen congelado e Vf ao volume final.

Assim a CTc , tanto no laboratório A e B, foi estimada recorrendo à câmara de Neubauer melhorada. Este foi o método escolhido uma vez que as partículas presentes no diluidor de congelamento como gema de ovo, glicerol e antibióticos, iriam influenciar reduzindo a fiabilidade de outros métodos (como o Spermacue® ou o sistema CASA).

Quanto ao Vf , após centrifugação e adição do diluidor Gent o volume obtido era registado sendo este considerado o volume final.

Por fim para todos os indivíduos no estudo, fez-se o produto entre a concentração total espermática no sémen congelado e o volume final.

Mobilidade do sémen congelado

Nos Laboratórios A e B onde foram recolhidos dados do presente trabalho os métodos de avaliação da mobilidade espermática mantiveram-se os mesmos para o sémen fresco e para o sémen congelado. No laboratório A foi utilizado o sistema CASA e no Laboratório B a mobilidade foi avaliada de forma subjetiva utilizando um microscópio óptico.

Análise estatística

Para realizar a análise estatística dos dados recorreu-se ao programa IBM SPSS Statistics 20®. De modo a direcionar a análise estatística e escolher os testes a utilizar inquiriu-se sobre qual a distribuição dos dados. Tendo-se verificado que estes se distribuíam segundo uma distribuição não paramétrica parametricamente, pelo que os testes estatísticos escolhidos tiveram esse fator em atenção.

V. Resultados

1) Sazonalidade

Número total de espermatozóides

A amostra analisada foi constituída por 29 garanhões sendo 311 o número total de ejaculados.

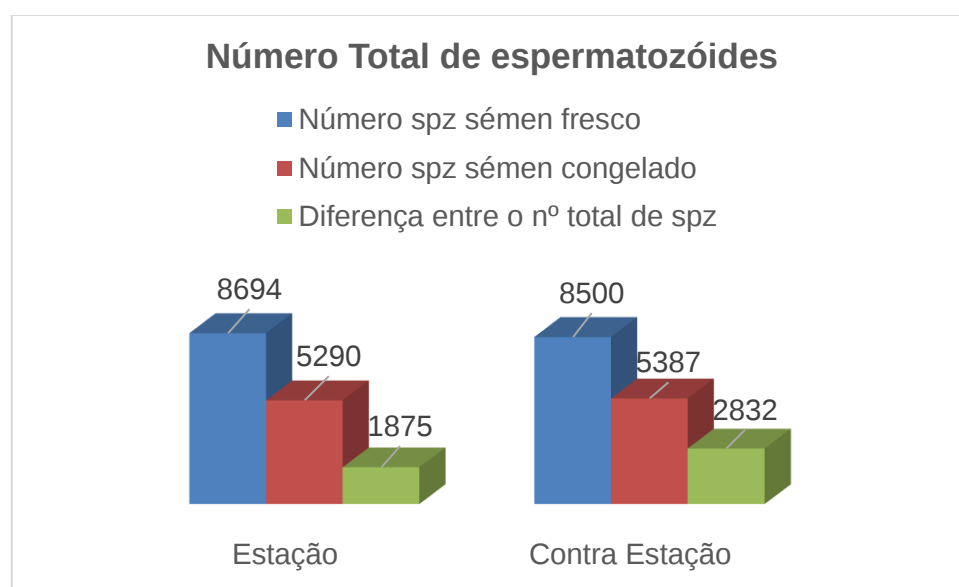


Figura 16 - Medianas referentes ao número total de espermatozóides durante a época reprodutiva (Estação) e fora da mesma (Contra-Estação).

De modo a analisar e caracterizar a amostra foi comparado o número total de espermatozóides consoante a época do ano. As amostras recolhidas foram divididas em dois grupos: aquelas que foram recolhidas durante a época reprodutiva, a qual está identificada na Figura 16 como “Estação” (Março a Julho) e aquelas que foram recolhidas fora desta (Agosto a Fevereiro) identificada como “Contra Estação”. Durante a Estação foram analisados 123 ejaculados e durante a Contra Estação 188 ejaculados.

Criopreservação

Foi também aferida a percentagem de perda durante o processo de criopreservação durante a época reprodutiva e fora dela (Figura 17). Foi então realizado o teste de Mann-Whitney U no qual se verificou que existiam diferenças significativas na distribuição das perdas de espermatozóides durante a época reprodutiva e fora desta ($p= 0,006$).

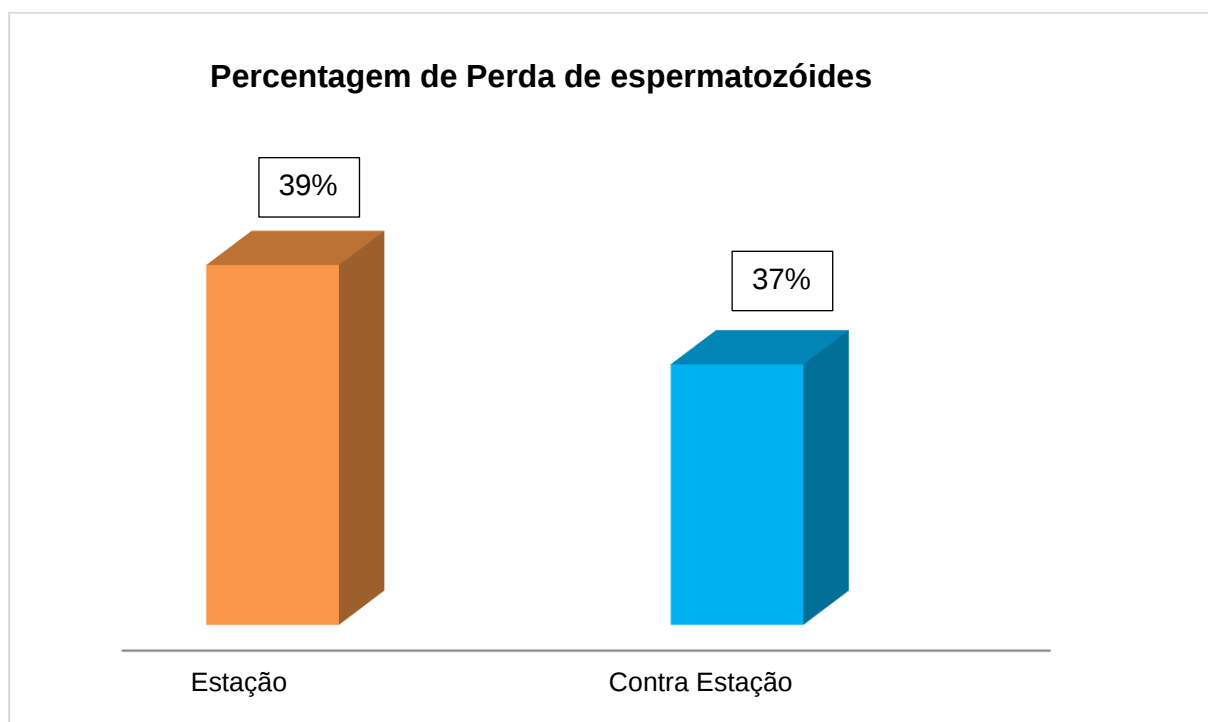


Figura 17 - percentagem de perda de espermatozóides consoante a época reprodutiva.

2) Centrifugação

A Tabela 5 representa a distribuição e caracterização da amostra referente ao número total de espermatozóides consoante o protocolo de centrifugação, indicados com os números I e II (categoria I : 600 x g durante 10 a 15 min; e categoria II : 2000 e 2400 x g durante 5 minutos).

Tabela 15 - Distribuição do número total de espermatozóides da amostra.

Categorias	I	II	Categorias	I	II
Mínimo	284	4290	Mínimo	608	1116
Quartil 25	6196,5	6905	Quartil 25	3620	4085
Quartil 50	9715	8650	Quartil 50	5775	5040
Quartil 75	14508	16684	Quartil 75	7840	7280
Máximo	128881	21115	Máximo	89340	15280
N	189	14	N	204	23

Foi aferida a mediana para o número total de spz no sémen fresco (Figura 18) para cada uma das categorias de centrifugação. O mesmo valor mediano foi aferido para o número total de espermatozóides pós-congelação.

Foi também estimado o valor mediano das diferenças entre o número total de espermatozóides no sémen fresco e o número total de espermatozóides pós-congelação para as duas categorias, para deste modo aferir o número total de espermatozóides que se perde no processo ou percentagem de perdas inerente a cada uma delas.

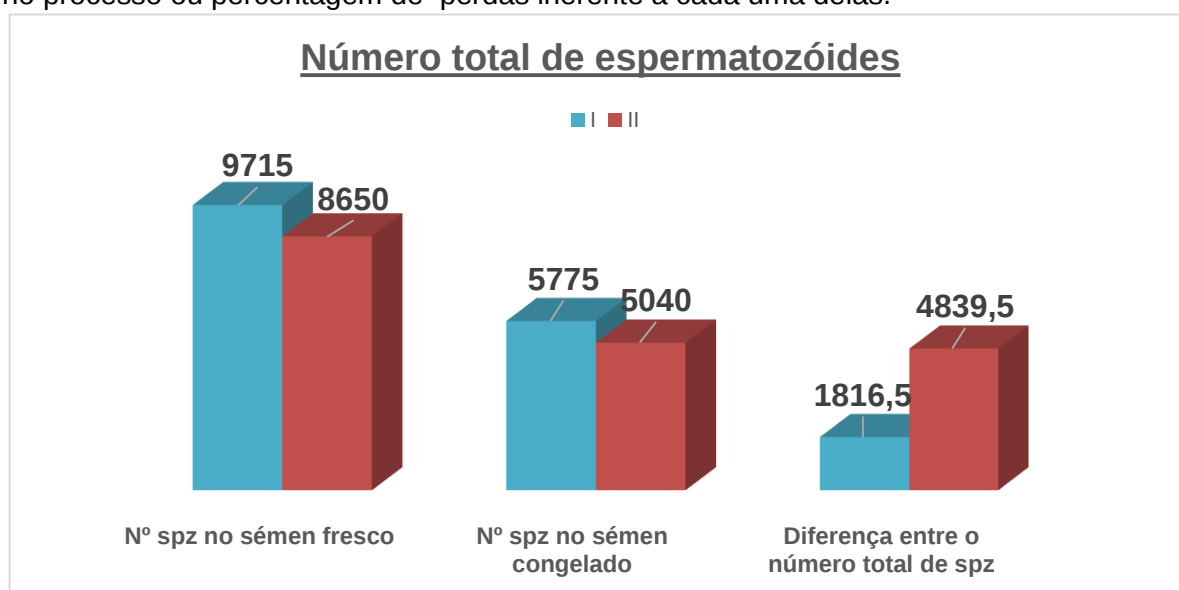


Figura 18 – Medianas referentes ao número total de espermatozóides distribuídas por categoria de centrifugação. Categoria I n=189, Categoria II n= 14.

O número total de espermatozóides foi posteriormente transformado em percentagem de perda de modo a poder-se comparar os valores obtidos com os valores referenciados na bibliografia. Os resultados obtidos estão representados na Figura 19.

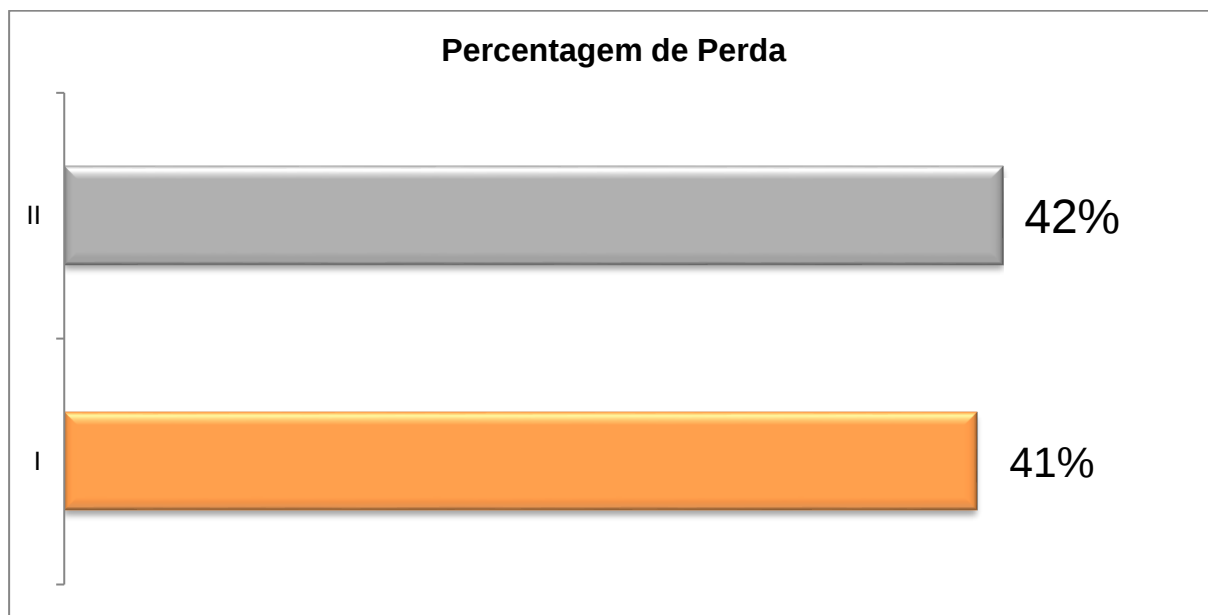


Figura 19 - Percentagem de perda de espermatozóides por categoria de centrifugação. Categoria I n= 189, categoria II n= 14.

Foi posteriormente realizado o teste U de Mann-Whitney, relativamente à diferença entre o número total de spz fresco e o número total de spz no sémen congelado entre cada uma das categorias. Verificou-se que entre a categoria I e II o valor de p foi de 0,452 pelo que se pode afirmar que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre estas.

3) Métodos de aferição da concentração espermática

Durante o período de estágio para além de se aferir a concentração espermática utilizando o Spermacue (Minitube®) foi realizada simultaneamente a concentração espermática recorrendo à câmara de Neubauer em 48 amostras em que existiam valores emparelhados. A Figura 20 representa o valor mediano obtido recorrendo à concentração aferida com a concentração espermática obtida utilizando o Spermacue, Minitube® (representado a verde) ou com a câmara de Neubauer (representada a laranja).

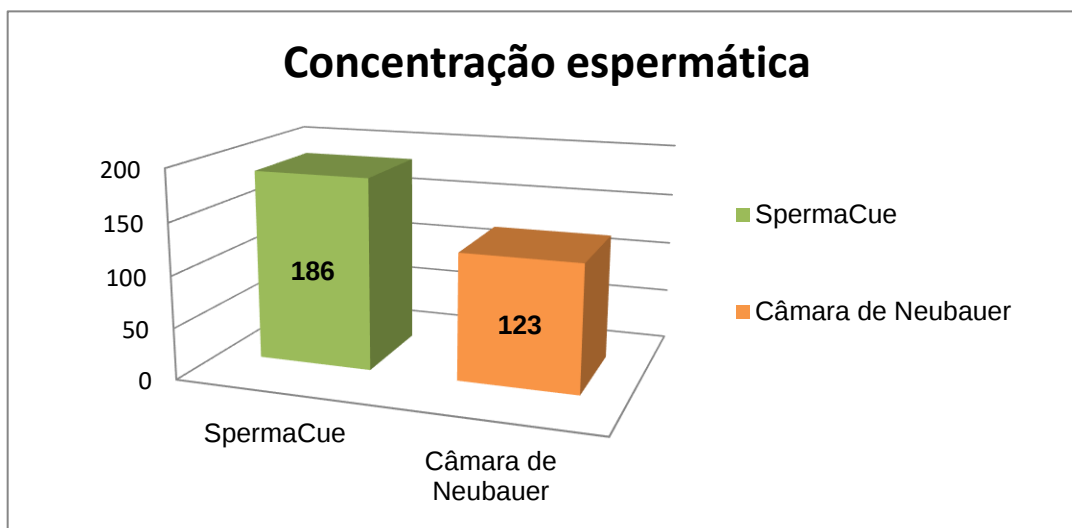


Figura 20 - Diferenças da concentração espermática consoante o método de aferição da mesma.

O valor mediano da concentração espermática aferida utilizando o Spermacue foi relativamente superior ao obtido utilizando a câmara de Neubauer. O teste U de Mann-Whitney foi realizado e o valor $p < 0,001$, pelo que se pode afirmar que existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores da concentração espermática aferidos utilizando o Spermacue ou a câmara de Neubauer.

O coeficiente de correlação de Spearman foi realizado entre o número total de espermatozóides aferido através da concentração medida pelo Spermacue e a câmara de Neubauer. O valor deste foi de 0,53, pelo que podemos afirmar que estas apresentaram correlação positiva, sendo que o número de amostras para o número total de espermatozóides aferido com recurso ao Spermacue foi de 291 e para o número total aferido com recurso à câmara de Neubauer foi de 67.

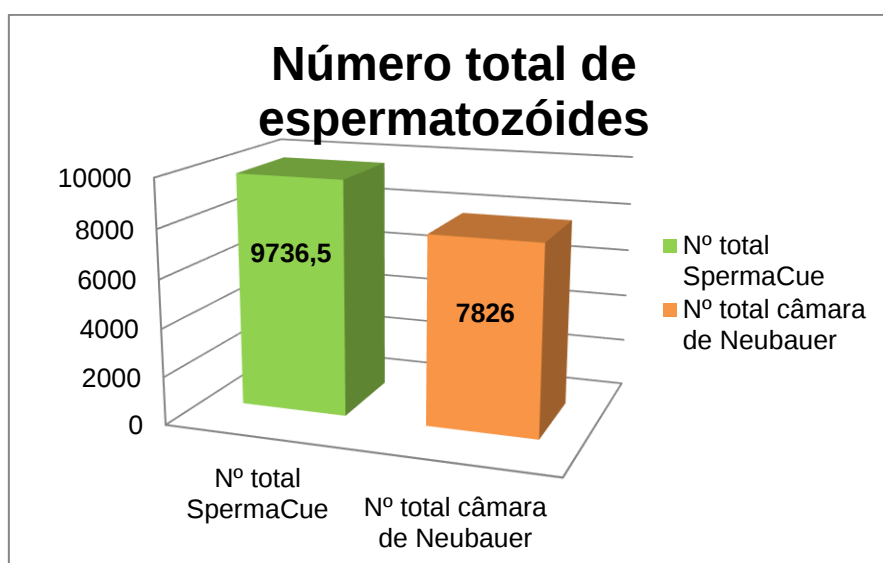


Figura 21 - Diferenças do número total de espermatozóides consoante o método de aferição da concentração espermática

4) Método de criopreservação

Percentagem de Perda

Da totalidade das amostras analisadas 86 foram congeladas com recurso a um método automático (máquina de criopreservação automática) e 240 foram congeladas manualmente. Foi estimado o valor mediano para número total de spz no sémen fresco e pós congelação das amostras que foram congeladas através do método automático e manualmente assim como a percentagem de perda de modo a verificar se existiam diferenças significativas entre os dois métodos (Figura 22 e 23, respectivamente). Foi realizado o teste de Mann-Whitney U de modo a verificar se existiam diferenças entre as percentagens de perda utilizando um método de congelação manual ou a máquina de criopreservação automática, tendo-se verificado que não existiam diferenças significativas dado que $p=0,278$.

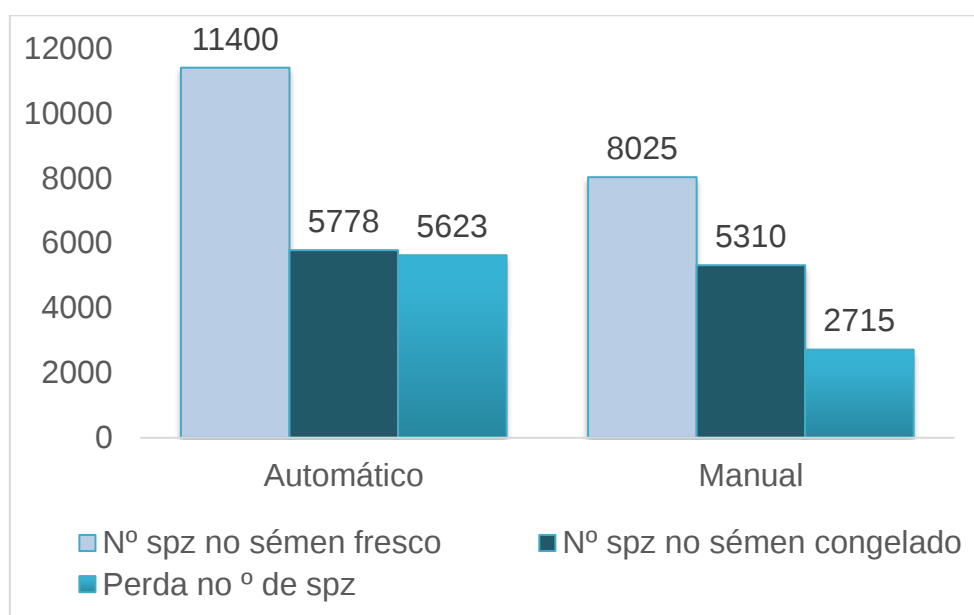


Figura 22 - Número total de espermatozóides consoante o método de congelamento.

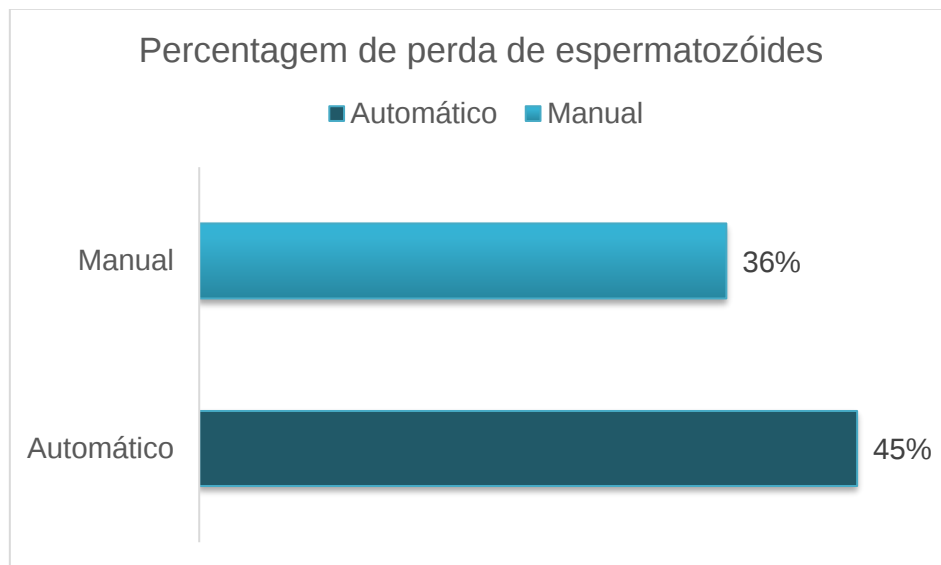


Figura 23 - Percentagem de perda de espermatozóides consoante o método de congelamento.

5) Mobilidade espermática

Estudo da sazonalidade

De modo a analisar e caracterizar a amostra foi comparada a mobilidade total e progressiva consoante a época do ano. As amostras recolhidas foram divididas em dois grupos: aquelas que foram recolhidas durante a época reprodutiva, a qual está identificada na Figura 24 como Estação (Março a Julho) e aquelas que foram recolhidas fora desta (Agosto a Março) identificada como Contra Estação. Durante a Estação foram analisados 123 ejaculados e durante Contra Estação 188 ejaculados.

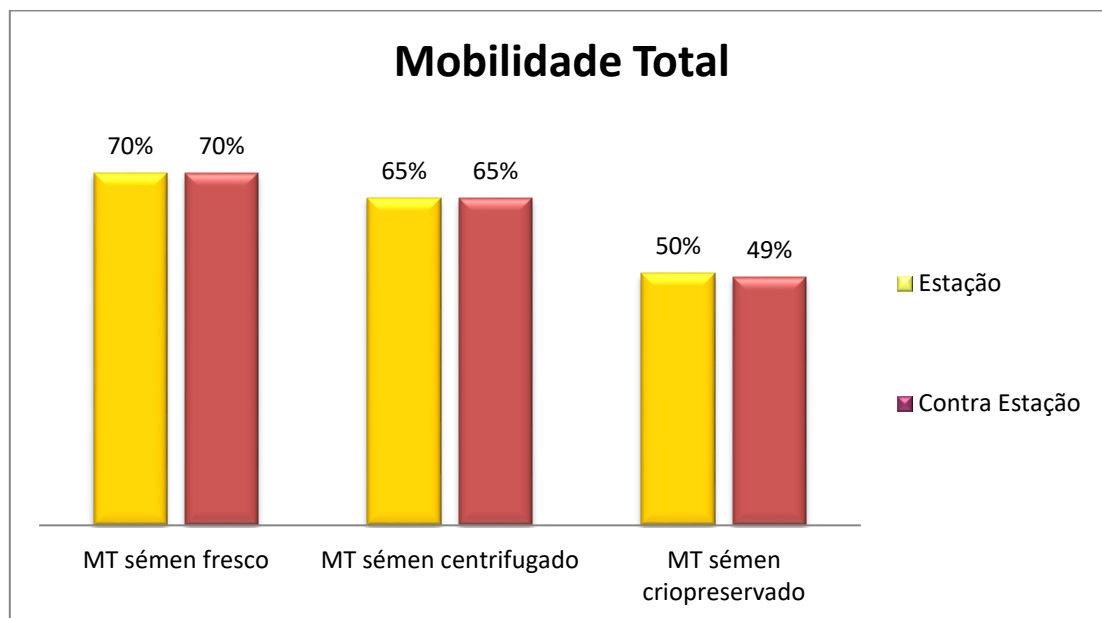


Figura 24 - Medianas da Mobilidade Total consoante a sazonalidade.

O teste Mann-Whitney U foi realizado e verificou-se que não existiam diferenças significativas:

- No sémen fresco entre os ejaculados colhidos na época reprodutiva e fora dela não existiram diferenças significativas $p=0,155$;
- No sémen centrifugado entre os ejaculados colhidos na época reprodutiva e fora dela não existiram diferenças significativas $p=0,245$;

- No sémen criopreservado entre os ejaculados colhidos na época reprodutiva e fora dela não existiram diferenças significativas $p=0,768$.

Foi igualmente estudada a mobilidade progressiva nos mesmos grupos (figura 25).

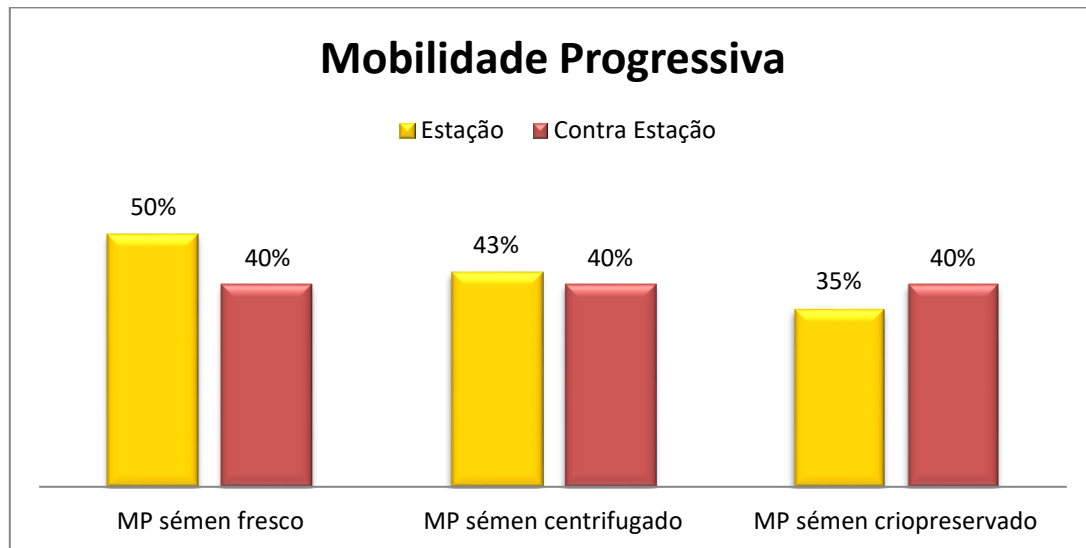


Figura 25 - Medianas da Mobilidade progressiva consoante a sazonalidade.

O teste U de Mann-Whitney foi realizado e verificou-se que:

- No sémen fresco entre os ejaculados colhidos na época reprodutiva e fora dela existiam diferenças significativas $p < 0,001$;
- No sémen centrifugado entre os ejaculados colhidos na época reprodutiva e fora dela existiam diferenças significativas $p=0,007$;
- No sémen criopreservado entre os ejaculados colhidos na época reprodutiva e fora dela não existiam diferenças significativas, $p=0,758$.

6) Impacto do Protocolo de Centrifugação

Mobilidade Total

No seguinte gráfico estão representadas as medianas da mobilidade total para cada uma das categorias de centrifugação anteriormente referidas.

A mobilidade total foi assim avaliada na totalidade dos 327 ejaculados consoante a categoria de centrifugação. A Tabela 5, indica o número de ejaculados (N) nos quais foi analisada a mobilidade espermática total no sémen: fresco, após centrifugação e após criopreservação.

Tabela 6 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática total.

Mobilidade Total (MT)	I	II
MT sémen fresco	148	79
MT sémen centrifugado	63	76
MT sémen criopreservado	53	53

Na Figura 26 representam-se as medianas da mobilidade total espermática consoante a categoria espermática. Foi realizado o teste de Mann-Whitney U de modo a verificar se existiam diferenças entre as categorias de centrifugação I e II:

- Relativamente à mobilidade total no sémen fresco e centrifugado verificou-se que não existiam diferenças significativas sendo os valores de $p = 0,102$ e $p = 0,423$, respectivamente.
- Relativamente à mobilidade total no sémen criopreservado verificou-se que existiam diferenças significativas, sendo o valor de $p < 0,001$.

Foi também realizado o teste de Friedman de modo a verificar se existiam diferenças significativas na distribuição medianas dentro de cada categoria. Verificou-se que dentro da categoria I as diferenças na mobilidade ao longo do processo de criopreservação eram significativas ($p < 0,001$), enquanto que para a categoria II não existiam diferenças significativas ($p = 0,302$).

Deste modo, para a categoria I foi-se realizar o teste Wilcoxon de modo a verificar entre que pares de categorias existiam as diferenças apontadas pelo teste de Friedman:

- Diferenças entre mobilidade total no sémen fresco e o sémen centrifugado: não existem diferenças significativas ($p = 0,734$).
- Diferenças entre mobilidade total no sémen fresco e o sémen criopreservado: existem diferenças significativas ($p < 0,001$).
- Diferenças entre mobilidade total no sémen criopreservado e o sémen centrifugado: existem diferenças significativas ($p < 0,001$).

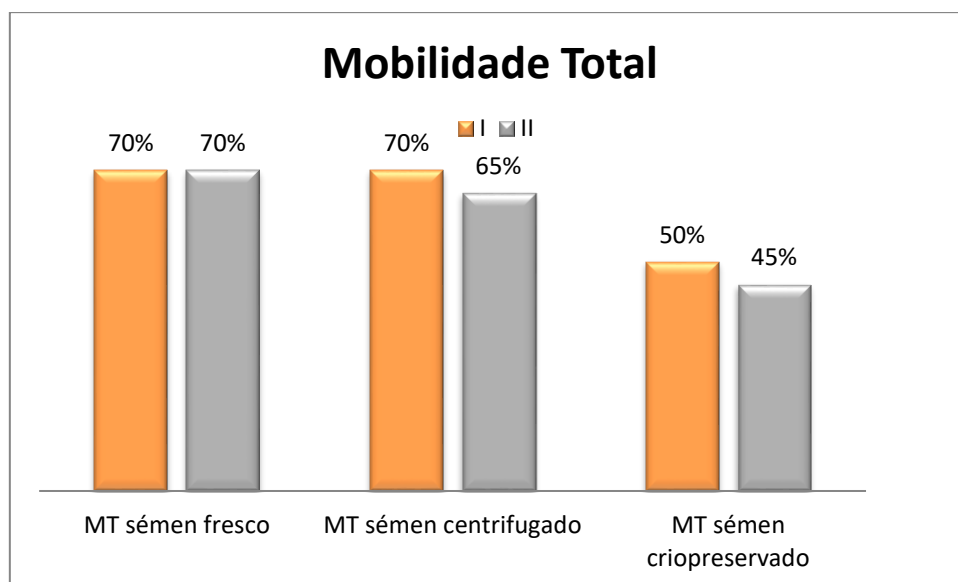


Figura 26 - Medianas da Mobilidade Total consoante a categoria de centrifugação.

Mobilidade progressiva

A mobilidade progressiva foi avaliada na totalidade dos 327 ejaculados consoante a categoria de centrifugação. A tabela 6, indica o número de ejaculados (N) nos quais foi analisada a mobilidade espermática progressiva no sémen: fresco, após centrifugação e após criopreservação.

Tabela 16 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática progressiva.

Mobilidade Progressiva (MP)	I	II
MP sémen fresco	149	79
MP sémen centrifugado	63	76
MP sémen criopreservado	124	76

Na figura 27 representam-se as medianas da mobilidade progressiva espermática consoante a categoria espermática. Foi realizado o teste de Mann-Whitney U de modo a verificar se existiam diferenças entre as categorias de centrifugação I e II:

- Relativamente à mobilidade progressiva no sémen fresco e centrifugado existiam diferenças significativas sendo os valores de $p < 0,001$;
- Relativamente à mobilidade progressiva no sémen criopreservado verificou-se que não existiam diferenças significativas sendo o valor de $p = 0,149$.

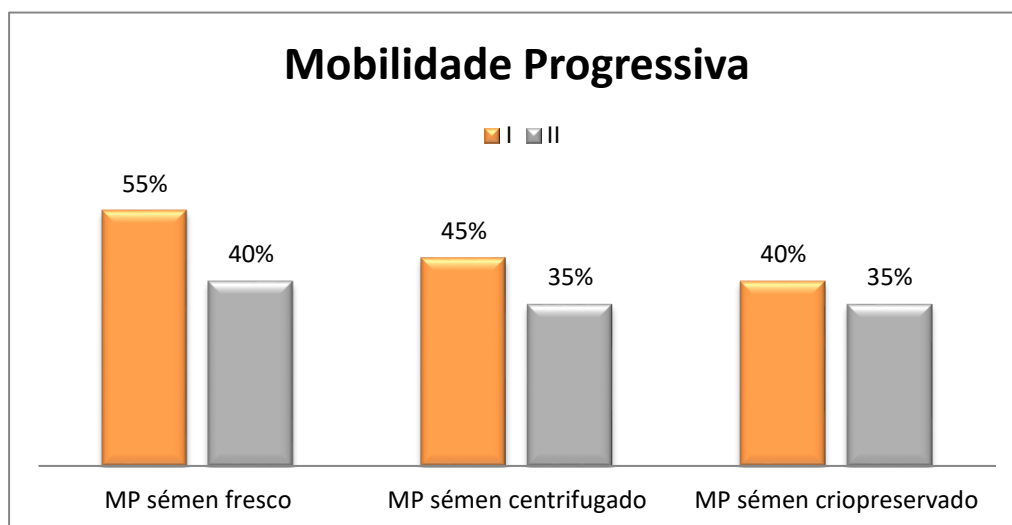


Figura 27 - Medianas da Mobilidade Progressiva consoante a categoria de centrifugação.

Foi também realizado o teste de Friedman de modo a verificar se existiam diferenças significativas na distribuição medianas dentro das duas categorias da mesma variável. Verificou-se que dentro da categoria I as diferenças na mobilidade progressiva ao longo do processo de criopreservação eram significativas ($p < 0,001$), enquanto que para a categoria II não existiram diferenças significativas ($p = 0,238$).

Deste modo, para a categoria II foi-se realizar o teste Wilcoxon de modo a verificar onde existiam as diferenças apontadas pelo teste de Friedman:

- Diferenças entre mobilidade progressiva no sémen fresco e o sémen centrifugado: não existem diferenças significativas ($p = 0,348$).
- Diferenças entre mobilidade progressiva no sémen fresco e o sémen criopreservado: existem diferenças significativas ($p < 0,001$).
- Diferenças entre mobilidade progressiva no sémen criopreservado e o sémen centrifugado: existem diferenças significativas ($p < 0,001$).

7) Impacto do método de aferição da mobilidade espermática na aferição da mesma

Mobilidade Total

A mobilidade espermática total foi avaliada na totalidade dos 327 ejaculados consoante o método que se utilizou para aferição da mobilidade: método CASA ou avaliação subjetiva da mobilidade com recurso a microscópio óptico. A tabela 8, indica o número de ejaculados (N) nos quais foi analisada a mobilidade espermática total no sémen: fresco e criopreservado, consoante o método de aferição da mobilidade espermática.

Tabela 17 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática total.

Mobilidade Total (MT)	CASA	Avaliação Subjetiva
MP sémen fresco	81	145
MP sémen criopreservado	58	120

Na Figura 28 representam-se as medianas da mobilidade total espermática consoante a o método de aferição da mesma. Foi realizado o teste de Mann-Whitney U de modo a verificar se existiam diferenças entre as mobilidades totais aferidas utilizando o método CASA ou realizando uma avaliação subjetiva da mobilidade com recurso a microscópio óptico:

- Relativamente à mobilidade total no sémen fresco existiam diferenças significativas sendo os valores de $p < 0,001$;
- Relativamente à mobilidade total no sémen criopreservado existiam diferenças significativas sendo os valores de $p < 0,001$.

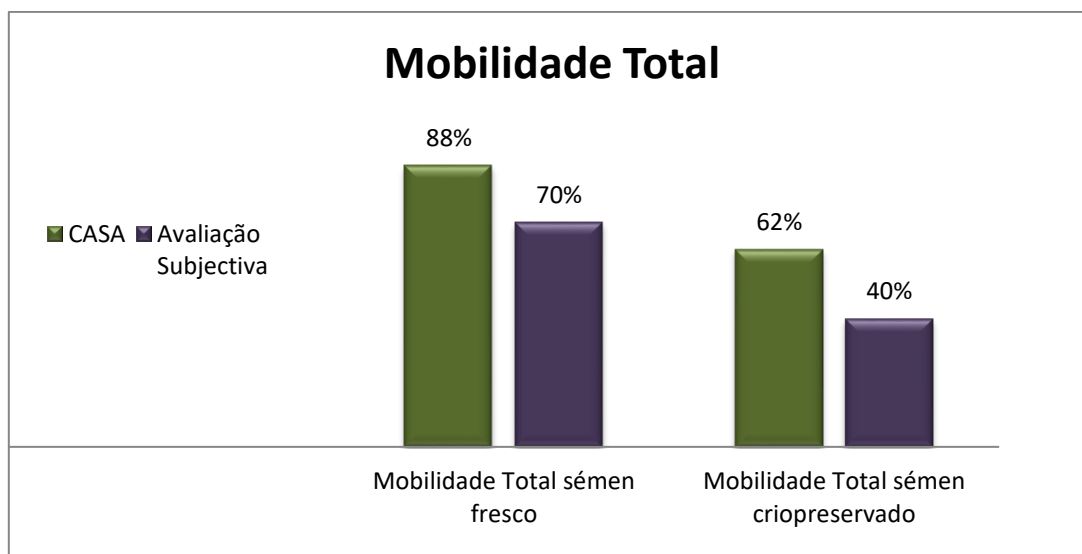


Figura 28 - Medianas da Mobilidade Total consoante o método de aferição da mesma.

Mobilidade progressiva

A mobilidade espermática progressiva foi igualmente avaliada na totalidade dos 327 ejaculados consoante o método que se utilizou para aferição da mobilidade: método CASA ou avaliação subjetiva da mobilidade com recurso a microscópio óptico. A tabela 9 indica o número de ejaculados (N) nos quais foi analisada a mobilidade espermática total no sémen: fresco e criopreservado, consoante o método de aferição da mobilidade espermática.

Tabela 18 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática progressiva.

Mobilidade Progressiva (MP)	CASA	Avaliação Subjectiva
MP sémen fresco	82	145
MP sémen criopreservado	58	141

Na Figura 29 representam-se as medianas da mobilidade espermática progressiva consoante a o método de aferição da mesma. Foi realizado o teste de Mann-Whitney U de modo a verificar se existiam diferenças entre as mobilidades progressivas aferidas utilizando o método CASA ou realizando uma avaliação subjetiva da mobilidade com recurso a microscópio óptico:

- Relativamente à mobilidade progressiva no sémen fresco, existiam diferenças significativas sendo os valores de $p < 0,001$;
- Relativamente à mobilidade progressiva no sémen criopreservado, existiam diferenças significativas sendo os valores de $p < 0,001$.

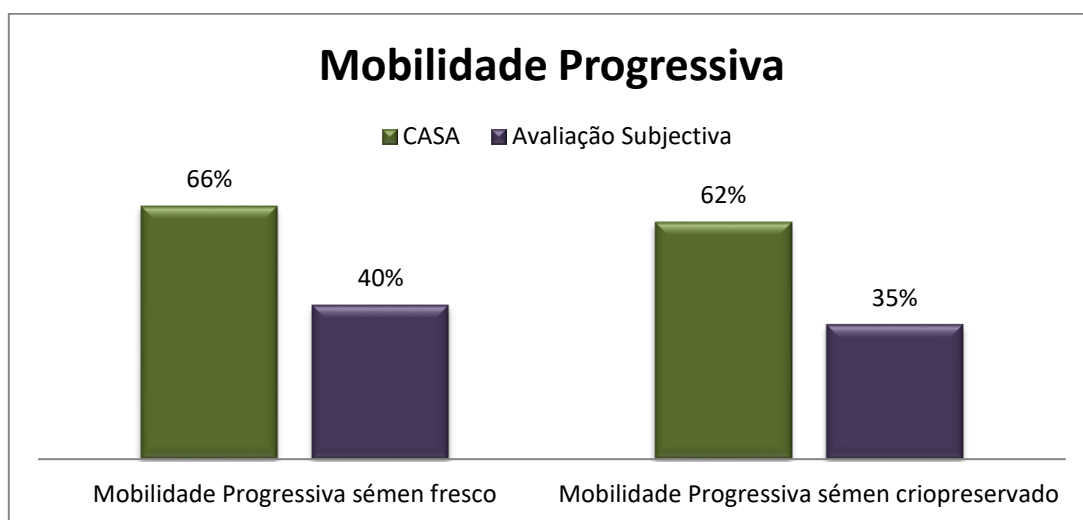


Figura 29 - Medianas da Mobilidade espermática progressiva consoante o método de aferição da mesma.

8) Impacto do método de criopreservação na mobilidade espermática

Mobilidade Total

A mobilidade total foi avaliada na totalidade dos 327 ejaculados consoante o método que se utilizou para efetuar a criopreservação do sémen. A tabela 10, indica o número de ejaculados (N) nos quais foi analisada a mobilidade espermática total no sémen: fresco e criopreservado, consoante o método as amostras foram criopreservadas por um método manual ou com recurso a uma máquina automática de criopreservação.

Tabela 19 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática total.

Mobilidade Total (MT)	Manual	Automático
MP sémen fresco	171	57
MP sémen criopreservado	138	41

Na Figura 30 representam-se as medianas da mobilidade total espermática consoante a o método de criopreservação. Foi realizado o teste de Mann-Whitney U de modo a verificar se existiam diferenças entre as mobilidades totais aferidas utilizando um método de criopreservação manual ou uma máquina de criopreservação automática:

- Relativamente à mobilidade total no sémen criopreservado existiam diferenças significativas sendo os valores de $p < 0,001$.

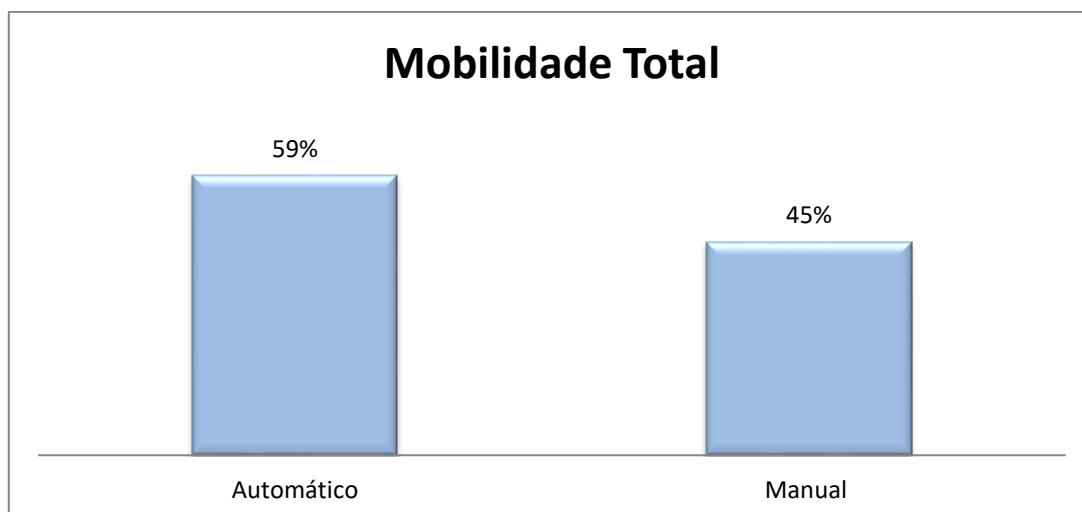


Figura 30 - Mobilidade Total do sémen criopreservado consoante o método de criopreservação.

Mobilidade progressiva

A mobilidade progressiva foi avaliada na totalidade dos 327 ejaculados consoante o método que se utilizou para efetuar a criopreservação do sémen. A tabela 11, indica o número de ejaculados (n) nos quais foi analisada a mobilidade espermática total no sémen: fresco e criopreservado, consoante o método as amostras foram criopreservadas por um método manual ou com recurso a uma máquina automática de criopreservação.

Tabela 20 - Número de amostras analisadas para a mobilidade espermática progressiva.

Mobilidade Progressiva (MP)	Manual	Automático
MP sémen fresco	171	58
MP sémen criopreservado	159	41

Na Figura 31 representam-se as medianas da mobilidade progressiva consoante o método de criopreservação. Foi realizado o teste de Mann-Whitney U de modo a verificar se existiam diferenças entre as mobilidades totais aferidas utilizando um método de criopreservação manual ou uma máquina de criopreservação automática:

- Relativamente à mobilidade progressiva no sémen criopreservado existiam diferenças significativas sendo os valores de $p < 0,001$.

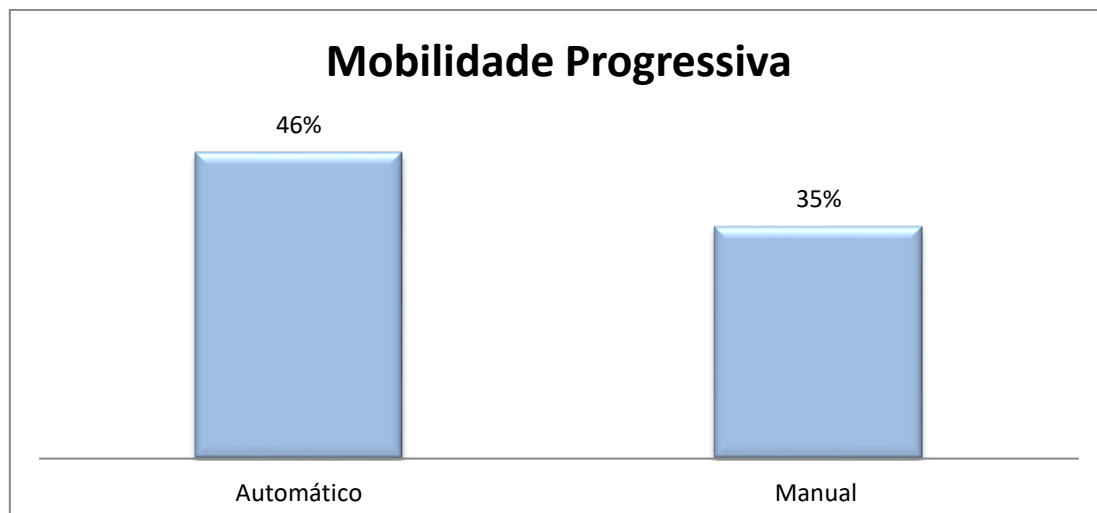


Figura 31 - Mobilidade Progressiva do sémen criopreservado consoante o método de criopreservação.

9) Correlações entre a concentração espermática a mobilidade espermática total e progressiva

Realizou-se o teste de Spearman de modo a verificar se as correlações entre a concentração espermática e a mobilidade espermática total e progressiva. Verificou-se que:

1. Para a mobilidade espermática total:

1.1. No sémen congelado existiu uma correlação significativa negativa com a concentração espermática a um nível de 0,01 ($Rho = -0,239$; $p = 0,02$).

2. Para a mobilidade espermática progressiva:

2.1. No sémen congelado existe uma correlação significativa negativa com a concentração espermática a um nível de 0,01 ($Rho = -0,216$; $p = 0,03$).

VI. Discussão

1. Impacto da Sazonalidade

É sabido que existem diferenças nos parâmetros espermáticos ao longo do ano, segundo o autor F. Janett (2014) num estudo realizado na Codelaria Nacional Suíça colheitas foram feitas uma vez por mês ao longo de um ano em garanhões da raça Freiburger; este refere que a concentração espermática durante a Primavera e Verão era significativamente mais baixa comparativamente com a concentração espermática no Outono e Inverno contudo o número total de espermatozóides teve o seu valor mais elevado a meio do Verão.

A autora Gamboa, 2011 avaliou a variação de vários parâmetros espermáticos consoante a época do ano, como: funcionalidade das mitocôndrias, a qualidade do ADN nuclear, a estabilidade, a funcionalidade, a integridade, a membrana celular e do acrossoma, a oxidação dos fosfolípidos de membrana para a raça PSL. Esta refere que fora da época reprodutiva ocorre diminuição: do volume seminal, vitalidade, espermatozóides progressivamente móveis e morfológicamente normais. Refere ainda que a concentração espermática aumenta e a mobilidade espermática não sofre alterações durante o Inverno mas até Julho verifica-se uma diminuição desta.

1.1. Número total de espermatozóides: Verificou-se que ocorriam diferenças significativas para o número total de espermatozóides durante a época reprodutiva e fora dela. Sendo que durante a época reprodutiva a mediana da percentagem de perda para o número de espermatozóides foi relativamente mais alta, o que está de acordo com os achados de Gamboa (2011) e F. Janett (2014) uma vez que a concentração espermática é mais elevada durante o Inverno o número total de espermatozóides no sémen fresco será mais elevado e as percentagens de perda serão menores.

1.2. Mobilidade espermática Total: verificou-se que não existiam diferenças significativas entre os ejaculados colhidos dentro da época reprodutiva e fora dela tendo sido as medianas relativamente semelhantes.

1.3. Mobilidade espermática progressiva: verificou-se que existiam diferenças significativas entre os ejaculados colhidos dentro da época reprodutiva e fora dela sendo que a mediana para a mobilidade progressiva foi relativamente menor para os

ejaculados colhidos fora da época reprodutiva. O que é concordante com os resultados apresentados por Gamboa (2011).

2. Protocolos de Centrifugação

Um dos objetivos do estudo foi aferir com qual dos protocolos de centrifugação eram obtidos melhores resultados relativamente ao número total de espermatozóides e á mobilidade total e progressiva. Assim se tivesse tido oportunidade a desenhar o estudo (ao invés de analisar dados á posteriori como foi realizado) e de modo a ter uma maior precisão dos dados em todos os ejaculados os parâmetros a avaliar deveriam ter sido medidos:

- Através de ambos os métodos usados/avaliados: CASA vs. Avaliação subjetiva para a mobilidade espermática; Câmara de Neubauer vs. Spermacue[®] para a concentração espermática/número total de spz; método de criopreservação manual vs. máquina de criopreservação automática de modo a o valor de n ser igual em todas as categorias.
- Vários timings: imediatamente após a colheita do sémen, após a centrifugação; após re-suspensão do *pellet*, no sobrenadante aspirado e finalmente após criopreservação.

2.1. Número total de espermatozóides

A distribuição do número total de spz representada na tabela 5 demonstra que existiu uma grande variação do número de ejaculado uma vez que este é um estudo em que a recolha dos dados foi realizada de um modo retrospectivo existe alguma variação entre o número de indivíduos (N) em cada uma das categoria podendo-se assim atribuir alguma variação dos dados obtidos a isso mesmo. Ainda assim é de referir que os diluidores utilizados e o protocolo de criopreservação foi o mesmo para todos os garanhões e respetivos ejaculados e o momento do ano em que foram colhidos foram distribuídos aleatoriamente pelas categorias de centrifugação.

Deste modo relativamente ao número total de espermatozóides a percentagem de perda foi aferida através da diferença entre o número total de spz medido após a colheita e no sémen congelado. Todas as amostras analisadas foram congeladas utilizando o mesmo diluidor (Gent), o mesmo protocolo de criopreservação sendo que o único parâmetro que variou entre

estas foi o protocolo de centrifugação por isso pode-se e atribuir as diferenças observadas nas variáveis analisadas à centrifugação.

A percentagem de perda aferida no estudo para a categoria I foi de 41%. Esta é a categoria standard (600 x g 10 a 15 minutos) na bibliografia consultada é amplamente aceite que a percentagem de perda atribuída à centrifugação com estas características ficam entre os 20 e os 30% embora relatadas perdas até 46%.

A percentagem de perda aferida no estudo para a categoria II foi de 42%. Esta categoria apresenta forças de centrifugação elevadas (2000 a 2400 x g) durante 5 minutos. Por norma forças de centrifugação desta ordem são usadas com um *cushion* no entanto aquando da utilização deste utilizam-se protocolos com a duração de 20 minutos.

Todas as categorias apresentaram perdas superiores às esperadas e para tal várias causas poderão ser hipotetizadas:

- Segundo Tischner M, 1979, os ganhões têm demonstram um elevado nível de variabilidade individual de sobrevivência após o processo de criopreservação.
- A centrifugação convencionalmente é realizada em tubos de falcon de 40 mL, segundo M. Ferrer, 2012, ao reduzir o volume de cada tudo para 20 mL as perdas são reduzidas em 5%.O procedimento das clínicas onde os dados foram recolhidos não possuía um volume fixo por tudo de falcon aquando da centrifugação o que poderá ter causado maiores perdas.
- Segundo M. Ferrer, 2012 maiores concentrações espermáticas levam á formação de *pellets* de maiores dimensões após centrifugação o que leva a maiores perdas espermáticas. Amostras em estudo apresentam grande variação de concentrações, as concentrações muito elevadas poderão ter influenciado as percentagens de perda.

2.2. Mobilidade espermática

Segundo o trabalho de Len, 2008 os efeitos da centrifugação sobre os espermatozóides equinos não estão completamente esclarecido sendo que alguns autores demonstraram que existem um efeito prejudicial na mobilidade espermática. Devido à falta de entendimento acerca dos efeitos da centrifugação utilizam-se forças conservativas como as utilizadas na categoria I. Ainda assim existem algumas autores que se referem aos efeitos destas forças de centrifugação sobre a mobilidade espermática: Jasko D.J., 1992 refere que protocolos de centrifugação na ordem dos 370, 400 ou 829 x g durante cinco minutos não provocavam efeitos prejudiciais sobre a mobilidade espermática se 10 % do plasma seminal fosse mantido; Cochran, 1984 encontrou resultados semelhantes referindo também que o protocolo de 650 x g durante 15 minutos tem efeitos prejudiciais sobre a mobilidade espermática progressiva atribuindo os efeitos prejudiciais sobre a mobilidade a forças físicas que provocam a compactação do *pellet* espermático. Heitland, 1996 conduziu um estudo em que verificou que o tempo tem um efeito mínimo sobre a mobilidade espermática.

Mobilidade Total espermática

Segundo P.R. Loomis, 2007 um ejaculado não deverá ser criopreservado se a a mobilidade total espermática for inferior a 50 %. O mesmo autor refere também que bons congeladores produzem ejaculados cuja mobilidade total espermática pós descongelação é superior a a 40 % e os maus congeladores mobilidade total espermática inferior a 20 %. A mediana para a mobilidade total no sémen fresco da amostra analisada foi de 70% para ambas as categorias) e no sémen criopreservado foi de 50% e 45% para a categoria I e II respectivamente (analisada pós descongelamento) pelo que se pode afirmar que mais de metade da amostra pode-se considerar proveniente de bons congelador e estava apta á partida para ser sujeita ao processo de criopreservação. No estudo observou-se que ao longo do processo de criopreservação não existiam diferenças significativas nos ejaculados da categoria II ($p = 0,302$) e contrariamente existiam diferenças significativas nos ejaculados da categoria I, mais propriamente existiram diferenças significativas entre a mobilidade total no sémen fresco comparativamente ao sémen criopreservado e no sémen centrifugado em relação ao criopreservado. Isto significa que as perdas de mobilidade total ao longo do processo de criopreservação foram mais marcadas na categoria II especialmente após a centrifugação apesar das medianas para esta categoria apresentarem valores relativamente mais altos.

Contudo ao comparar as duas categorias verificou-se que só existiam diferenças significativas entre o sémen criopreservado da categoria I e II.

2.2.1. Mobilidade espermática progressiva

Vidament (1997), considera os ganhões com mobilidade progressiva superior ou igual a 35% pós descongelação eram aceites para serem usados e 51% dos 161 ejaculados avaliados no estudo em questão cumpriram este parâmetro.

No estudo em questão a mediana para a mobilidade progressiva no sémen criopreservado foi de 40% e 35%, na categoria I e II respectivamente, o que significa que mais de metade da amostra apresentou mobilidades progressivas superiores aos valores referidos podendo a sua utilização ser aceite.

Entre as duas categorias verificaram-se diferenças significativas relativamente á mobilidade progressiva no sémen fresco e centrifugado contudo não se verificaram diferenças significativas entre as mobilidades progressivas do sémen criopreservado. Podendo-se assim considerar que as diferenças nos protocolos de centrifugação não se fizeram notar no final do processo de criopreservação.

Contudo ao longo da criopreservação para a categoria II não existiram diferenças na mobilidade progressiva ($p = 0,238$), enquanto que na categoria I existiram diferenças significativas na mobilidade progressiva, mais propriamente existiram diferenças significativas: entre o sémen fresco e o sémen criopreservado; entre o sémen criopreservado e o sémen centrifugado Isto significa que as perdas de mobilidade progressiva ao longo do processo de criopreservação foram mais marcadas na categoria I especialmente após a centrifugação apesar das medianas para esta categoria apresentarem valores relativamente mais altos.

3. Método de criopreservação

Segundo o autor Clulow (2008), a utilização de uma máquina de criopreservação automática comparativamente com método de criopreservação manual pode ajudar a aumentar a mobilidade espermática pós descongelação para além de conduzir a taxas de criopreservação mais consistentes e fidedignas o que conduzirá a menos danos nos espermatozoides.

3.1. Número total de espermatozóides

No estudo verificou-se que não existiam diferenças significativas entre as percentagens de perda no número total de espermatozóides consoante os dois métodos de criopreservação ($p=0,278$), contudo a mediana da percentagem de perda foi menor com o método manual de criopreservação.

3.2. Mobilidade espermática

No estudo verificou-se que relativamente á mobilidade total no sémen fresco e criopreservado existiam diferenças significativas entre os dois métodos de criopreservação. Sendo que nas amostras criopreservadas com recurso á máquina de criopreservação a mediana (mobilidade total sémen no criopreservado foi 59%) para a mobilidade total foi relativamente mais alta quando comparadas com as medianas das amostras criopreservadas com recurso a um método manual (mobilidade total no sémen criopreservado 45%).

No estudo verificou-se que relativamente á mobilidade progressiva no sémen fresco e criopreservado existiam diferenças significativas entre os dois métodos de criopreservação. Sendo que nas amostras criopreservadas com recurso á máquina de criopreservação as medianas (mobilidade total sémen fresco foi igual 67 % e no criopreservado 46%) para a mobilidade total foram relativamente mais altas quando comparadas com as medianas das amostras criopreservadas com recurso a um método manual (mobilidade total sémen fresco foi igual 40 % e no criopreservado 35%).

Estes resultados encontrados são concordantes com o que Clulow, 2008 descreveu.

4. Métodos de aferição da concentração espermática

Recomendações para a concentração ideal para a criopreservação de sémen equino têm grandes variações; Loomis,1983 recomenda que altas concentrações e Heitland, 1995 recomenda baixas concentrações. Independentemente da variação das recomendações as taxas de gestação satisfatórias têm vindo a ser obtidas tanto com baixas concentrações: 20×10^6 spz/mL (Heitland,1995); 50×10^6 spz/mL (Cristanelli,1985). Como a altas concentrações: 100×10^6 spz/mL (Coombes, 2000); 500×10^6 spz/mL (Loomis,1983).

O hemocitómetro é considerado o método *gold standard* pela WHO, porque permite a observação e identificação dos espermatozóides contudo a sua utilização consome muito tempo e existem grandes variações entre a sua utilização consoante o operador e laboratório o que conduz a alguma inconsistência de resultados.

Segundo Comerford, 2009 nos ejaculados cuja concentração espermática é aferida com o Spermacue® obtêm-se medianas mais altas em ejaculados mais diluídos e medianas mais baixas quando os ejaculados são mais concentrados, comparativamente com o hemocitómetro.

No estudo as medianas da concentração foram semelhantes (hemocitómetro foi de 123 spz 10^6 /mL e no Spermacue® foi de 186 spz 10^6 /mL) contudo verificou-se que existiam diferenças significativas entre o número total de spz aferido a partir destas concentrações. Como era de esperar a concentração aferida com recurso ao Spermacue® foi mais elevada uma vez que existe uma tendência para quantificarem partículas de contaminação como spz (Comerford, 2009).

5. Métodos de aferição da mobilidade

O autor Hoogewijs, 2010 refere que uma amostra dose com 300 milhões de espermatozóides progressivamente móveis que é avaliada subjectivamente com recurso a microscópio óptico quando avaliada com recurso ao método CASA, que possui critérios de avaliação da mobilidade muito restritos, irá conter menos espermatozóides com mobilidade progressiva. Este autor refere que a mobilidade espermática de uma mesma amostra será diferente consoante o método de avaliação da mesma.

Verificou-se no estudo que existiam diferenças significativas para a mobilidade espermática total e progressiva quer no sémen fresco quer no criopreservado consoante o método de avaliação da mesma.

Verificou-se também que as medianas da mobilidade, total e progressiva, avaliadas com recurso ao método CASA eram relativamente mais altas quando comparadas com a avaliação subjetiva. O que não está de acordo com o referido por Hoogewijs, 2010, tal facto poder-se-á dever aos critérios de avaliação do aparelho CASA utilizado.

6. Correlações entre a concentração espermática a mobilidade espermática total e progressiva

O autor Samper, 1998 sugeriu que criopreservar o sêmen a baixas concentrações disponibilizará uma maior disponibilidade de nutrientes e crioprotector por cada espermatozóide. Isto poderá explicar uma maior percentagem de espermatozoides móveis encontrada imediatamente após descongelação aquando a criopreservação de sêmen a 40×10^6 spz/mL. O que é concordante com os resultados obtidos no estudo em que se encontraram correlações negativas significativas entre a concentração espermática: e a mobilidade total ($Rho = -0,239$; $p = 0,02$); e a mobilidade progressiva ($Rho = -0,216$; $p = 0,03$).

VII. Conclusões

Em muitos sistemas de reprodução animal apenas pequenas melhorias nas técnicas de reprodução medicamente assistida desde 1950. Enquanto que na indústria da reprodução bovina um sucesso muito elevado foi alcançado tanto no sémen refrigerado como no criopreservado muitos avanços obtidos nesta espécie não alcançaram o mesmo sucesso na espécie equina. Aparentemente a transposição de um protocolo de criopreservação com excelente sucesso num tipo de célula, espécie ou raça está condenada ao insucesso em parte devido às variações biológicas na fisiologia e bioquímica espermática ou anatomia do trato genital feminino. Ainda assim a falta de compreensão dos princípios criobiológicos parece ser um dos grandes entraves ao progresso e maior sucesso da utilização de sémen criopreservado em equinos (Sieme et al., 2008).

Historicamente têm sido utilizadas duas abordagens para alcançar avanços tecnológicos para a criopreservação de sémen: a abordagem que tem sido maioritariamente seguida é em grande parte empírica onde frequentemente se perdem detalhes e não é realizada uma análise quantitativa dos resultados. A abordagem alternativa biofísica utilizando dados e conhecimentos criobiológicos para prever protocolos de criopreservação ideais tem vindo a ser aplicado com menor frequência e tem obviamente limitações na sua aplicabilidade *in vivo*, o melhor exemplo desta afirmação é a discrepância evidente entre taxas de arrefecimento do sémen ideais teoricamente hipotetizadas que quando aplicadas apresentam menos sucesso do que as obtidas através de estudos empíricos. Não obstante, é necessário que estudos sejam conduzidos de modo a se conhecer os detalhes biológicos da criopreservação do sémen (Sieme et al., 2008).

Por este motivo, a informação recolhida neste estudo poderá revelar-se de extrema importância para um melhor conhecimento das características espermáticas da raça Puro Sangue Lusitano e delinear um perfil que permita adaptar ou obter protocolos de criopreservação com maiores taxas de sucesso nesta raça que é conhecida por os garanhões serem maus congeladores.

No estudo realizado concluiu-se que:

- Relativamente à sazonalidade: durante a época reprodutiva ocorreram maiores percentagens de perda para o número de espermatozóides contudo a mediana para a mobilidade espermática progressiva nesta mesma época do ano foram mais elevadas.

Uma vez que vários autores referem e associam a mobilidade como um parâmetro preditivo da fertilidade assume-se que a época reprodutiva será a altura no ano mais favorável para criopreservar o sémen desta raça.

- Relativamente aos protocolos de centrifugação: não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as duas categorias de centrifugação relativamente à percentagens de perda de número de espermatozóides; na categoria I a mediana para a mobilidade total e progressiva foi mais alta e ao longo do processo de criopreservação não se verificaram diferenças para a mobilidade total e progressiva nesta categoria. Pelo que se assume que a categoria I será o melhor protocolo a utilizar para a raça PSL aquando da criopreservação do sémen com o diluidor Gent.
- Relativamente ao método de criopreservação: verificou-se que não existiram diferenças significativas para o número total de spz contudo quando utilizado o método de criopreservação manual a mediana para a percentagem de perda de espermatozóides foi relativamente menor. Em relação à mobilidade espermática a mediana para a mobilidade total e progressiva foi relativamente mais elevada aquando da utilização da máquina de criopreservação automática e foram verificadas diferenças significativas entre os dois métodos. Dado que vários autores referem e associam a mobilidade como um parâmetro preditivo da fertilidade e não existem diferenças significativas entre a percentagem de perda de espermatozóides aconselha-se a utilização de uma máquina de criopreservação automática.
- Relativamente aos métodos de aferição da concentração espermática: verificou-se como descrito por vários autores que a utilização do Spermacue ® produz resultados falsamente mais elevados e que existiam diferenças significativas entre a sua utilização e do hemocitómetro. Contudo a utilização do hemocitómetro na prática clínica quotidiana não é possível devido ao elevado tempo consumido.
- Relativamente aos métodos de aferição da mobilidade espermática: verificou-se que existiam diferenças significativas entre a avaliação subjetiva com recurso ao microscópio óptico e o método CASA, o que está de acordo com a bibliografia. A avaliação subjectiva tem vindo a cair em desuso devido aos resultados obtidos possuírem menor fiabilidade, contudo a maior fiabilidade do método CASA depende grandemente dos critérios de avaliação da mobilidade utilizados no mesmo. Estes deverão ser uniformizados universalmente de modo a se poderem comparar os resultados obtidos em diferentes

estudos com maior fiabilidade. Ainda assim conclui-se que será preferível a utilização do método CASA para avaliação da mobilidade espermática.

- Relativamente à correlação significativa negativa encontrada no estudo entre a concentração espermática e as mobilidades total e progressiva: os resultados encontrados são concordantes com os encontrados na bibliografia podendo-se concluir que para a raça PSL se deverá optar por criopreservar o sémen a baixas concentrações de modo a se obterem mobilidade mais elevadas, o que teoricamente levará a uma maior taxa de sucesso aquando da inseminação.

VIII. Bibliografia

Bibliografia

Anzar M., Kroetsch T. and Buhr M. M. Comparison of Different Methods for Assessment of Sperm Concentration and Membrane Integrity With Bull Semen. - Journal of Andrology / ed. Andrology American Society of. - Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Guelph, Ontario Canada. - Novembro/Dezembro 2009. - Vol. 30. - pp. 661-668. - 6.

Arruda R.P. and E.C.C. Celeghini M.A. Alonso, H.F. Carvalho, L.Z. Oliveira, J. Nascimento, D.F. Silva, F.J. Affonso, K.M Lemes, J.D. Jaimes Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. - ed. animal Revista Brasileira Reprodução. - Belo Horizonte. - Abril/Junho 2011. - Vol. 35.

Arruda Rubens Paes De, C.C. Eneiva and Celeghini A.F.C, Andrade, A.R. Garcia, J. Nascimento, C.F. Raphael, L.W.O. Souza Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. - 1º Simpósio Internacional De Reprodução Animal Aplicada. - Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, FMVZ/USP. - 2004. - pp. 166-179.

Aurich Christine 9th International Congress of World Equine Veterinary Association Advances in Artificial Insemination. - 2006.

Aurich Christine Recent advances in cooled-semen technology. - Animal Reproduction Science, 2008. - Vol. 107.

Barbacini Sandro Proceedings of the 13th International Congress of the World Equine Veterinary Association WEVA Frozen Semen Processing and Quality Control. - 2013.

Bedford-Guaus Sylvia J. The Merck Veterinary Manual = Breeding Soundness of Stallions. - Merck Manuals. - 2014.

Blottner S.; Warnke, C.; Tuchscherer, A.; Heinen, V.; Torner, H.- Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. - Animal Reproduction Science, 2001. - Vol. 65. - pp. 75-88.

Bradford Laurie L. and Buhr Mary M. Function of cryopreserved horse semen is improved by optimized thawing rates. - Function of cryopreserved horse semen is improved by optimized thawing rates. - 2002. - Vol. 22. - pp. 546-550.

Brinsko Steven P. Semen Collection and Artificial Insemination with Fresh Semen. - Manual of Equine Reproduction / ed. 3^a. - Maryland Heights : Mosby, Elsevier inc., 2011.

Brito Leonardo F C and Lauren M. Greene Audrey Kelleman, Marc Knobbe, Regina Turner Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. - Theriogenology. - Department of Clinical Studies New Bolton Center, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, 382 West Street Road, Kennett Square, Pennsylvania, USA : Elsevier, April 3, 2011. - 4. - Vol. 76. - pp. 745-750.

J. R Clulow.; J. R. Mansfield; L. J. Morris.; L. H. Evans, G.; W. M . Maxwell. - A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. - Animal Reproduction Science. - University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia : Elsevier, 16 Setembro, 2008. - Vol. 108. - pp. 298-308.

Comerford Kathryn Leigh Instrument to evaluate stallion spermatozoal. Masters Thesis / Veterinary Medical Sciences ; Texas A&M University. - 2009.

Comerford Kathryn Leigh Validation of a commercially available Fluorescence-based Instrument to evaluate Stallion spermatozoal concentration and comparison to photometric systems. - Master of Science / Texas A&M University. - 3-10. - 2009.

D. Burger G. Meroni, S. Thomas et.al Effects of ground semen collection on weight bearing on hindquarters, libido, and semen parameters in stallions. Theriogenology. -Elsevier, Setembro 2015. - Vol. 84. - pp. 687-92.

R.V. Devireddy, D.J. Swanlund, A.S. Alghamdi, L.A.Duoos, M.H.T. Troedsson, J.C. Bischof, K.P. Roberts Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. - Reproduction. - 2002. - Vol. 124. - pp. 643-648.

Dickson D. V. Larry Johnson and Dickson D. V. Johnson L. Equine Reproduction- Chapter 97 From a Sperm's Eye View: Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. - Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom : Wiley-Blackwell, 2011. - 2 nd.

Wynne Aubin DiGrassie Evaluation of Stallion Frozen-Thawed semen using conventional and flow-cytometric assays. - Tese de Mestrado / Veterinary Medical Sciences ; Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. - 2000. - p. 1.

E. Bailey N. Fenning, S. Chamberlain Validation of sperm counting methods using limits of agreement. - Journal of andrology / ed. Andrology American Society of. - 2007. - Vol. 28. - pp. 364-373.

Equine Section, Department of Animal Sciences The Stallion: Breeding Soundness Examination & Reproductive Anatomy. - College of Agriculture ; University of Kentucky. - Lexington, KY : [s.n.], 2009.

F. Janett D. Burger, H. Bollwein Annual variation of DNA fragmentation assessed by SCSA™ in equine sperm. - Journal of Equine Veterinary Science,. - University of Zurich : 2014. - Vol. 34. - p. 61.

Fradinho M.J, Correia M.J. and Grácio V. Efeito da condição corporal e da Leptina na eficiência reprodutiva de éguas Lusitanas em sistemas extensivos. - III Jornadas do Grupo de Trabalho de Investigação em Equídeos. - Golegã. - 2013.

R. Fürst, G. R. Cartalho, M.C.O. Fürs, J. R.M. Ruas, A.M.M. Borges, V. Mafilli Effect of freezing and thawing protocols on post-thaw quality of equine semen. - Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. - Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. - 2005. - Vol. 57. - pp. 599-607.

Gadea J. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. - Murcia, Spain : Panish Journal Of Agricultural Research, 2003. - Vol. 1. - pp. 17-27.

Gamboa Sandra Cristina de Oliveira Pinto Infertilidade Equina : Múltiplas Fragilidades Ou Um “ Fado ” Do Infertilidade Equina : Múltiplas Fragilidades Ou Um “ Fado ” Do Espermatozóide. - Tese de Doutoramento / Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. - 2011.

Guimarães Tiago Pessanha Técnicas de Reprodução Assistida em Equinos. - Tese de Doutoramento / Ciências Veterinárias ; Instituto De Ciências Biomédicas Abel Salazar . - Porto . - 2014.

Hoogewijs Maarten Automated and standardized analysis of Equine semen and influences of centrifugation on Equine semen preservation. - Tese de doutoramento. - Department of Reproduction, Obstetrics and herd Health ; Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University. - 9820 Merelbeke – Belgium. - 2010.

J.M. Morrell A. Johannisson , A.-M. Dalin , H. Rodriguez-Martinez Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. - Theriogenology. - Swedish University of Agricultural Sciences, Box 7054, SE-75007 Uppsala, Sweden : Elsevier, Maio 22, 2009. - Vol. 72. - pp. 879-884.

J.R. Clulowa L.J. Mansfield, L.H.A. Morris, G. Evans,W.M.C. Maxwell A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. - Animal Reproduction Science. - University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia : Elsevier, 16 Setembro, 2007. - Vol. 108. - pp. 298-308.

Lu, Jin-Chun; Chen, Fang; Xu, Hui-Ru; Huang, Yu-Feng; Lu, Nian-Qing Comparison of Three Sperm-Counting Methods for the Determination of Sperm Concentration in Human Semen and Sperm Suspensions. - Department of Reproduction and Genetics, Jinling Hospital, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing, China : American Society for Clinical Pathology, 2007. - Vol. 38.

Len Jose Augusto Effects of Centrifugation on Equine spermatozoa immediately and aftercooling for 24 hours. - Agricultural and Mechanical College ; Louisiana State University. - 2008.

Love C. C. and Kenney R. M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. - Theriogenology. - University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine Kennett Square, Pa, USA 19348. - Julho 20, 1998. - 6. - Vol. 50. - pp. 955-972.

M. Aalberts E. Sostaric, R. Wubbolts et al. Spermatozoa recruit prostasomes in response to capacitation induction. - *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. - Elsevier B.V., 2013. - Vol. 1834. - pp. 2326-2335.

M. Correia M^a.I.Ferreira, M.Bliebernicht. Análise e Efeitos do Armazenamento de Sêmen de Suíno. - *Revista de Sociedade Científica de Suinicultura*. - 2015. - Vol. 15. - XI.

M. S. Ferrer S. K. Lyle, B. E. Eilts, A. H. Eljarrah, D. L. Paccamonti Factors affecting sperm recovery rates and survival after centrifugation of equine semen. - *Theriogenology*. - Elsevier, 2012. - Vol. 2012. - pp. 1814-23.

McKinnon O. A. Squires L. E., Vaala E. W., Varner D. D. Equine Reproduction, Chapter 95. - Wiley-Blackwell, 2011. - 2nd : Vol. 2nd : p. 870.

McKinnon O. A. Squires L. E., Vaala E. W., Varner D. D. Equine Reproduction, Chapter 96. - Wiley-Blackwell, 2011. - second edition : Vol. 1 : pp. 881-883.

Organization World Health Examination and processing of human sêmen. - 2010. - 5th edition. - p. 286.

P. Kuisma M. Andersson , E. Koskinen, T. Katila Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. - *Acta veterinaria Scandinavica*. - Department of Clinical Veterinary Sciences, University of Helsinki : BioMed CENTER, 17 Agosto, 2006. - Vol. 48. - p. 14.

P.R. Loomis J.K. Graham Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. - *Animal reproduction science*. - 1088 Nesbitt Road, Coloma, MD 21917, USA : Elsevier, November 26, 2007. - Vol. 105. - pp. 119-28.

Paulo Borges Fernando Mir, Alain Fontbonne Rita Payan-Carreira Subcellular distribution of heat shock Protein 70 (HSP70) in frozen and chilled semen is related with dog sperm quality . - CECAV-UTAD Publications / ed. Douro Institutional Repository of the University of Trás-os-Montes and Alto. - Vila Real de Trás-os-Montes e Alto Douro : Nova Publishers, 2014.

T. Pojprasatha, C. Lohachita, M. Techakumphua, T. Stout, T. Tharasanita, Improved cryopreservability of stallion sperm using a sorbitol-based freezing extender. - Theriogenology. - Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand : Elsevier, Janeiro 16, 2011. - Vol. 75. - pp. 1742-1749.

R. Devireddy D. J. Swanlund, A. S. Alghamdi, L. A. Duoos, M. H. T. Troedsson, J. C. Bischof and K. P. Roberts Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. - Reproduction . - Cambridge, England. - 2002. - Vol. 124. - pp. 643-8.

R.V. Devireddy D.J. Swanlund, T. Olin, W. Vincente, M.H.T. Troedsson, J.C. Bischo, Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. - Biology of reproduction. - University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55455. - 2002. - Vol. 66. - pp. 222-231.

Roser J. F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. - Animal Reproduction Science. - Elsevier, Setembro 2008. - 3-4 : Vol. 107. - pp. 179–196.

Salam Abdul, Gohar Ali and Hussain Jawad A Study on the Cryopreservation of Stallion Semen with Alpha Lipoic Acid .- International Research Journal of Pharmaceuticals. - School of Animal, Rural and Environmental Sciences, Nottingham Trent University, England, United Kingdom : Scientific Journals, 2011. - Vol. 1.

Salazar, J. L.; Teague, S. R.; Love, C. C.; Brinsko, S. P.; Blanchard, T. L.; Varner, D. D. Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. - Theriogenology. - Texas A&M University, College Station, Texas, USA : Elsevier, Fevereiro 10, 2011. - Vol. 76. - pp. 409-418.

Samper J. C. and Morris C. a. Current methods for stallion semen cryopreservation: A survey. - Theriogenology. - JCS Veterinary Reproductive Services 2236 Gladwin Rd. Abbotsford, B.C. Canada : Elsevier, Fevereiro 10, 1998. - Vol. 49. - pp. 895-903.

Sieme H., Harrison R. a P and Petrunkina a. M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. - Animal Reproduction Science. - a Clinic for Horses, Reproductive Unit of Clinics, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany : Elsevier, Maio 9, 2008. - Vol. 107. - pp. 276-292.

Silva Carolina Efeito da melatonina em Espermatozóides de Equino. - Tese de Mestrado / Universidade Técnica de Lisboa ; Faculdade de Medicina Veterinária. - Lisboa. - 2010.

Stuhtmann Gesa Density gradient centrifugation of stallion semen. - Tese de mestrado em Medicina Veterinária. - Hannover. - 2011.

Tischner M Kosiniak K, Bielanski W. Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. - J Reprod Fertil. - 1979. - Vol. 41. - pp. 329-335.

Turner Regina M. Current techniques for evaluation of stallion fertility. - Clinical Techniques in Equine Practice / ed. elsevier. - 2005. - 3. - Vol. 4.

Waite, J.A.; Love, C.C.; Brinsko, S.P.; Teague, S. R.; Jr., Salazar; Mancill, S.S.; 2008., Varner D.D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation .- Theriogenology . - 2008. - Vol. 70. - pp. 704-714.

Waite Jessica Arlene Cushioned centrifugation of Stallion semen:factors impacting equine sperm recovery rate and quality . - Tese de Mestrado / Office of Graduate Studies of Texas A&M University ; Texas A&M University. - 2007. - pp. 3 - 10.

World Health Organization Examination and processing of human semen 5th edition [Journal]. - 2010. - Vol. 10. - p. 305.