

ANA BEATRIZ DINIS ROGÉRIO LOPES CARVALHO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÉMEN COMO
ESTRATÉGIA DE CONSERVAÇÃO DE RAÇAS
AUTÓCTONES OVINAS E CAPRINAS**

Orientador: Professor Doutor Carlos Manuel Varela Bettencourt

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2017

ANA BEATRIZ DINIS ROGÉRIO LOPES CARVALHO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÉMEN COMO
ESTRATÉGIA DE CONSERVAÇÃO DE RAÇAS
AUTÓCTONES OVINAS E CAPRINAS**

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Prof^a Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Prof. Doutor Daniel Murta

Orientador: Prof. Doutor Carlos Bettencourt

Vogal: Prof. Doutor João Cannas da Silva

Despacho de Nomeação de Júri

Nº 107/2017

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária no curso de
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
conferido pela Universidade Lusófona de
Humanidades e Tecnologias

Orientador: Professor Doutor Carlos Manuel
Varela Bettencourt

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2017

Agradecimentos

Antes de mais, o meu agradecimento vai para a minha família, pelas pessoas maravilhosas que são, por terem sempre acreditado em mim e pelo seu apoio incondicional. Sem ela não teria sido possível de todo este caminho.

Aos amigos de sempre, estão sempre lá.

Ao Prof. Dr. Carlos Bettencourt pela total disponibilidade humana e de recursos, amizade e boa disposição no trabalho, bem como pela inesgotável paciência, sabedoria e dedicação com que me acompanhou durante todo o estágio.

Ao Dr. Canas pelos seus sábios conhecimentos.

Ao Dr. Filipe Coelho, um exemplo de profissionalismo a seguir, pela competência e dedicação, a quem agradeço por todos os conhecimentos transmitidos.

A toda a equipa da Herdade da Abóbada, que se revelou uma pequena grande família, que me recebeu como se dela fizesse parte e me ajudou no decorrer do estágio, a todos os níveis, quer na generosidade, na transmissão de conhecimentos quer no sorriso amigo.

Resumo

A criopreservação de sêmen e a inseminação artificial (IA) em pequenos ruminantes tem vindo a ser uma prática crescente nos últimos anos como uma estratégia de conservação genética. A criopreservação induz alterações estruturais e funcionais na membrana dos espermatozóides (spz) reduzindo a fertilidade após a IA. Vários protocolos de congelação e diluidores foram desenvolvidos para reduzir estes danos e melhorar a sua capacidade fertilizante.

O objetivo do estudo 1 foi comparar três protocolos de congelação de sêmen de carneiro e bode utilizando distintos diluidores, através da avaliação da viabilidade dos spz, após a descongelação, em termos de motilidade individual progressiva (MIP) e da sua utilização na IA. O diluidor EZN mostrou-se mais eficiente que os diluidores Bioxcell® e Ovixcell® na criopreservação de sêmen de ambas as espécies, apesar de estatisticamente não existirem diferenças significativas na MIP antes da congelação e após a descongelação (caprinos: $p > 0,05$ MIP congelação: Bioxcell®-70,0%, EZN-62,5%, MIP descongelação: Bioxcell®-25,0%, EZN-27,5%; ovinos: $p > 0,05$ MIP congelação: Ovixcell®-69,2%, EZN-80,0%, MIP descongelação: Ovixcell®-35%, EZN-63,8%).

O estudo 2 teve como objetivo a testagem de sêmen de ovino criopreservado no Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada (CRAHA) recorrendo a dois protocolos de congelação através da fertilidade à IA por laparoscopia. A taxa de fertilidade foi de 32%. O protocolo de congelação com EZN mostrou-se mais eficiente que o diluidor Ovixcell® na criopreservação de spz ovinos para IA com sêmen congelado.

O estudo 3 teve como objetivo a testagem da fertilidade de sêmen de caprino criopreservado no CRAHA recorrendo a dois protocolos de congelação através da fertilidade à IA por via cervical. A taxa de fertilidade foi de 27,9%. O diluidor Bioxcell® mostrou-se mais eficiente que o diluidor EZN na criopreservação de spz ovinos para IA com sêmen congelado, pois nasceram um maior número de crias provenientes da congelação de sêmen com Bioxcell® (n=15) do que com EZN (n=5).

Palavras-chave: pequenos ruminantes, sêmen congelado, diluidores, inseminação artificial.

Abstract

The cryopreservation of semen and the artificial insemination (AI) in small ruminants has become an increasing practice as a strategy for the implementation of genetic conservation programs in the last few years. The cryopreservation process results in structural and functional changes in membrane sperm cells (spz) reducing the fertility after AI. Several semen extenders have been developed to lessen the damage and improve the fertilizing capacity.

The aim of study 1 was to compare three protocols in terms of their effects on the conservation of ram and buck sperm cells using different semen extenders after the freezing process, evaluated through their individual progressive motility (IPM) with the purpose of using it in AI programs. The EZN protocol has proved to be more effective than the Bioxcell® and Ovixcell® in the cryopreservation of the semen of both species, although statistically there were no major differences in the IPM before freezing and after thawing (caprine: $p > 0,05$ MIP freezing: Bioxcell®-70,0%, EZN-62,5%, MIP thawing: Bioxcell®-25,0%, EZN-27,5%; ovine: $p > 0,05$ MIP freezing: Ovixcell®-69,2%, EZN-80,0%, MIP thawing: Ovixcell®-35%, EZN-63,8%).

The purpose of study 2 was testing cryopreserved ovine semen in the Herdade da Abóbada Breeding Center (CRAHA) using two freezing semen protocols through the fertility in the laparoscopic insemination. The fertility rate was 32%. The EZN semen protocol has proved to be more effective than the Ovixcell® semen protocol in the cryopreservation of ovine spz for AI with frozen semen.

The aim of study 3 was to test the fertility of caprine semen cryopreserved in CRAHA, using two semen protocols through the fertility in cervical AI. The fertility rate was 27,9%. The Bioxcell® protocol proved to be more effective than EZN in the cryopreservation of ovine spz for AI with frozen semen, since there was a bigger number of offspring coming from the semen freezing with Bioxcell® (n=15) than from EZN (n=5).

Key words: small ruminants, frozen semen, semen extender, artificial insemination.

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ADN- Ácido desoxirribonucleico

ANCORME- Associação Nacional de criadores de ovinos de raça Merina

APCRS- Associação Portuguesa de Caprinicultores da Raça Serpentina

BHV-1- Herpesvirus bovino tipo 1

BPGA- Banco Português de Germoplasma Animal

CASA- *Computer automated semen analyzer*

CEBA- Centro de Experimentação do Baixo Alentejo

CN- Número de Cabeças

cm- Centímetros

CRAHA- Centro de reprodução animal Herdade da Abóbada

DGAV- Direção Geral de Agricultura e Veterinária

DRAP- Direcção Regional de Agricultura e Pescas

eCG- *Equine chorionic gonadotrophin*

EZN- Estação zootécnica nacional

FAO- *Food and Agriculture Organization*

FGA- Fluoregestona

Fi- Frequência absoluta

Fip- Frequência absoluta dos casos clínicos repartida por espécie animal

Fr (%)- Frequência relativa

FSH- Hormona folículo estimulante

g- Grama

h- Hora

HOST- *Hypoosmotic swelling test*

IA- Inseminação artificial

IBR- Rinotraqueíte infecciosa bovina

INIAV- Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

INTP- Intervalo entre partos

Kg- Quilograma

Km²- Quilómetro quadrado

L- Litro

LA- Língua Azul

LH- Hormona luteínica

MAM- Ministério da Agricultura e do Mar

MAP- Medroxi-progesterona

MB- Merino Branco

MIP- Motilidade Individual Progressiva

mg- Miligrama

ml- Mililitro

mOsm- miliosmol

MP – Merino Preto

n- Número total de casos observados

NaCl- Cloreto de sódio

PAMAF- Plano de Apoio à Modernização da Agricultura e Florestas

PGF₂- Prostaglandina F₂

P240- Peso aos 240 dias

QIB- Queratoconjuntivite infecciosa bovina

rpm- Rotações por minuto

RGAn- Recursos genéticos animais

RGC- Reserva genética comercial

RGN- Reserva genética nuclear

RGT- Reserva genética de trabalho

rPDdi (%) – Precisão da Estimativa do Valor Genético para a Capacidade de Crescimento até X dias

rPDma (%) – Precisão da Estimativa do Valor Genético para a Capacidade Maternal até aos X dias

rPROL (%) – Precisão da estimativa do valor genético para a prolificidade

s- Segundo

spz- Espermatozóide(s)

STR- *Straightness*

TPM- Teste de pré-movimentação

TTR- Teste termoresistência

TTR-E- Teste termoresistência stressante

TTR-L- Teste termoresistência lento

TTR-R- Teste termoresistência rápido

UI- Unidades internacionais

VAP- *Velocity average pathway*

VCL- *Curvilinear velocity*

VG-PDma – Valor Genético para a Capacidade Maternal até X dias (Kg)

VG-PDdi – Valor Genético para a Capacidade de Crescimento até X dias (Kg)

VG-PROL- Valor Genético para a Prolificidade (nº de borregos/parto)

VSL- *Velocity straight line*

Índice Geral

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	5
Abreviaturas, Siglas e Símbolos	6
Índice Geral	8
Índice de Gráficos	13
Índice de Tabelas	14
Índice de Figuras	16
 Casuística do estágio	 17
1. Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóboda (CRAHA)	17
2. Descrição das Atividades Desenvolvidas	17
3. Distribuição dos casos observados por espécie animal	18
4. Distribuição da casuística por área de intervenção	18
4.1 Maneio Sanitário da Exploração	18
4.1.1 Medicina preventiva	18
4.1.1.1 Vacinação	19
4.1.1.2 Desparasitação	19
4.1.1.3 Testes de Pré-Movimentação (TPM)	19
4.1.2 Maneio Animal	20
4.1.2.1 Maternidade	20
4.1.2.2 Pesagens	20
4.1.2.3 Identificação animal	20
4.1.3 Contraste leiteiro	21
4.2 Clínica Médica e Cirúrgica (Casos Clínicos)	21
4.2.1 Clínica Médica	21
4.2.1.1 Infeciosas	21
4.2.1.1.1 Ectima contagioso	21
4.2.1.1.2 Peeira	21
4.2.1.1.3 Panarício interdigital	22
4.2.1.1.4 Língua azul (LA)	22
4.2.1.2 Dermatologia	22
4.2.1.2.1 Miíases	22
4.2.1.3 Oftalmologia	23

4.2.1.3.1 Queratoconjuntivite infecciosa bovina (QIB).....	23
4.2.1.4 Reprodução	23
4.2.1.4.1 Hipoplasia testicular	23
4.2.1.4.2 Orquiectomia.....	23
4.3 Centro de Reprodução da Herdade da Abóbada	24
4.3.1 Exame andrológico/ Recolha de Sémen	24
4.3.2 Crioconservação de Sémen	24
4.3.3 Inseminação Artificial	24
4.3.4 Guia de Procedimentos e Boas Práticas	25
Revisão bibliográfica	26
1. Recursos Genéticos.....	26
1.1 Conservação Genética.....	27
1.1.1 Programas de Conservação.....	27
1.1.1.1 Programas de conservação <i>in situ</i> ou <i>in vivo</i>	28
1.1.1.1.1 Estabelecimento ou consolidação de programas de conservação <i>in situ</i>	29
1.1.1.2 Programa de conservação <i>ex situ</i>	29
1.1.1.2.1 Crioconservação	29
1.1.1.3 Banco Português de Germoplasma Animal.....	31
1.1.1.3.1 Material genético a crioconservar por espécie no BPGA.....	32
1.1.1.3.2 Material crioconservado no Banco Português de Germoplasma Animal.....	33
1.1.1.3.3 Manutenção do Banco Português de Germoplasma	33
1.1.1.4 Estabelecimento ou consolidação de programas de conservação <i>ex situ</i>	34
2. Conservação da Raça Merino Branco, Merino Preto e Cabra Serpentina	35
3. Tecnologias Reprodutivas.....	36
3.1 Fisiologia Reprodutiva da ovelha e da cabra.....	36
3.2 Fisiologia Reprodutiva de Carneiros e Bodes	38
3.2.1 Seleção dos machos.....	38
3.2.2 Exame Andrológico	39
3.3 Recolha de Sémen	40
3.3.1 Razões para a colheita de sémen.....	40
3.3.2 Técnicas de recolha	40
3.3.2.1 Colheita por electroejaculação	40
3.3.2.2 Colheita por vagina artificial	41
3.4 Avaliação do Sémen	42
3.4.1 Fatores que influenciam a avaliação do Sémen	42

3.5 Características Microscópicas do Sémen.....	44
3.5.1 Volume.....	44
3.5.2 Odor.....	44
3.5.3 Cor.....	44
3.5.4 Consistência ou densidade	44
3.6 Características Microscópicas do Sémen.....	46
3.6.1 Concentração.....	46
3.6.2 Motilidade Massal e Individual	46
3.6.3 Testes de funcionalidade	48
3.6.3.1 Morfologia – Coloração Vital	48
3.6.3.2 Teste de endosmose.....	50
3.6.3.3 Termoresistência (TTR)	51
3.7 Conservação do sémen e outras tecnologias reprodutivas	52
3.7.1 Diluidores.....	52
3.7.2 Crioprotectores	53
3.7.3 Criodanos	53
3.7.4 Refrigeração do sémen.....	54
3.7.5 Congelação de Sémen.....	54
3.7.6 Descongelação do sémen.....	55
3.7.6.1 Avaliação do sémen à descongelação	56
3.8 Sincronização de cios para inseminação artificial	58
4. Inseminação artificial	59
4.1 Inseminação Vaginal (IV)	59
4.2 Inseminação Cervical.....	59
4.3 Inseminação Transcervical	60
4.4 Inseminação Intrauterina - Técnica de Inseminação laparoscópica.....	60
5. Diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes	61
Estudos	62
1.Estudo 1	62
1.1 Objetivo	62
1.2 Materiais e Métodos.....	62
1.2.1 Animais	62
1.2.2 Colheita e análise de sémen	63
1.2.3 Diluição, Processamento e Congelação de sémen	65
1.2.4 Descongelação de Sémen	68

1.3	Análise estatística	69
1.4	Resultados	69
1.4.1	Exame físico dos animais	69
1.4.2	Volume e concentração	69
1.4.3	Morfologia	70
1.4.4	Protocolos de diluição	70
1.4.5	Características do sémen antes da congelação	71
1.4.6	Características do sémen após descongelação	72
1.5	Discussão	73
1.6	Conclusão	74
2.	Estudo 2	75
2.1	Objetivo	75
2.2	Materiais e Métodos	75
2.2.1	Animais	75
2.2.2	Inseminação Artificial	75
2.2.3	Diagnóstico de gestação	76
2.3	Análise estatística	77
2.4	Resultados	77
2.4.1	Diagnóstico de gestação	77
2.4.2	Parições	77
2.4.3	Fertilidade dos machos	77
2.4.4	Protocolos de congelação	78
2.5	Discussão dos Resultados	78
2.6	Conclusão	79
3.	Estudo 3	80
3.1	Objetivo	80
3.2	Materiais e Métodos	80
3.2.1	Animais	80
3.2.2	Inseminação artificial	80
3.2.3	Diagnóstico de gestação	81
3.3	Análise estatística	81
3.4	Resultados	81
3.4.1	Diagnóstico de gestação	81
3.4.2	Parições	82

3.4.3 Fertilidade dos machos	82
3.4.4 Protocolo de congelação.....	82
3.5 Discussão dos Resultados	83
3.6 Conclusão	84
Bibliografia	85
Apêndices	I
Apêndice I - Guia de Procedimentos e Boas Práticas	I
Apêndice II - Folha de cálculo: Taxa de diluição de sémen de Ovino.....	II
Apêndice III - Folha de cálculo: Taxa de diluição de sémen de Caprino	III

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Distribuição dos Casos Observados por Espécie Animal	18
Gráfico 2: Distribuição regional de programas de conservação	28

Índice de Tabelas

Tabela 1: Distribuição da casuística em função das diferentes das diferentes áreas de intervenção (Fr(%), Fi, Fip)	18
Tabela 2: Estado atual do conhecimento das técnicas de criopreservação (Adaptado: FAO, 2003)	30
Tabela 3: Quantidade de material genético a conservar por raça (Adaptado: FAO, 1998; Hiemstra, 2003).	32
Tabela 4: Material criopreservado no BPGA (Adaptado: Proposta de Conservação Ex Situ de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015)	33
Tabela 5: Plano de manejo reprodutivo em machos reprodutores (Adaptado: Maia, 2010)	39
Tabela 6: Escala de avaliação da densidade do sêmen (Adaptado: Evans & Maxwell, 1987)	45
Tabela 7: Escala de motilidade massal em pequenos ruminantes (Adaptado: Evans & Maxwell, 1987).....	46
Tabela 8: Protocolo de sincronização de cios (Adaptado: Bettencourt, 1999)	58
Tabela 9: Folha de cálculo para formulação da taxa de diluição de sêmen de ovino	66
Tabela 10: Solução de lavagem <i>Krebs-Ringer-fosfato</i> . (Fonte: Chemineau <i>et al.</i> ,1991)	66
Tabela 11: Folha de cálculo para formulação da taxa de diluição de sêmen de caprino	68
Tabela 12: Média do volume e concentração do sêmen de 4 reprodutores ovinos de raça Merino Branco e Merino Preto	69
Tabela 13: Média do volume e concentração do sêmen de 3 reprodutores caprinos de raça Serpentina	70
Tabela 14: Distribuição da motilidade individual progressiva antes da congelação e após a descongelação recorrendo a protocolos de congelação de sêmen de carneiro, utilizando os diluidores EZN e Ovixcell®.....	70
Tabela 15: Distribuição da MIP antes da congelação e após descongelação recorrendo a protocolos de congelação de sêmen de bode, utilizando os diluidores EZN e Bioxcell®	71
Tabela 16: Médias de MIP à congelação sêmen de 4 reprodutores ovinos de raça Merino Branco e Merino Preto	71
Tabela 17: Médias de MIP à congelação sêmen de 3 reprodutores caprinos de raça Serpentina	72
Tabela 18: Médias de MIP à descongelação sêmen de 4 reprodutores ovinos de raça Merino Branco e Merino Preto	72

Tabela 19: Médias de MIP após a descongelação de sémen de 3 reprodutores caprinos de raça Serpentina	73
Tabela 20: Análise da fertilidade dos 4 reprodutores Merino através dos parâmetros: número de fêmeas inseminadas, a % de diagnósticos positivos e de partos e o número de crias nascidas por cada carneiro.....	77
Tabela 21: Análise do número de crias nascidas de acordo com os dois protocolos de diluição utilizados nos 4 machos reprodutores de raça Merina	78
Tabela 22: Análise da fertilidade dos 3 reprodutores Serpentinis através dos parâmetros: número de fêmeas inseminadas, a % de diagnósticos positivos e de partos e o número de crias nascidas por cada bode.....	82
Tabela 23: Análise do número de crias nascidas de acordo com os dois protocolos de diluição utilizados nos 3 machos reprodutores de raça Serpentina.....	82

Índice de Figuras

Figura 1: Local de deposição do sémen e as suas respetivas denominações das técnicas de inseminação: (a) Inseminação vaginal, (b) Inseminação cervical superficial, (c) Inseminação cervical profunda, (d) Inseminação intrauterina por via transcervical e, (e) Inseminação intrauterina por laparoscopia. (Adaptado: https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/tecnicas-de-inseminacao-artificial-em-ovinos-e-caprinos-52391n.aspx)	37
Figura 2: Classificação quanto à direção e à máxima profundidade de penetração em inseminação artificial em ovelhas (a) Grau 1, (b) Grau 2 e (c) Grau 3.....	37
Figura 3: Incisões para laparoscopia. (Adaptado: Kershaw <i>et al.</i> ,2005)	76
Figura 4: Incisão para colocação do laparoscópio guiado pela cânula com trocarter	76

Casuística do estágio

1. Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóboda (CRAHA)

O Centro de Experimentação do Baixo Alentejo (CEBA), situado na Herdade da Abóboda em Vila Nova de São Bento é uma unidade de produção pecuária com capacidade máxima instalada para 610 CN (número de cabeças) de bovinos, 180 CN de ovinos, 50 CN de caprinos e 50 CN suínos explorados num sistema de produção extensivo, numa área de pastoreio de 705h (Bettencourt, 2015).

O Centro de Reprodução Animal implementado destina-se a funcionar como:

1. Pólo Banco Português de Germoplasma Animal
2. Centro de colheita de sémen de pequenos ruminantes
3. Centro de armazenagem de produtos germinais
4. Centro de recolha e armazenamento de embriões de ovinos e caprinos

2. Descrição das Atividades Desenvolvidas

As atividades desenvolvidas ao longo do período de estágio curricular incidiram em todas as atividades laborais ocorridas no CEBA. Desta forma, foi possível desenvolver o trabalho de equipa, colaborar com diversas pessoas com diferentes funções, contactar e aprender a observar diferentes tipos de maneio, desenvolver a técnica de anamnese, raciocínio clínico e discussão sobre diversos casos clínicos acompanhados. O horário laboral tinha como início as 9h e termino às 17h. Para além das atividades do CEBA, proporcionaram-se algumas saídas de ambulatório onde observei diferentes casos clínicos e onde a aprendizagem de comunicação com os produtores foi fundamental. As funções atribuídas durante o estágio foram diversificadas, nomeadamente: colaboração com o veterinário assistente do CEBA; execução de procedimentos veterinários básicos; avaliação de parâmetros reprodutivos; maneio animal; preparação do CRAHA e colaboração em aulas.

De modo a facilitar a análise dos casos clínicos acompanhados no decorrer do estágio, estes vão ser divididos pelas áreas de intervenção: maneio sanitário da exploração onde será feita a abordagem de medicina preventiva, clínica médica, clínica cirúrgica, maneio da exploração e a implementação do CRAHA. Para cada uma das áreas será representada a frequência relativa (Fr (%)), a frequência absoluta (Fi) e ainda a frequência absoluta dos casos clínicos repartida por espécie animal (Fip) e o número total de casos observados (n).

3. Distribuição dos casos observados por espécie animal

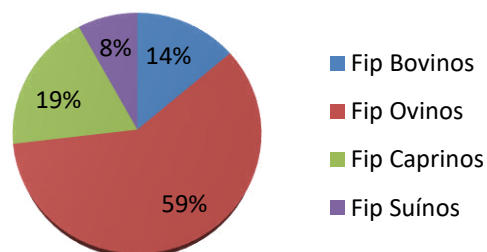


Gráfico 1: Distribuição dos casos observados por espécie animal

4. Distribuição da casuística por área de intervenção

Na tabela 1 é possível observar a distribuição da casuística pelas diferentes áreas de intervenção, na qual se verifica que a área onde foi observado um maior número de casos foi o manejo sanitário da exploração, com 64,6%.

Área	FR (%)	Fi	Fip Bovinos	Fip Ovinos	Fip Caprinos	Fip Suínos
Manejo Sanitário	64,6%	3202	640	1763	505	294
Clínica Médica/Cirúrgica (Casos clínicos)	4,9%	244	9	163	69	3
CRAHA	30,5%	1512	36	1014	362	100
Total	100,0%	4958	685	2940	936	397

Tabela 1: Distribuição da casuística em função das diferentes áreas de intervenção (Fr (%), Fi, Fip).

4.1 Manejo Sanitário da Exploração

4.1.1 Medicina preventiva

No âmbito da medicina preventiva foram levadas a cabo ações de vacinação, desparasitação, identificação eletrónica, entre outras mencionadas seguidamente.

4.1.1.1 Vacinação

Relativamente aos casos acompanhados no âmbito da medicina preventiva, a vacinação teve uma grande representatividade.

O plano vacinal, na exploração para o efetivo bovino tem como fundamental a vacinação contra rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR). A IBR é causada pelo *Herpesvirus Bovino* tipo 1 (BHV-1). Os sinais típicos de IBR são: febre ($> 40^{\circ}\text{C}$), corrimento e lesões nasais, dispneia, tosse e conjuntivite, ou seja, em casos não complicados, as lesões limitam-se ao trato respiratório superior (Stilwell, 2013). A vacinação em zonas endémicas deve ser executada pelo menos com uma periodicidade anual. No CEBA, a vacinação foi realizada no mês de Dezembro. Primovacinação de bovinos com mais de 3 meses: administração da dose intramuscular (2ml). Reforço: inicialmente, os animais vacinados com *Rispoval IBR Marcador Vivum* podem receber uma dose de reforço única de ambos *IBR Rispoval Marcador Vivum* para fornecer 6 meses de proteção e/ou *IBR marcador Rispoval Inactivatum* que fornece imunidade durante 12 meses. Depois disso, as doses de reforço devem ser administradas a cada 12 meses (*IBR marcador usado Rispoval Inactivatum*).

4.1.1.2 Desparasitação

No que se refere à desparasitação, esta é fundamental para a proteção contra parasitas internos e externos, tendo sido um procedimento muito realizado, à semelhança da vacinação.

Relativamente aos ovinos e caprinos, os principais desparasitantes utilizados foram o mebendazol e o closantel sódico di-hidratado (*Seponver Plus*[®] - formas maduras e larvares de tremátodes e nemátodes gastrointestinais e pulmonares; tratamento de céstodes - segmentos e escólex, e de alguns artrópodes) e o diclazuril (*Vecoxan*[®] - *Eimeria crandallis* e *Eimeria ovinoidalis*), especialmente nos borregos e cabritos.

4.1.1.3 Testes de Pré-Movimentação (TPM)

Os TPM são efetuados em bovinos com mais de 12 meses de idade, nos 30 dias anteriores à sua movimentação, para rastreio de brucelose e tuberculose. São testes de realização obrigatória no território nacional. Os animais só poderão sair da exploração após a obtenção de resultados negativos nos testes de diagnóstico e o averbamento desta informação nos respetivos passaportes. No efetivo de garvonesas do CEBA foram realizados TPM e os resultados obtidos apresentavam-se negativos para ambos os parâmetros avaliados.

4.1.2 Maneio Animal

4.1.2.1 Maternidade

A alimentação das crias de pequenos ruminantes é um fator primordial na formação e manutenção de um rebanho economicamente produtivo, onde os animais atingem precocemente o peso adequado para reprodução, influenciando conseqüentemente, a idade ao primeiro parto. No CEBA, procede-se à técnica de aleitamento artificial dos cabritos. Nas primeiras horas de vida, as crias ficam com as progenitoras e são amamentadas naturalmente de colostro. Posteriormente, as crias são separadas das mães, mas durante 24h ainda bebem colostro proveniente da ordenha. Em seguida, são alimentadas de leite da ordenha de forma manual através de biberão até se adaptarem às tetinas da máquina de aleitamento artificial.

4.1.2.2 Pesagens

Todo o efetivo animal do CEBA é submetido a pesagem à nascença. Contudo, a pesagem é uma das funções atribuídas às associações de criadores correspondentes a cada raça, Associação Nacional de Criadores de Ovinos de Raça Merina (ANCORME) e Associação Portuguesa de Caprinicultores da Raça Serpentina (APCRS).

4.1.2.3 Identificação animal

A lei estipula que todos os animais devem estar identificados (Decreto Lei n.º 338/99 de 29 de Setembro). No CEBA, a colocação da marca auricular oficial é realizada diariamente o mais aproximadamente possível da hora do parto, para que a identificação da progenitora seja mais facilmente reconhecida, em bovinos. Os brincos auriculares são colocados em ambas as orelhas, devendo esta colocação evitar os vasos sanguíneos e a extremidade da cartilagem. Relativamente à identificação de ovinos, após o nascimento, estes no CEBA são identificados de três formas: número de ordem, brinco oficial de cor correspondente à raça e a coleira numerada se se tratar de um animal gémeo. A progenitora recebe igualmente uma marcação que corresponde ao número de ordem do borrego. Relativamente aos caprinos, após o nascimento é-lhes atribuído somente uma marca auricular. No CEBA, os leitões são identificados nos primeiros dias após o nascimento, através de um brinco oficial.

4.1.3 Contraste leiteiro

No caso específico do CEBA, o contraste leiteiro tem por finalidade a obtenção de elementos que estão na base das ações que visam o melhoramento genético dos efetivos de pequenos ruminantes produtores de leite e que é fundamental para a gestão técnica e económica das explorações. Baseia-se na avaliação da quantidade e da qualidade de leite produzido por cada uma das fêmeas de um rebanho no decurso das sucessivas lactações. O contraste leiteiro é realizado no CEBA, mensalmente, ao efetivo caprino dentro do horário habitual da ordenha (duas vezes por dia). No início das ações de contraste, realiza-se a verificação da identificação dos animais. Ao contraste são submetidos os animais que se encontram completamente afastados das respetivas crias. As amostras são recolhidas para um recipiente apropriado ao efeito, devidamente graduado. Os resultados são expressos em ml. Posteriormente, os dados obtidos são enviados para a APCRS.

4.2 Clínica Médica e Cirúrgica (casos clínicos)

4.2.1 Clínica Médica

No que se refere aos casos acompanhados no âmbito da clínica médica no decorrer do estágio, estes encontram-se divididos pelas diversas áreas clínicas.

4.2.1.1 Infecciosas

4.2.1.1.1 Ectima contagioso

Trata-se de uma doença de origem viral que pode afetar borregos e cabritos com alguns dias de idade. A doença caracteriza-se pelo aparecimento de pústulas, sobretudo nos lábios dos animais. Estas pústulas podem ser invadidas por bactérias e podem interferir com o ato de sucção, resultando em subnutrição das crias. O uso de *spray* à base de antibiótico controla a infeção bacteriana. Este problema desaparece em média ao fim de 2 a 3 semanas. O vírus, em condições de seca, pode sobreviver durante muitos anos numa exploração (Stilwell, 2013). No CEBA, por decisão médico-veterinária, o efetivo de borregos foi todo vacinado para ectima, no mês de Setembro.

4.2.1.1.2 Peeira

É a principal causa de claudicação em pequenos ruminantes. Este problema podal é causado por uma interação sinérgica entre dois microrganismos gram-negativos anaeróbios, *Bacteroides nodosus* e *Fusobacterium necrophorum* (Stilwell, 2013). Nos casos observados no CEBA, os animais apresentavam sintomatologia inicial de peeira, ou seja,

ligeira claudicação. Foi efetuado o corte de unhas de forma preventiva e nebulização com cloridrato de oxitetraciclina (*Engemicina*[®]).

4.2.1.1.3 Panarício interdigital

Infeção com inflamação e necrose mais ou menos extensa, do tecido cutâneo e subcutâneo por *Fusobacterium necrophorum* e, provavelmente, *Bacteroides melaninogenicus*. A área mais frequentemente atingida é o espaço interdigital (Stilwell, 2013). O caso clínico observado tratava-se de um bovino raça alentejana que apresentava claudicação grave e relutância em movimentar-se, pois expunha fissuras na zona dos talões. Por parte do médico veterinário foi aconselhada ao proprietário a utilização de pedilúvios com sulfato de cobre/ zinco a 5% para minimizar a contaminação e antibioterapia baseada em sulfamidas.

4.2.1.1.4 Língua azul (LA)

Doença particularmente grave para ovinos, caracterizada por lesões orais que justificam o nome da patologia. Orbivírus, pertencente à família Reoviridae é transmitido por diversas espécies do inseto hematófago do género *Culicoides* (Stilwell, 2013). Os sinais clínicos observados foram: erosões e crostas em redor das narinas, erosões na mucosa oral e claudicação. Como não existe um tratamento efetivo, foram realizadas campanhas de desinsectização de todo o efetivo ovino com cipermetrina a 10% (*Ciperpulvizoo*[®]). Aos animais já infetados, o tratamento aplicado baseou-se na administração de antibiótico (*Oxymycin*[®]) e anti-inflamatório não esteróide (*Megluvet*[®]).

4.2.1.2 Dermatologia

4.2.1.2.1 Miíases

As lesões causadas por miíases apresentam bastante prevalência no efetivo animal do CEBA. Larvas de diversas espécies de moscas, incluindo a *Musca domestica*, *Phormia* sp. e *Sarcophaga* sp. são as que afetam maioritariamente as explorações no período do Verão (Stilwell, 2013). Os casos clínicos tratados em ovinos e bovinos apresentavam sinais clínicos bastante evidentes, pois havia a visualização de larvas no interior de feridas profundas. O tratamento baseou-se na remoção das larvas, lavagem com iodopovidona, desinfeção das feridas e nebulização com cloridrato de oxitetraciclina (*Engemicina*[®]).

4.2.1.3 Oftalmologia

4.2.1.3.1 Queratoconjuntivite infecciosa bovina (QIB)

A responsabilidade primária é atribuída à bactéria gram-negativa *Moraxella bovis*. A QIB ocorre normalmente em surtos, essencialmente no Verão e no início do Outono. (Stilwell, 2013). Nos casos clínicos observados (dois bovinos raça Mertolenga e um carneiro Merino Preto), a sintomatologia observada passou por congestão da conjuntiva e opacidade da córnea e, por fim, ulceração da mesma. Na fase de resolução surge uma neovascularização em volta da úlcera que justifica o termo “*pink-eye*” utilizado comumente. A administração subconjuntival de β -lactâmicos (1-2 ml) foi efetuada no caso dos bovinos.

4.2.1.4 Reprodução

4.2.1.4.1 Hipoplasia testicular

A hipoplasia testicular pode ser congénita ou adquirida, uni ou bilateral e parcial ou total. No caso clínico observado, aquando do exame andrológico ao efetivo de carneiros abrangidos no CRAHA, tratava-se de uma hipoplasia total unilateral: um testículo é obviamente menor que o normal. Após avaliação de sémen, concluiu-se que o animal não é infértil. Contudo, há sempre a suspeita da origem hereditária da patologia, sendo os animais que a apresentam, não utilizados como reprodutores.

4.2.1.4.2 Orquiectomia

Procedimento cirúrgico realizado no CEBA como tarefa de manejo de engorda em suínos. O animal é submetido a sedação com azaperona (*Stresnil*[®]) e anestesia local com lidocaína (*Anestésin*[®]). Foi realizada uma castração escrotal aberta que consistiu na realização de duas incisões na bolsa escrotal (um testículo de cada vez), dissecando a túnica vaginal. Posteriormente, exteriorizaram-se os testículos, um de cada vez, procedeu-se a hemóstase das estruturas vasculares e em seguida dissecou-se os testículos com o costótomo. Preventivamente administrou-se uma pequena dose de oxitetraciclina (*Oxymycin*[®]) intramuscular. Os suínos submetidos a orquiectomia foram posteriormente colocados em montanhaeira.

4.3 Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada

4.3.1 Exame andrológico/ Recolha de sémen

No decorrer do estágio foram realizados com bastante assiduidade exames andrológicos (bovinos, caprinos e ovinos). O objetivo deste exame no CEBA prende-se com a avaliação dos reprodutores para a sua introdução na vacada/rebanho; a escolha dos melhores espécimes para a vinculação ao CRAHA, bem como garantir a sanidade dos machos no geral.

As recolhas de sémen foram realizadas com bastante frequência, através do método da vaginal artificial em pequenos ruminantes e electroejaculação em bovinos, sendo o sémen posteriormente avaliado qualitativamente, quantitativamente e analisada a morfologia dos spz. Foram realizadas 76 recolhas de sémen durante o período de estágio.

4.3.2 Crioconservação de sémen

A congelação de sémen foi um dos procedimentos mais realizados ao longo do estágio, como meio de conservação *ex situ*. Quando o sémen é congelado e mantido a baixa temperatura, como em azoto líquido a -196°C , o metabolismo dos spz é completamente inibido. Isso possibilita o armazenamento do sémen por um período prolongado de tempo. Até ao término do estágio foram congeladas 325 palhinhas de dois toiros Garvoneses, 763 de carneiros Merino Branco e Merino Preto e 269 palhinhas de bodes Serpentinós, que integram o pólo do Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA) e o CRAHA.

4.3.3 Inseminação artificial

No CRAHA, as inseminações artificiais tiveram início no mês de Março, com a inseminação laparoscópica, com sémen congelado no efetivo de ovinos e inseminação cervical com sémen fresco. Nos caprinos, a inseminação cervical foi realizada com sémen congelado e fresco.

A IA é utilizada como estratégia de melhoramento animal e de conservação genética dos recursos animais.

4.3.4 Guia de Procedimentos e Boas Práticas

O CRAHA, sendo um projeto pioneiro em Portugal na reprodução de pequenos ruminantes, houve a necessidade de desenvolver um guia de procedimentos e boas práticas como documento orientador do funcionamento do centro (ver apêndice I). O objetivo deste documento é apresentar aos colaboradores, professores e alunos usuários do CRAHA, os princípios e conceitos básicos da biossegurança, visando minimizar os riscos, maximizar a eficiência no uso dos laboratórios, evitar acidentes durante a utilização de equipamentos, materiais e reagentes, evitar o risco de más práticas que culminarão no insucesso dos procedimentos, neste caso específico uma criopreservação de qualidade deficitária.

Revisão bibliográfica

1. Recursos Genéticos

Portugal é indiscutivelmente um reservatório de recursos genéticos animais (RGA) demonstrado pelas 50 raças autóctones de espécies pecuárias - 15 raças bovinas, 16 ovinas, 6 de caprinos, 3 de suínos, 4 de equinos, 4 de galináceos e 2 de asininos, e pelas 11 raças nacionais de canídeos - reconhecidas oficialmente (Carolino, 2015).

A ação conjunta de muitos fatores de ordem geográfica, fundiária, histórica, cultural, socioeconómica, de que resultou uma acentuada diversidade de condições de exploração dos animais, exigiu a sua adaptação e capacidade de produzir em condições ambientais muito distintas, favorecendo a adaptação (Carolino, 2015). Portugal é uma das regiões do Globo referenciadas como “*hotspots* da biodiversidade” e constitui um singular e excecional património (Carolino, 2015).

A Convenção sobre Biodiversidade Biológica, que decorreu em 1992 e foi ratificada por Portugal em 1993, propôs um conjunto de regras para assegurar a conservação da biodiversidade, a sua utilização sustentável, a justa repartição dos benefícios provenientes dos recursos genéticos e a soberania de cada país sobre o património existente no seu território. Por solicitação da FAO (*Food and agriculture Organization*), em 2004, Portugal apresentou o Relatório Nacional sobre o Estado dos recursos Genéticos Animais, tendo-se estabelecido diversas prioridades nacionais de acordo com os princípios gerais apontados na Estratégia Global da FAO (Carolino, 2015).

Elaborado pela FAO, com base em relatórios de 169 países, entre os quais Portugal, o 1º Relatório sobre o Estado Mundial dos RGA para a Agricultura e Alimentação, realça a necessidade da gestão eficaz da diversidade genética animal (Carolino, 2015).

Em 2007, após a aprovação da “Declaração de Interlaken” na Conferência Internacional sobre RGA naquela cidade, diversos países assumiram o compromisso em adotar o primeiro Plano Global de Ação para os RGA, que inclui duas prioridades estratégicas destinadas a combater a erosão da diversidade genética animal e a promover a utilização sustentável dos RGA. Entre outros compromissos, os países participantes reconheceram novamente a soberania nacional sobre os respetivos RGA. Desta forma, desde então, diversos países têm vindo a desenvolver os seus respetivos Planos Nacionais para os RGA (Carolino, 2015). A soberania nacional sobre os respetivos RGA e a uniformização dos procedimentos relacionados com a sua caracterização, conservação e utilização sustentável provém de um plano nacional RGA que se traduz num conjunto de normas de funcionamento e implementação (Carolino, 2015).

As atividades a desenvolver no âmbito do Plano Nacional RGAⁿ (Plano Nacional para os Recursos Genéticos Animais, 2013) são:

- caracterização e promoção das espécies pecuárias e a sua posterior inclusão no Catálogo Oficial de Raças Pecuárias reconhecidas em Portugal;
- implementação de programas de conservação e melhoramento animal, com apoios e objetivos/critérios de seleção bem definidos;
- promoção da conservação *ex situ* dos RGAⁿ, através da manutenção e incremento do Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA);
- formação, investigação e experimentação na área da conservação e melhoramento genético.

Relativamente às raças autóctones, a estratégia a adotar por cada raça enquadra-se num programa de conservação ou num programa de melhoramento, em função da sua classificação quanto ao risco de extinção, das suas características demográficas, do seu grau de desenvolvimento e interesse zootécnico e económico, bem como da sua aptidão produtiva (Plano Nacional para os Recursos Genéticos Animais, 2013).

O Plano Nacional RGAⁿ é assim um documento orientador, no âmbito das políticas e atividades a desenvolver relacionadas com os RGAⁿ e os seus produtos, envolvendo diversas entidades públicas e privadas, organizações de criadores responsáveis pela gestão de livros genealógicos e pela execução de programas de conservação ou de melhoramento genético. A sua aplicação abrange todos os criadores detentores de animais inscritos em livros genealógicos ou registos fundadores das raças oficialmente reconhecidas, bem como animais e os seus descendentes (Plano Nacional para os Recursos Genéticos Animais, 2013).

1.1 Conservação Genética

1.1.1 Programas de Conservação

Um programa de conservação tem por objetivo a manutenção da variabilidade genética de uma raça, variedade ou ecótipo, de forma a garantir a sua manutenção e/ou promover o aumento do seu efetivo.

As ameaças à continuidade da sobrevivência dos recursos genéticos animais justificam a implementação de medidas de conservação cuja premência é maior nos lugares onde existem riscos acrescidos de perda de recursos genéticos valiosos. Existem diversas abordagens para a conservação desses recursos, incluindo métodos *in vivo* (parques zoológicos, áreas protegidas, compensações pecuniárias ou outros apoios aos criadores que mantêm os animais no seu ambiente natural) bem como *in vitro*, sendo o material genético armazenado em azoto líquido (FAO, 2007).

Para que estas medidas sejam efetivas, é preciso dispor de informações detalhadas sobre as raças incluídas nos programas, sobre o tamanho e a estrutura das populações consideradas, sobre os sistemas reprodutivos praticados e, no caso dos programas *in vitro*, sobre a quantidade e o tipo de material genético armazenado (sêmen, embriões, oócitos ou DNA de tecidos) (FAO, 2007).

Atualmente, as medidas de conservação estão muito mais disseminadas na Europa e Cáucaso e na América do Norte do que em outras regiões do globo (FAO, 2007).

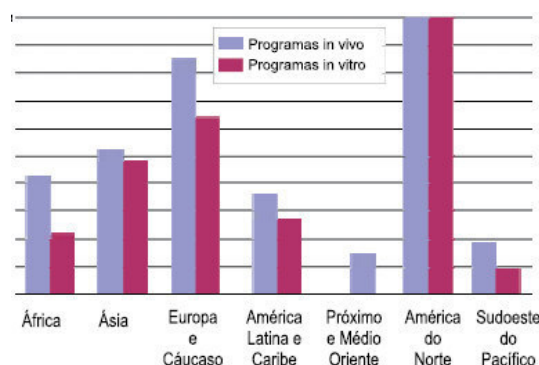


Gráfico 2. Distribuição regional de programas de conservação (FAO, 2007).

A execução dos programas de conservação em Portugal é da responsabilidade das organizações de criadores oficialmente reconhecidas para a gestão de livros genealógicos, mediante aprovação dos serviços oficiais da DGAV. O programa de conservação de cada raça estabelecerá as modalidades de colaboração e integração dos criadores, bem como a participação dos centros de colheita e armazenagem, centros de testagem, equipas de recolha de sêmen e/ou produção de embriões e do BPGA. Em cada programa são claramente explicitados os mecanismos e ações utilizadas para promover a preservação da variabilidade genética de uma raça, variedade ou população. Para avaliar a importância de uma raça sob a ótica de conservação, é preciso resumir as informações de várias fontes, incluindo: estudos de diversidade de características que definem a identidade da raça; estudos de genética molecular, que forneçam medidas objetivas ou provas de atributos genéticos únicos.

1.1.1.1 Programas de conservação *in situ* ou *in vivo*

A conservação *in situ* é definida como sendo a conservação dos ecossistemas e dos *habitats* naturais, a manutenção e a reconstituição de populações viáveis de espécies nos seus ambientes naturais e, no caso de espécies domesticadas, nos ambientes onde desenvolveram os seus caracteres. Os núcleos de animais vivos que correspondam a tamanhos efetivos de população superiores a 50 CN são raças declaradas em vias de extinção, sendo abrangidas em programas de conservação *in situ* ou *in vivo*. A conservação

in situ tem algumas vantagens, tais como: permitir que as espécies continuem os seus processos evolutivos; favorecer a proteção e a manutenção da vida silvestre; apresentar melhores condições para a conservação de espécies silvestres, especialmente vegetais, minerais e animais; oferecer maior segurança na conservação de espécies. A conservação ou manutenção dos animais no ambiente natural ou zona de produção é possível através de população viva - *in vivo*; zonas protegidas; parques naturais e jardins zoológicos, ou seja, zonas o mais semelhante possível às do seu local de origem (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

1.1.1.1.1 Estabelecimento ou consolidação de programas de conservação *in situ*

A implementação e estabilização de programas de conservação requerem alguns estímulos, nomeadamente: apoio aos programas de conservação *in situ* de raças ou variedades ameaçadas, preferencialmente integrados em sistemas de produção locais; promoção da utilização de áreas/terrenos públicos como parques naturais e herdades estatais, para a criação de núcleos de conservação animal *in situ* e incentivos aos jovens agricultores para explorarem raças autóctones ameaçadas de extinção (Plano Nacional para os Recursos Genéticos Animais, 2013).

1.1.1.2 Programa de conservação *ex situ*

A conservação *ex situ* envolve a manutenção das espécies fora do seu *habitat* natural e tem como principais características: preservar genes por tempo indeterminado; permitir que apenas num local seja reunido material genético de muitas proveniências, facilitando o trabalho do melhoramento/ conservação genética; garantir melhor proteção à diversidade intraespecífica, especialmente de espécies de ampla distribuição geográfica. A metodologia de conservação *ex situ* poderá assim ser subdividida em duas grandes áreas: conservação criogénica de germoplasma ou crioconservação, denominada de conservação *in vitro*; conservação de material genético vivo fora do ambiente em que se desenvolveu ou em que é criado, sendo denominada de conservação *in vivo* (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

1.1.1.2.1 +Crioconservação

A conservação criogénica é considerada imprescindível para a salvaguarda dos RGA a longo prazo. Esta pode efetuar-se através da congelação de sémen, embriões, oócitos, amostras de tecidos, células somáticas ou de ADN (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

A manutenção das células vivas ocorre a temperaturas muito baixas (-196 °C), impedindo que advenha qualquer tipo de reação química e assim, a possibilidade de

armazenamento por longos períodos de tempo (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

A salvaguarda dos RGA através da conservação criogénica perante qualquer eventualidade de perdas *in vivo*, quer devidas à erosão genética, quer devido a uma situação de emergência ou fatalidade, são de toda uma mais-valia para o património genético nacional. A maior limitação à crioconservação resulta do facto de as técnicas não estarem disponíveis para todas as espécies, sendo as taxas de sucesso de reutilização do material genético crioconservado muito variável e dependente de vários fatores (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

Espécie	Sémen	Oócitos	Embriões
Bovinos	Técnica disponível	Técnica disponível	Técnica disponível
Ovinos	Técnica disponível	Resultados experimentais positivos	Técnica disponível
Caprinos	Técnica disponível	Resultados experimentais positivos	Técnica disponível
Suínos	Técnica disponível	Resultados experimentais positivos	Técnica disponível
Equinos	Técnica disponível	Hipóteses de resultados	Técnica disponível

Tabela 2: Estado atual do conhecimento das técnicas de crioconservação. Adaptado: FAO, 2003.

Segundo as indicações da FAO (1998), tendo em consideração que possa haver diferenças entre espécies e mesmo entre raças, em termos de doses de sémen e número de embriões a conservar, os valores recomendados são os seguintes: 25 machos / 200 doses de sémen por macho e 30-50 fêmeas / 5-10 embriões por fêmea.

A conservação criogénica de germoplasma poderá ainda permitir a sua utilização nos programas de melhoramento das raças bem como o intercâmbio de informação com bancos congéneres estrangeiros (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

1.1.1.3 Banco Português de Germoplasma Animal

Em Portugal tornou-se fundamental a constituição de um banco de Germoplasma animal representativo de todas as raças nacionais (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

Um banco de germoplasma é uma instalação constituída com o fim de armazenar material genético e contribuir para a sua preservação. O material genético é proveniente de animais inscritos nos registos fundadores ou livros genealógicos das diferentes raças (Plano Nacional para os Recursos Genéticos Animais, 2013).

As atividades relacionadas com o BPGA tiveram início ainda na década de noventa do século XX, inicialmente, através de um projeto coordenado pelo CEBA (Herdade da Abóbada), que tinha como principal objetivo, a constituição de uma reserva genética para as raças ovinas Campaniça e Merina Preta e para a raça caprina Serpentina, tendo em vista a preservação da variabilidade existente, utilizando a conservação por meios criogénicos (sémen e embriões) (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

Posteriormente, em 2003, foi constituído um Banco de Germoplasma Animal. Este projeto coordenado pelo Departamento de Reprodução Animal da então Estação Zootécnica Nacional pretendia promover um conjunto de ações sistemáticas e organizadas que permitissem o estabelecimento de um Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA) (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

Este banco resultaria da recolha, processamento e armazenagem de amostras de sémen e ADN, de cada uma das 32 raças portuguesas reconhecidas à data. Como complemento das ações de conservação de germoplasma e ADN (mantida com duplicados em pelo menos dois centros experimentais), proceder-se-ia à caracterização genética e recolha de informação adicional dos animais amostrados, de forma a constituir uma base de dados nacional de suporte à gestão do banco de germoplasma e à utilização sustentada dos RGA. Adicionalmente, foram desenvolvidas atividades de sensibilização pública e divulgação dos recursos genéticos autóctones (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

Atualmente, o BPGA confere ao material genético já recolhido, o indispensável enquadramento, respeitando as recomendações internacionais e garantindo a salvaguarda, a longo prazo do património genético das raças autóctones portuguesas, tendo como objetivo principal assegurar a recolha e a manutenção de germoplasma - nomeadamente sémen, embriões, óocitos, células somáticas e ADN - de todas as raças nacionais de animais domésticos, de forma a (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015): garantir a sua conservação a longo prazo, de acordo com as

recomendações das organizações internacionais competentes; assegurar a sua disponibilidade para utilização nos programas de conservação e seleção das raças envolvidas e promover o intercâmbio de informação e de material genético com bancos estrangeiros.

Estruturalmente, o BPGA está organizado num pólo central e dois pólos de duplicados (podendo vir a considerar outros) geograficamente afastados de forma a garantir a segurança do material armazenado (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

O material criopreservado existente deverá ser classificado de acordo com as necessidades de recuperação e defesa das raças em extinção ou extintas, os programas de conservação *in situ* / melhoramento / reprodução e a eventual utilização comercial particular, conforme os seguintes critérios (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015): 1.Reserva genética nuclear (RGN), 2.Reserva genética de trabalho (RGT) e 3.Reserva genética comercial (RGC).

1.1.1.3.1 Material genético a crioconservar por espécie no BPGA

A quantidade de material genético a crioconservar por raça, de forma a garantir a sua correta reutilização a curto ou longo prazo, depende de diversos fatores, entre outros, relacionados com a própria população (variabilidade genética/grau de risco), com o tipo de material genético a conservar e com o nível de biotecnologias utilizadas. Sem atender a algumas especificidades relacionadas com cada população, de modo geral, a quantidade de material genético a conservar por raça está apresentada no quadro seguinte (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

	Ovino	Caprino
Nº embriões por fêmea	10	10
Nº fêmeas por raça	20	20
Nº embriões por raça	200	200
Nº doses sémen por ♂	200	200
Nº machos	20	20
Nº doses sémen	4000	4000

Tabela 3: Quantidade de material genético a conservar por raça. Adaptado: FAO, 1998; Hiemstra, 2003.

1.1.1.3.2 Material crioconservado no BPGA

Espécie	Raça	Sémen		Embriões		ADN	Ócitos/ Ovários
		Nº machos	Nº doses	Nº fêmeas	Nº embriões	Nº amostras	
Ovina	Churra do Minho	4	331	0	0	0	
	Campaniça	17	979	15	75	0	
	Churra Algarvia	1	33	0	0	0	
	Churra Badana	0	0	0	0	0	
	Churra Galega Bragançana	0	0	0	0	0	
	Churra Galega Mirandesa	12	2747	6	20	0	
	Churra Mondegueira	5	815	0	0	0	
	Churra Terra Quente	0	0	0	0	0	
	Merina Branca	2	136	0	0	0	
	Churra do Campo	3	113	0	0	0	
	Merina Preta	12	862	25	121	0	
	Merino da Beira Baixa	6	1085	0	0	0	
	Saloia	8	1492	0	0	0	
	Serra da Estrela	14	2211	0	0	0	
Caprina	Algarvia	0	0	7	41	0	
	Bravia	15	2389	2	10	0	
	Preta Montesinho	3	566	0	0	0	
	Charnequeira	11	1925	0	0	0	
	Serpentina	15	691	16	100	0	
	Serrana	29	5555	4	41	0	

Tabela 4: Material de pequenos ruminantes crioconservado no BPGA. Adaptado: Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015.

1.1.1.3.3 Manutenção do BPGA

O controlo e manutenção do material genético armazenado no BPGA baseia-se na permanente verificação dos equipamentos utilizados para a crioconservação, nomeadamente, a confirmação e reposição dos níveis de azoto líquido, bem como a atualização da base de dados que controla a informação sobre o material genético e respetivos dadores (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

A criopreservação consiste na conservação de material biológico, a baixas temperaturas, no caso do material animal normalmente em azoto líquido a cerca de -196°C. A esta temperatura, a estrutura e funcionalidade das células e tecidos vivos são mantidas, conservando-se geneticamente viáveis e inativas temporariamente do ponto de vista metabólico (Proposta de Conservação *Ex Situ* de Recursos Genéticos Animais Autóctones, 2015).

1.1.1.4 Estabelecimento ou consolidação de programas de conservação *ex situ*

A medida de consolidação mais premente baseia-se no apoio à organização de programas de conservação *ex situ* de raças ou variedades ameaçadas, devidamente articulados com o BPGA e com os pólos que se vierem a estabelecer (Plano Nacional para os Recursos Genéticos Animais, 2013).

2. Conservação da Raça Merino Branco, Merino Preto e Cabra Serpentina

Os efetivos de ovinos da raça Merino Branco e Merino Preto atualmente são geridos pela Associação Nacional de Criadores de Ovinos de Raça Merina (ANCORME). Esta foi constituída a 30 de Maio de 1990 e tem-se dedicado ao trabalho de registo e melhoramento das duas Raças Merinas autóctones (ANCORME, 2008).

A sua atividade principal baseia-se no acompanhamento de múltiplos rebanhos da região do Alentejo e a sua posterior admissão no livro genealógico dos animais com características étnicas compatíveis com o padrão da raça (ANCORME, 2008).

O seu Programa de Conservação e Melhoramento Genético Animal baseia-se no controlo de performances de crescimento dos borregos nas explorações aderentes. Os parâmetros avaliados são: apreciação das características étnicas, morfológicas e avaliação dos crescimentos para a possível admissão no registo de adultos; apoio técnico respeitante ao manejo do rebanho de uma forma geral; identificação eletrónica definitiva de todos os ovinos admitidos; avaliação genética global das raças; caracterização genética por análise de ADN; IA; testes de paternidade por análise de ADN; contraste lanar e promoção da raça (ANCORME, 2008).

No livro genealógico da raça atualmente constam 14122 animais vivos Merino Preto e 10192 animais vivos Merino Branco (ANCORME, 2016).

Relativamente aos caprinos de raça serpentina, a sua gestão é realizada pela Associação Portuguesa de Caprinicultores da Raça Serpentina (APCRS, 2007).

No livro Genealógico da raça constam atualmente 4350 fêmeas reprodutoras e 222 machos reprodutores, animais com mais de 12 meses inscritos no Livro de Adultos (APCRS, 2016).

Os dados recolhidos pela APCRS e pelos organismos oficiais revelam grande variabilidade nas performances produtivas e reprodutivas, o que permite concluir que se trata de um genótipo bem adaptado às várias condições de exploração, com um potencial que deverá ser explorado no futuro (Fialho, 1995).

3. Tecnologias Reprodutivas

3.1 Fisiologia reprodutiva da ovelha e da cabra

Uma característica muito importante dos ovinos e caprinos é a sazonalidade reprodutiva, com alternância estacional de períodos de anestro e de atividade sexual. Nas regiões temperadas, a sazonalidade é regulada pelo fotoperíodo ou pela duração da luz do dia - a redução do fotoperíodo estimula a atividade sexual, enquanto o aumento do fotoperíodo induz o anestro. Os pequenos ruminantes são, portanto, classificados como reprodutores dos “dias curtos”. Além do fotoperíodo, outros fatores podem influenciar os padrões reprodutivos, tais como a genética (algumas raças são sensíveis à variação da luz do dia), práticas de manejo (por exemplo, o efeito macho) e interações sociais (Henderson et al., 2000). A duração da estação reprodutiva varia entre as raças, mas apesar destas variações, a maioria apresenta um pico de fertilidade no final do Outono. Fora da estação reprodutiva (anestro), as alterações dinâmicas no crescimento e a regressão dos folículos ovarianos continuam a ocorrer, mas não há manifestação de cio e de ovulação, em virtude da falha dos folículos antrais em crescer e maturar, como normalmente ocorre na fase pré-ovulatória do ciclo éstrico (O’Callaghan, 1994). Entretanto, o desenvolvimento destes folículos pode ser estimulado artificialmente, permitindo a reprodução durante o anestro ou nos períodos de transição.

Vários estudos anatômicos ao longo do tempo têm sido realizados com o objetivo de melhorar a eficácia reprodutiva da cabra e da ovelha. Contudo, existe uma barreira natural denominada cérvix, na qual se encontram os anéis cervicais que se tornam obstáculos no momento da IA em ovinos (Lima, 2000).

O cérvix e os seus anéis são constituídos por tecido cartilágneo de consistência rígida, o que dificulta a passagem do *pistolet* de inseminação através do cérvix (Dias, 2006). Este é longo, fibroso, tubular, com o lúmen bastante tortuoso, que possui 4 a 7 anéis cervicais que funcionam como barreira física de contaminantes externos. Os anéis cervicais representam a maior dificuldade na inseminação cervical profunda e intrauterina por via transcervical nesta espécie, pois estes projetam-se para o lúmen, e o segundo e terceiro anéis estão frequentemente desalinhados com o primeiro, resultando no direcionamento equivocado do *pistolet* de inseminação. Fatores como a raça, a idade e o número de partos influenciam a forma do cérvix. Na espécie ovina principalmente, esta é uma das principais limitações para o uso desta técnica, já que esta espécie apresenta um cérvix significativamente mais fechado e um maior número de anéis cervicais do que na espécie caprina, formando verdadeiras barreiras para a deposição do sêmen próximo ao útero, o

que conseqüentemente causará uma diminuição da percentagem de fêmeas fecundadas (Granados, 2006).

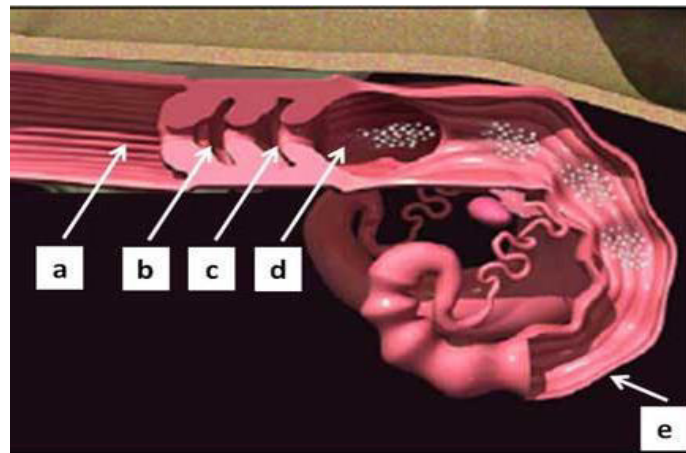


Figura 1: Local de deposição do sêmen e as suas respectivas denominações das técnicas de inseminação: (a) Inseminação vaginal, (b) Inseminação cervical superficial, (c) Inseminação cervical profunda, (d) Inseminação intrauterina por via transcervical e, (e) Inseminação intrauterina por laparoscopia. Adaptado: <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/tecnicas-de-inseminacao-artificial-em-ovinos-e-caprinos-52391n.aspx>



Figura 2: Classificação quanto à direção e à máxima profundidade de penetração em inseminação artificial em ovelhas (a) Grau 1, (b) Grau 2 e (c) Grau 3. Adaptado: Kershaw *et al.* (2005).

3.2 Fisiologia reprodutiva do carneiro e do bode

O sistema reprodutivo dos machos é constituído por vários órgãos individuais, que atuam em conjunto, com o objetivo de produzir spz e libertá-los no interior do trato reprodutor da fêmea. Para tal, está envolvido tanto o sistema neuro-endócrino (hipotálamo e hipófise anterior) como o sistema genital (Cunningham, 2002).

Os testículos têm como funções principais a produção de spz e de hormonas sexuais masculinas, entre elas a testosterona que é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias e pelo comportamento sexual.

A produção de gonadotrofinas pode ser influenciada por diversos fatores como o *stress*, a temperatura, patologias e o estado nutricional.

O tamanho dos testículos varia com a idade, peso corporal e estação do ano. No carneiro adulto e saudável, os testículos atingem cerca de 200-300g cada e no bode cerca de 100-150 g. Isso é importante porque o perímetro testicular está correlacionado com a produção espermática, com a taxa de fertilidade, a idade à puberdade das filhas, a taxa de ovulação e o número de partos múltiplos (Kimberling & Marsh, 1997; Sharkey *et al.*, 2001; Duguma *et al.*, 2002). O estado nutricional é relevante, pois a subnutrição causa diminuição no perímetro testicular (Thwaites, 1995), o qual está relacionado com a concentração de LH, FSH e testosterona (Matos & Thomas, 1992).

Os carneiros são capazes de procriar em qualquer época do ano, mas a falta de libido e a qualidade/quantidade inferiores de ejaculado durante a estação não-reprodutiva podem reduzir a sua eficiência reprodutiva (Henderson & Robinson, 2000).

Nos caprinos encontra-se o pico da atividade reprodutiva no final do Verão e no Outono, em resposta à diminuição da duração do fotoperíodo. Este período, conhecido como período de estro, está associado com: pico de produção de testosterona, alta atividade das glândulas sebáceas (odor característico), comportamento agonista (lutas) e o comportamento de corte na presença de fêmeas. Nas raças com sazonalidade acentuada, o peso testicular é geralmente mínimo na Primavera e máximo no final do Verão associado às alterações acentuadas na produção de spz. Em bodes Alpinos foram observadas grandes variações no volume do ejaculado, na concentração de spz, no número total e qualidade dos spz (motilidade, percentagem de spz vivos) e na fertilidade (Delgadillo *et al.*, 1991).

3.2.1 Seleção dos machos

A seleção dos reprodutores deve ser realizada com antecedência mínima de 60 dias antes do início das recolhas. Esse período é necessário para se realizarem alterações de manejo (alimentar, social, instalações, etc.) imprescindíveis, assim como para o treino dos machos dadores de sémen. Os parâmetros de seleção de um macho dador (genética,

morfologia física) variam consoante o interesse do produtor e as características da exploração (Maia, 2010).

As características desejáveis na seleção de reprodutores baseiam-se na qualidade do sémen (concentração, volume, morfologia dos spz); na libido (elevado interesse sexual, na deteção deaios, na capacidade de monta e cópula); avaliação do estado geral (condição corporal, unhas e aprumos); avaliação andrológica e avaliação genética (Maia, 2010).

3.2.2 Exame andrológico

A realização do exame clínico andrológico dos machos reprodutores é essencial, uma vez que as alterações funcionais podem prejudicar a eficiência reprodutiva do macho e a fertilidade das fêmeas (cobrição natural ou IA) (Maia, 2010).

Um maneio bem planeado é necessário para otimizar a eficiência reprodutiva dos machos, melhorando assim as hipóteses de se obter melhores resultados na parição. Os machos devem estar em boas condições corporais e de saúde antes da estação reprodutiva (Maia, 2010).

Quaisquer deficiências devem ser corrigidas e a avaliação da viabilidade e qualidade do sémen deve ser feita. Nesta fase, os machos inférteis podem ser identificados e rejeitados para reprodução.

12 semanas antes da cobrição	Correção de possíveis deficiências de selénio
6 semanas antes da cobrição	<i>Flushing</i> para a obtenção de uma condição corporal 3,5 no início do período de monta.
	Tratamento para eliminação endoparasitas e ectoparasitas.
	Cuidados com as unhas.
	Separação das fêmeas pelo menos 3 semanas antes da cobrição.
	Exame clínico.
2 semanas antes da cobrição	Exame clínico detalhado (aspeto geral, temperamento, estado nutricional, dentes, pele, unhas, aparelhos circulatório, respiratório e digestivo) e um exame específico que incluiu a avaliação morfológica dos órgãos genitais, exame funcional.
	Avaliação do sémen.

Tabela 5: Plano de maneio reprodutivo em machos reprodutores. Adaptado: Maia, 2010.

3.3 Recolha de sémen

A recolha de sémen em bodes e carneiros pode ser realizada recorrendo a dois métodos: recolha com vagina artificial ou electroejaculação.

A frequência das colheitas depende da idade, da condição corporal e do temperamento do animal. Contudo, regra geral, em machos adultos, estas podem ser realizadas diariamente (Mylne *et al.*, 1997), 3 a 5 colheitas diárias durante 4-5 dias separadas por intervalos de descanso de 2-3 dias, Evans & Maxwell (1987) referem que não há alterações na qualidade do sémen.

3.3.1 Razões para a colheita de sémen

A colheita de sémen é necessária quando se pretende fazer um exame andrológico mais completo, para situações de diagnóstico de alguma afeção que envolva o trato reprodutor ou para investigar subfertilidade/ infertilidade de um animal (Root Kustritz, 2007). No entanto, o motivo mais frequente é a distância física entre animais pois em certos países a importação de sémen tem mesmo menos restrições do que a entrada de um animal vivo (Johnston *et al.*, 2001) (Kutzler, 2005).

3.3.2 Técnicas de recolha

3.3.2.1 Colheita por electroejaculação

A electroejaculação baseia-se na estimulação do animal, através da utilização de um electroejaculador, que fundamentalmente gera estimulações elétricas sucessivas durante intervalos de alguns segundos. Colocado o animal em decúbito lateral, o electroejaculador é colocado por via rectal, com a finalidade de atingir a zona das glândulas acessórias (Evans & Maxwell, 1987; Nelson & Lin, 1983). A electroejaculação poderá ser utilizada quando é necessário recolher sémen de um macho que não está treinado para recolha através do método de vagina artificial ou quando se realizam exames andrológicos a um grande número de animais (Chagas & Silva, 1992). O método de recolha de sémen por electroejaculação não é de uso rotineiro, pois condiciona grandemente o bem-estar animal, por ser mal tolerado pelo animal. As desvantagens deste método prendem-se com a presença de urina se a estimulação for excessiva; maior volume de ejaculado com maior conteúdo em líquido seminal, condicionando a concentração (Chemineau *et al.*, 1991; Chagas & Silva, 1992; Hafez, 1993; Mylne *et al.*, 1997; Parkinson, 2001). A electroejaculação condiciona a resistência ao choque térmico e aos processos de congelação (Quinn & White, 1968, citados por Lopez-Brea *et al.*, 1995).

3.3.2.2 Colheita por vagina artificial

O método de vagina artificial é comumente utilizado, pois trata-se do método com mais características semelhantes às condições de pressão e temperatura do aparelho reprodutor da fêmea e proporciona a obtenção de sêmen de melhor qualidade quase de um modo natural. Apesar de mais cômodo para o animal, envolve maior dificuldade pela necessidade de treino dos animais a ejacular na vagina artificial (Maia, 2010).

Após a preparação do material para a recolha de sêmen, os operadores realizam uma higienização do prepúcio do macho e da zona envolvente com uma toalha de papel. Aproxima-se o reprodutor da fêmea, devidamente contida e o operador posiciona-se lateralmente ao reprodutor (lado direito). Realizado o salto e exteriorizado o pênis, este deve ser cuidadosamente desviado com a mão, pegando no prepúcio e simultaneamente, introduzido na vagina artificial, para que ocorra a penetração. Esta deverá estar posicionada voltada para cima no momento da ejaculação, momento este em que o macho executa um “golpe de rins” – movimento pélvico brusco e pronunciado (Mylne *et al.*, 1997; Evans & Maxwell, 1987).

3.4 Avaliação do sémen

O único teste capaz de avaliar com 100% de exatidão o grau de fertilidade de um reprodutor, utilizado em fêmeas sãs, seja por monta natural ou por IA e sob condições foto climáticas normais, é a percentagem de gestações resultantes no final da estação de monta ou de IA (Duran Del Campo, 1980).

A constituição do ejaculado é formada por 74% de fluido seminal e de 26% de spz (Anderson, 1945; Mann, 1954). Do ponto de vista químico está formado por 86% de água e 14% de matéria seca, constituída por minerais, aminoácidos, carboidratos, polissacarídeos, ácido láctico, ácido cítrico, proteínas, vitaminas e enzimas (Anderson, 1945; Mann, 1954).

Sendo o sémen constituído por células vivas, o indivíduo que manipula o sémen deverá ter cuidado no seu manuseamento, executando os procedimentos desde a colheita até à avaliação com a maior brevidade possível, de modo a evitar a morte ou alterações celulares resultantes de manipulação incorreta (Feldman & Nelson, 2004).

As variações de temperatura têm um efeito negativo na qualidade do sémen. Após a obtenção do ejaculado, este deve ser colocado no momento em banho-maria, num intervalo de temperatura entre os 30 e os 37°C (Evans & Maxwell, 1987).

A presença de água no ejaculado causa um choque osmótico, ocorrendo devido ao material molhado, à entrada de água durante a recolha ou pela utilização de diluidores inadequados (Nelson & Lin., 1983).

O ejaculado é afetado negativamente devido a detritos, bactérias, desinfetantes e contaminantes, contacto com metais, a exposição ao ar e aos raios ultravioleta, que causam perda da viabilidade seminal (Evans & Maxwell, 1987).

Uma avaliação sumária de sémen inclui a determinação de vários parâmetros entre os quais o volume, a cor, o pH, a % de MIP e a % de motilidade massal dos spz, a concentração e o número total de spz no ejaculado, a % de spz morfológicamente normais e excecionalmente a avaliação do fluido seminal (citologia e cultura microbiana). É importante que com a avaliação do sémen seja feito também o registo da história clínica do animal e de algum achado no exame de estado geral (Johnston *et al.*, 2001).

3.4.1 Fatores que influenciam a avaliação do sémen

Os resultados obtidos na avaliação do sémen são influenciados por vários fatores externos, nomeadamente a técnica utilizada na colheita, o momento em que esta foi realizada, o tempo decorrido entre a colheita e a análise, a temperatura a que a amostra é mantida, o equipamento e as técnicas utilizadas no processamento, entre muitos outros fatores (Root Kustritz, 2007). A própria qualidade do sémen é variável consoante o ambiente em que o sémen é recolhido, se o macho apresenta alguma patologia do foro reprodutivo ou

sistêmico, da idade e raça do animal, da época do ano em que a colheita é realizada, do estado nutricional, da influência social, do número de ejaculações sucessivas e da capacidade individual na produção diária de spz (volume do parênquima testicular) (Johnston *et al.*, 2001; Root Kustritz, 2007).

3.5 Características macroscópicas do sémen

3.5.1 Volume

A determinação do volume do ejaculado deve ser feita no momento imediatamente após a colheita e avaliado no tubo coletor da vagina artificial.

O volume normal médio ejaculado pelo carneiro é de 1,0ml, variando de 0,5 a 3,0ml (Evans & Maxwell, 1987; CBRA, 1998). Para os bodes, o volume normal médio ejaculado é igualmente de 1,0ml porém, a variação de volume é de 0,2 a 2,0ml (Mies Filho, 1982; CBRA, 1998; Neves *et al.*, 2008).

3.5.2 Odor

O sémen deve ser inodoro sendo que a presença de odor só se fará sentir aquando da existência de substâncias estranhas à constituição do ejaculado, ou seja, urina ou qualquer material infeccioso (Mies Filho, 1982).

3.5.3 Cor

A tonalidade normal do sémen de reprodutores ovinos é branco pérola ou marfim.

No bode, a coloração varia de branca acinzentada a amarela (Hafez, 1993). Estas tonalidades podem variar de acordo com a concentração espermática do ejaculado.

Em condições anormais, o sémen pode adotar uma coloração vermelha clara quando misturado com sangue fresco, castanho ou vermelho tijolo quando na presença de sangue antigo ou coagulado devido à degradação da hemoglobina, esverdeado ou amarelado quando na presença de pus ou amarelo turvo quando na presença de urina (Duran Del Campo, 1980).

3.5.4 Consistência ou densidade

É uma valorização macroscópica da concentração. A sua classificação está na razão direta do número de spz presentes no ejaculado e na razão inversa do volume, ou seja, quanto mais denso for o sémen, maior será a concentração de spz, ao passo que, quanto menor a densidade, menor será o número de células espermáticas contidas no ejaculado (Mies Filho, 1980).

A proporção de esperma e líquido seminal avaliado pela concentração do ejaculado é classificado através de uma escala apresentada na tabela.

Escala	Consistência	Número de spz ($\times 10^9/\text{ml}$)	
		Média	Variação
5	Cremoso espesso	5,0	4,5-6,0
4	Cremoso	4,0	3,5-4,5
3	Cremoso fino	3,0	2,5-3,5
2	Leitoso	2,0	1,0-2,5
1	Opaco	0,7	0,3-1,0
0	Aquoso/Transparente	Insignificante	

Tabela 6: Escala de avaliação da densidade do sémen. Adaptado: Evans & Maxwell, 1987.

3.6 Características microscópicas do sémen

3.6.1 Concentração

A concentração pode avaliar-se através de diversos métodos que variam segundo a sua rapidez e precisão. Macroscopicamente pode ser avaliado através da consistência, contudo trata-se um parâmetro pouco preciso.

O hematocítmetro é um método mais lento, mas mais preciso e que determina o valor da contagem microscópica do número de spz contidos numa câmara com volume conhecido e provenientes de um ejaculado com diluição conhecida.

O método espectrofotométrico é um método tanto rápido como preciso, onde é medida a absorvância da amostra (3,9ml de NaCl + 0,1ml de ejaculado) e comparada com um padrão (amostra sem ejaculado). O espectrofotómetro é calibrado consoante a espécie.

A concentração média para o sémen de carneiro varia de acordo com os autores de 1 a 4×10^9 (Nelson & Lin, 1983), 2 a 6×10^9 (Evans & Maxwell, 1987), 2 a 10×10^9 (Chemineau *et al.*, 1991) ou 3,5 a $5,5 \times 10^9$ spz/ml (Artiga *et al.*, 1995). O sémen de boa qualidade tem uma concentração de 3,5 a 6×10^9 spz/ml (Evans & Maxwell, 1987) em carneiros. De acordo com Azevedo & Toniolli (2005), a concentração média do sémen de bode é de $1,5 \pm 0,09 \times 10^9$ spz/ml.

3.6.2 Motilidade massal e individual

A avaliação da motilidade é interpretada em duas etapas: a motilidade massal e a MIP.

A avaliação da motilidade massal é estimada no sémen fresco e é o movimento resultante da interação entre o movimento individual dos spz e a concentração espermática.

Para a determinação deste parâmetro, uma gota de sémen não diluído é colocada sobre uma lâmina aquecida, observando-se, sem a cobrir com a lamela, numa baixa ampliação ótica: 10 a 100x. A determinação do valor da motilidade é realizada com base numa escala de 0 (ausência de movimentos) a 5 (máximo movimento de onda) como descrito na tabela.

Escala	Descrição do movimento das ondas
0	Totalmente sem movimento
1	Apenas movimento individual de poucos spz. $\pm 10\%$ de spz vivos.
2	Observam-se os movimentos espermáticos, mas não forma ondas. 20-40% de spz ativos.

3	Ondas de baixa amplitude e movimento lento. 45-65% de spz ativos.
4	Ondas rápidas e vigorosas, não forma remoinho. 70 - 85% de spz ativos.
5	Ondas muito rápidas e densas que se juntam formando um remoinho (difícil determinar ondas isoladas). 90% ou mais de spz vivos.

Tabela 7: Escala de motilidade massal em pequenos ruminantes. Adaptado: Evans & Maxwell, 1987.

A MIP é determinada quando o sémen é diluído ou descongelado, avaliando-se a percentagem de spz móveis e o vigor do movimento. Para estimativa da MIP, retira-se uma gota de sémen diluído, coloca-se numa lâmina e adiciona-se na outra extremidade da lâmina uma gota de cloreto de sódio ou uma gota de lactato de *Ringer*, e depois mistura-se um pouco do sémen de modo a obter uma diluição de 1:1. Coloca-se uma lamela sobre o sémen diluído e avalia-se a MIP com ampliação de 100 a 400x em vários campos (Ax *et al.*, 2000). A motilidade progressiva (trajetória para a frente) é a característica desejável. Movimentos circulares ou retrógrados são indicativo de choque térmico, contaminação (água, urina ou outras substâncias) ou de um diluidor hipotónico (Sharkey *et al.*, 2001).

Na maioria das vezes a avaliação da motilidade espermática é baseada em índices percentuais. No entanto, a valorização da determinação do tipo de movimento e vigor espermático é mais comumente utilizada.

Os sistemas automáticos de avaliação da motilidade existentes na atualidade são mais rigorosos e permitem medir com grande precisão a quantidade de spz móveis.

O sistema CASA (*Computer-based automated semen analysis*) é um desses sistemas automatizados e funciona como um analisador computadorizado da motilidade e morfometria celular (Iguer-ouada & Verstegen, 2001; Root Kustritz, 2007). Este equipamento, com um microscópio de contraste incorporado, permite avaliar muitos parâmetros de uma forma rápida e muito objetiva, incluindo: a percentagem de spz móveis; a “velocity average pathway (VAP)”- que é a velocidade média de todo o percurso percorrido pelo spz, expressa em $\mu\text{m/s}$; a “velocity straight line (VSL)”- que é a velocidade média em linha reta, do ponto inicial ao final da trajetória, expressa em $\mu\text{m/s}$; a “curvilinear velocity (VCL)” - que é a média das várias velocidades instantâneas, medidas em vários pontos do percurso dos spz, em $\mu\text{m/s}$; a linearidade (STR-“straightness”), que é uma estimativa da proximidade de uma trajetória percorrida por uma célula com uma linha reta, sendo uma média dos quocientes VSL/VAP, expressa em percentagem e a amplitude do deslocamento lateral da cabeça (Iguer-ouada & Verstegen, 2001; Rijsselaere *et al.*, 2005). Outra vantagem deste tipo de equipamento é que podemos detetar pequenas alterações na motilidade dos spz, que seriam impossíveis de identificar pelos métodos de análise convencionais

(Rijsselaere *et al.*, 2005). Isto permite a categorização de subpopulações de spz na amostra que poderão reagir de modo diferente à criopreservação ou a outros processamentos (Root Kustritz, 2007). Estes sistemas normalmente funcionam com a técnica de citometria de fluxo, o que permite não só a avaliação de diversos parâmetros simultaneamente, como também avaliar um grande número de spz (Farstad, 2008). Permitem também avaliar a motilidade dos spz, independentemente do estado do sémen: fresco, refrigerado, descongelado e também após capacitação dos spz (Martinez, 2004). A análise subjetiva da percentagem de spz com MIP já foi comparada com este sistema de análise computadorizado, e os resultados obtidos tiveram boas taxas de correlação (Root Kustritz, 2007). O grande problema do CASA, além do seu elevadíssimo custo, é a necessidade da standardização e validação do sistema antes de qualquer utilização prática. Isto é importante porque o sistema tem várias definições possíveis de serem reguladas, como o tempo de análise, intensidade de contraste, etc., que se não forem uniformizados para os diferentes estudos, podem determinar resultados diferentes no fim da avaliação (Rijsselaere *et al.*, 2005; Schafer-Somi & Aurich, 2007). Rijsselaere *et al.* (2005) relatam vários estudos em que se usou o CASA que apresentaram discrepâncias significativas nos resultados por influência da proporção da diluição da amostra de sémen, do diluidor usado, da temperatura a que se realizou a análise e da câmara de contagem.

3.6.3 Testes de funcionalidade

3.6.3.1 Morfologia – Coloração vital

Importante ferramenta no estudo da valorização do sémen. O exame morfológico é uma prova de controlo de qualidade e a percentagem de células anormais está diretamente relacionada com a fertilidade (Evans & Maxwell, 1987). As alterações morfológicas podem atingir uma ou mais partes de spz, ou seja, o acrossoma, o colo, a peça intermédia ou a cauda (Mies Filho, 1982).

A coloração vital é amplamente utilizada na rotina de avaliação da morfologia de spz e na determinação da percentagem de células anormais/mortas. A eosina-Y ao penetrar nas membranas será indicativo de alterações morfológicas, pois esta não atravessa a membrana de células vivas. A distinção é feita entre células eosinofílicas e não-eosinofílicas, que se visualizam num fundo escuro corado com um corante secundário que geralmente é a negrosina (Dott & Foster, 1972). Os spz vivos durante o exame apresentam uma coloração translúcida (não corados) e os mortos apresentam a cabeça corada de rosa acinzentado. Para corar os spz com o eosina-negrosina basta colocar uma gota de sémen e outra de corante numa das extremidades de uma lâmina para microscópio, e com o auxílio de outra lâmina ou lamela misturar as duas gotas com cuidado, e de seguida fazer um esfregaço e

deixar secar ao ar (Freshman, 2002; Johnston *et al.*, 2001). A eosina-negrosina é um corante vital, que vai realçar mais os contornos dos spz do que a célula propriamente dita (Blendinger, 2007a). Este corante associado ao microscópio de contraste de fase em campo claro permite também avaliar o estado do acrossoma dos spz vivos e mortos. Os spz vivos e com a parede intacta e danificada apresentam-se brancos sobre o fundo escuro da negrosina, com os bordos bem definidos e regulares. Os spz que estejam vivos mas que o acrossoma tenha reagido apresentam a zona acrossômica com coloração escura, e sem a extremidade apical detetável (Martinez, 2004). Assume-se que os spz que ficam corados de rosa apresentam lesões a nível da membrana celular e são por isso considerados não funcionais ou mortos (Root Kustritz, 2007). Para a coloração com o *Giemsa* modificado é efetuado primeiro um esfregaço com uma gota de sémen não diluído, este é seco ao ar, e só depois é mergulhado nas diferentes soluções do corante, cerca de 5min em cada uma (Freshman, 2002; Johnston *et al.*, 2001). As lâminas devem ser secas só por aposição de papel absorvente, sem esfregar. Para minimizar os artefactos causados pela coloração deve secar-se as lâminas na platina do microscópio a 37°C. No mínimo devem ser avaliados entre 100 a 200 spz ao microscópio ótico, com o auxílio de óleo de imersão, a uma ampliação total de 1000x (Freshman, 2002; Johnston *et al.*, 2001). Os spz devem ser observados no terço médio da lâmina, sendo estes os menos suscetíveis a alterações provocadas pela execução da técnica (Root, 2007). Está descrito ainda o uso do corante *Spermac*[®] que permite obter uma coloração rápida com características únicas, corando o núcleo dos spz de vermelho, o acrossoma, peça intermédia e cauda de verde, e a zona equatorial do acrossoma de verde-pálido (Feldman & Nelson, 2004), tornando-se muito útil no estudo da morfologia do acrossoma (Martinez, 2004; Monteiro *et al.*, 2009). Independentemente da técnica de coloração usada há sempre alterações nos spz resultantes da sua execução, sendo os artefactos descritos mais regularmente, as cabeças destacadas, caudas enroladas e dobradas e as peças intermédias dobradas. A consistência na técnica usada é fundamental para que as avaliações em série sejam as mais exatas e precisas possível (Johnston *et al.*, 2001). O uso de corantes que não sejam osmoticamente semelhantes às suspensões espermáticas resulta no destacamento do acrossoma de alguns spz. Este efeito osmótico é mais pronunciado em sémen descongelado do que no fresco (Martinez, 2004). A avaliação da morfologia dos spz idealmente deveria ser feita com microscópios de contraste de fase, em que se coloca uma gota de sémen não diluído numa lâmina, cobrindo-se com uma lamela grande. Isto vai levar a que o líquido se espalhe numa camada fina, permitindo uma avaliação precisa dos spz individualmente sem recurso a corantes, uma vez que as técnicas de coloração aumentam a ocorrência de defeitos (Feldman & Nelson, 2004). Mas este tipo de equipamento não está disponível para a grande maioria dos veterinários, tendo

que se recorrer ao microscópio ótico (Root, 2007). Os problemas de qualquer método de coloração, além dos já citados, são a incapacidade de classificar consistentemente os spz que se apresentam parcialmente corados e a interferência do glicerol ou da gordura (presentes na maioria dos diluidores para conservação do sémen) com o corante (Rijsselaere *et al.*, 2005).

Além das alterações resultantes do processamento, surgem também as que ocorrem ainda no trato reprodutor do macho. Trauma testicular, febre ou infecção do trato reprodutor são possíveis causas de alterações morfológicas dos spz, devido ao aumento da temperatura nos testículos.

No processo de avaliação do sémen são registados: o número e tipos de alterações existentes na amostra e determinada a percentagem de spz normais. Entre as alterações descritas, as que se encontram mais frequentemente são cabeças destacadas; acrossomas salientes ou destacados; gotas citoplasmáticas proximais e distais; peças intermédias ou caudas dobradas e caudas de ligeira a fortemente enroladas (Feldman & Nelson, 2004). Os spz não viáveis podem ser classificados em cinco categorias diferentes: 1. spz sem cauda (cabeça isolada normal ou anormal); 2. spz com alterações na cabeça e acrossoma (cabeça estreita, piriforme, gigante, pequena, estreita na base, acrossoma destacado, enrugado, *knobbed*, etc.); 3. spz com alterações na cauda e peça intermédia (cauda dobrada, fortemente dobrada, enrolada, enrolada na ponta, peça intermédia quebrada, espessamento, pseudogota); 4. spz com gota citoplasmática proximal; 5. spz com gota citoplasmática distal. Há que ter em atenção que quando um spz apresenta mais que um defeito, deve ser registado o mais grave. Devem-se contar as cabeças destacadas e não as caudas (Freshman, 2002). Assume-se que a percentagem de células coradas seja inferior a 20 ou 30% (Chemineau *et al.*, 1991).

3.6.3.2 Teste de endosmose

Tem como finalidade avaliar a função bioquímica da membrana espermática essencialmente a capacitação espermática, a reação do acrossoma e a ligação do spz com a superfície do oócito aquando da fecundação (Jeyendran *et al.*, 1984).

O HOST (*hypoosmotic swelling test*) baseia-se na observação de um spz com a membrana espermática íntegra, se quando exposto a uma solução hiposmótica permite a passagem da água pela membrana até se restabelecer o equilíbrio osmótico entre os líquidos intra e extracelular (Santos *et al.*, 2001). Com a entrada da água na célula, há um aumento do volume celular (edema), causando uma posterior inflexão helicoidal da cauda do spz (Jeyendran *et al.*, 1984).

O teste hiposmótico (HOST) apresenta-se como uma boa ferramenta para avaliar a integridade de membrana dos spz de caprino (Neves *et al.*, 2008). De acordo com Fonseca *et al.* (2005), o teste é realizado sob microscopia de contraste de fase, no qual os spz são submetidos a um meio hipotônico e procede-se à contagem de 200 células, em pelo menos 5 campos diferentes. Os mesmos pesquisadores visando padronizar uma solução hiposmótica para uso no sémen caprino testaram 10 soluções à base de citrato de sódio e frutose com osmolaridades (mOsm/L) de 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 290 e 300 mOsm/L, e encontraram como resultados as respectivas percentagens: 34,1; 38,8; 45,3; 51,5; 46,8; 42,8; 38,2; 29,0; 19,4 e 23,1%, demonstrando que a solução de 125 mOsm/L se apresenta como a melhor opção para a avaliação desse parâmetro seminal. Entretanto, Cortés *et al.* (1993) e Sousa *et al.* (2001) indicam que a solução hiposmótica aconselhada para a determinação e seleção de indivíduos de maior qualidade seminal é a solução de 100 mOsm/L.

3.6.3.3 Termoresistência (TTR)

O TTR é um teste para prever a capacidade fecundante de uma determinada amostra de sémen. Apresenta alta correlação com a fertilidade e baseia-se na exploração da resistência dos spz ao *stress* térmico, sendo os resultados analisados aquando da avaliação da motilidade e na verificação da integridade do acrossoma (Viana *et al.*, 2009). O TTR pode ser executado das seguintes formas:

- TTR lento (TTR-L): consiste na submissão da amostra de sémen a 38°C durante 3h (CBRA,1998). Uma amostra que apresenta 5% do movimento progressivo após o teste revela uma fertilidade baixa (Viana *et al.*,2009);
- TTR rápido (TTR-R): consiste na submissão da amostra de sémen a 46°C por 30min (CBRA,1998);
- TTR stressante (TTR-E): este teste consiste na exposição da amostra de sémen por 5h a 38°C na forma de um teste lento e depois transferi-la para uma refrigeração a 5°C por 24h (CBRA,1998).

Para quaisquer dos testes de termoresistência, a amostra será considerada apta se mantiver 30% de spz com movimento progressivo para ovinos e caprino, sendo que na realidade conta o número de spz “úteis” por dose (CBRA,1998).

3.7 Conservação do sémen e outras tecnologias reprodutivas

3.7.1 Diluidores

O uso de diluidores na conservação do sémen é imprescindível não só para tamponar as alterações do pH, que invariavelmente ocorreriam ao longo do tempo, como são um substrato de energia para os spz e previnem que nestes ocorram alterações durante a refrigeração, congelação e descongelação. Podem ainda ter associados agentes bactericidas que previnem o crescimento bacteriano. Alguns diluidores podem ser tanto usados para a preparação do sémen refrigerado como para a do congelado (Shahiduzzaman & Linde-Forsberg, 2007; Verstegen *et al.*, 2005).

O plasma seminal oferece uma proteção limitada aos spz contra mudanças de temperatura, sendo necessário diluir o sémen com diluidores especiais para reduzir tais prejuízos. Um bom diluidor, segundo Mies Filho (1987), deve apresentar as seguintes características: ausência de toxicidade celular, osmolaridade igual ou próxima à do sémen, pH favorável segundo a espécie, preparação simples e baixo custo. O uso de meios diluidores durante o processamento do sémen tem como principal finalidade aumentar o volume e favorecer a proteção aos spz (Sousa *et al.*, 2010).

Os diluidores utilizados para criopreservar o sémen de pequenos ruminantes devem ter propriedades semelhantes às dos diluidores utilizados para sémen fresco, porém devem estar tamponados contra as mudanças de pH, conter uma fonte de energia e diminuir o crescimento bacteriano, pela adição de antibióticos. Além disso, devem conter protetores da membrana celular, durante o arrefecimento a 5°C e um agente crioprotector para evitar lesões da membrana durante a criopreservação (Evans & Maxwell, 1990).

Um bom diluidor para sémen de caprino caracteriza-se pela ausência de toxicidade à célula espermática; pela osmolaridade adequada, onde os spz preferem meios hipertônicos entre 425 e 525 mOsm; poder nutritivo e tampão eficaz; pelos estabilizadores de membrana; pelo pH em torno da neutralidade (entre 6 e 8), que favorece a sobrevivência espermática e, por último, por ser de fácil preparação e baixo custo (Concannon & Batista, 1989; Purdy, 2006). Segundo Gibbons (2002), é imprescindível na composição de um diluidor usado para a congelação do sémen caprino, uma substância tampão como o Tris, sais como o citrato de sódio, um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose ou trealose), crioprotectores penetrantes (glicerol, etilenoglicol ou dimetilsulfoxido) e não penetrantes (leite ou gema de ovo) além de antibióticos, sendo a penicilina e a estreptomicina os mais utilizados. Um dos diluidores mais utilizados é o Tris, ácido cítrico, frutose, gema de ovo e glicerol (Neves *et al.*, 2008). De acordo com Purdy (2006), além do Tris, diluentes à base de leite em pó desnatado também são muito utilizados, entretanto o

primeiro confere os melhores resultados de motilidade após a descongelação (Deka & Rao, 1987), pois o sêmen de caprino apresenta particularidades que limitam a utilização exagerada de diluidores ricos em fosfolípidos, como aqueles à base de leite ou mesmo com altas proporções de gema de ovo. Tal facto deve-se a componentes do plasma seminal específicos desta espécie produzidos principalmente na contra estação sexual (Neves *et al.*, 2008). Esses componentes foram primariamente definidos como EYCE (enzima coaguladora da gema de ovo) (Roy, 1957) e SBUIII (proveniente da glândula bulbouretral e que causava decréscimo da sobrevivência espermática quando se usava diluidores à base de leite) (Nunes *et al.*, 1982). Entretanto, estudos mais recentes identificaram essas duas enzimas como sendo a mesma molécula (Leboeuf *et al.*, 2000). Trata-se da fosfolipase A, uma glicoproteína lípase produzida na glândula bulbouretral dos caprinos que hidrolisa fosfolípidos presentes nos diluidores, formando lisolecitinas e ácidos gordos, substâncias tóxicas aos spz (Purdy, 2006). Diante deste problema, procurou-se um meio diluidor pobre em fosfolípidos, sendo então desenvolvida a água de coco em pó (ACP®) como uma alternativa viável para a diluição do sêmen caprino (Neves *et al.*, 2008).

3.7.2 Crioprotectores

Os agentes crioprotectores são essenciais para a criopreservação de quase todos os sistemas biológicos (Fahy, 1986). Esses agentes devem ser adicionados aos diluidores para possibilitarem a sobrevivência dos spz durante o processo de congelação e descongelação (Amann & Picket, 1987). Esses componentes são classificados como penetrantes, quando exercem a sua ação crioprotectora dentro da célula, ou não penetrantes, cuja atividade de crioprotecção ocorre fora da célula ou na sua superfície.

3.7.3 Criodanos

Os processos de congelação e descongelação do sêmen induzem alterações bioquímicas, funcionais e ultra-estruturais aos spz (Watson, 2000), resultando na redução da motilidade, na integridade da membrana e na capacidade de fertilização (Purdy, 2006). Particularmente, a congelação induz danos diretos às células, explicadas por duas hipóteses dependendo da taxa de congelação do sistema: a formação de gelo intracelular a taxas rápidas de congelação e o “efeito solução” a taxas lentas de congelação (Mazur, 1970). Quando a taxa de congelação é rápida, a água intracelular congela e forma cristais de gelo, tidos como letais para a célula. Por outro lado, quando a taxa de congelação é lenta, os cristais de gelo formam-se na solução extracelular primeiro, o que gera um aumento na concentração de eletrólitos da fração não congelada. O aumento da concentração induz, consequentemente, desidratação celular através de uma diferença de pressão osmótica. Se a desidratação é severa, a toxicidade ou o dano celular podem ser induzidos devido à alta

concentração de eletrólitos, o que é denominado por “efeito solução” (Fahy, 1980). Sabe-se que a formação de cristais intracelulares é letal e consiste no principal mecanismo de danos envolvido quando usadas taxas rápidas de congelação (Toner *et al.*, 1993), mas os danos pelo “efeito solução” não estão completamente compreendidos (Han & Bischoff, 2004). Porém, tanto o gradiente osmótico extracelular como a formação de cristais de gelo intracelulares causam alterações na organização das membranas bem como na função dos organelos (Mazur, 1984).

3.7.4 Refrigeração do sémen

O sémen refrigerado é aquele que se utiliza imediatamente após a colheita, devendo ser mantido a 15 ou a 5°C, após a diluição e utilizado até 8 a 12h depois (Chemineau *et al.*, 1991; Lopez, 1991; Parkinson, 2001).

Para o sémen ser conservado, adiciona-se diluidor em proporção que permita obter uma quantidade final de $320\text{-}350 \times 10^6$ spz viáveis por palhinha (Guerin, 1990; Colas & Guerin, 1984) ou 400×10^6 (Chemineau *et al.*, 1991).

Segundo Purdy (2006), a taxa de diluição do sémen de caprino pode variar entre 1:1 a 1:23 (sémen:diluidor), sendo possível a utilização de uma dose prática de 1:9 quando não se dispõe de meios para determinar com eficácia a concentração pós-diluição de aproximadamente 200×10^6 spz/ml (Nunes, 2002).

De acordo com Castelo *et al.* (2008), a diluição do sémen de caprino deve ser realizada logo depois da colheita do sémen, na qual tanto o ejaculado como o diluidor devem ser mantidos em banho-maria a 37°C por 5 min de modo a garantir que os dois estejam à mesma temperatura.

Após a diluição procede-se ao enchimento das palhinhas de 0,25 ou 0,5ml (Chagas & Silva, 1992), aplicando vácuo na extremidade que contém o tampão; a outra extremidade é selada por ultrassons, por calor, com vidro ou plástico colorido ou com tampão de pó de álcool polivinílico. A refrigeração deve ser progressiva (1 a 1h30 para 15°C e 2 a 3h para os 5°C) (Evans & Maxwell, 1987).

3.7.5 Congelação de Sémen

A conservação do sémen em azoto líquido é realizada a -196°C. Salamon *et al.* (1996) citados por Sharkey *et al.* (2001) referem que o sémen congelado pode manter a fertilidade durante pelo menos 27 anos.

A percentagem de MIP dos spz diminui significativamente com a congelação e descongelação, pois inevitavelmente ocorrem lesões funcionais e/ou morfológicas devido ao *stress* osmótico, químico e mecânico causados pelos procedimentos de criopreservação. Estes procedimentos não causam só a morte a alguns spz, como provocam lesões latentes

na população dos spz que sobrevive à criopreservação, e que acabam por comprometer a sua longevidade e a capacidade de fertilização (Martinez, 2004).

Na congelação, os diluidores utilizados têm igual finalidade para o sémen refrigerado, a que se soma a necessidade de crioprotecção, proteger o spz dos efeitos deletérios da congelação (Parkinson, 2001).

O sémen congelado poderá ser acondicionado como o sémen refrigerado em palhinhas com 0,25 ou 0,5ml. As palhinhas são cheias como referido para o sémen refrigerado, simplesmente neste caso é necessário deixar uma câmara de expansão na extremidade a selar para evitar que as palhinhas quebrem durante a congelação (Manso *et al.*, 1997).

A diluição é semelhante ao descrito na refrigeração do sémen sendo realizada uma diluição única onde se recomenda um arrefecimento até 5°C durante 1h30 a 2h (Evans & Maxwell, 1987; Salamon & Maxwell, 1995).

A segunda etapa da congelação pode ser executada manualmente, colocando as palhinhas num suporte em contacto com vapores de azoto líquido -75° a -125°C (Salamon & Maxwell, 2000), a 3-6cm (Evans & Maxwell, 1987; Maxwell *et al.*, 1995; Salamon & Maxwell, 2000) ou mesmo 20cm (Chemineau *et al.*, 1991) acima do nível do líquido. Permanece durante 7 a 8 min, após a transferência para azoto líquido devidamente acondicionadas em *canisters* utilizando *goblets* (Evans & Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991). Neste tipo de congelação pretende-se uma velocidade -15 a -60 °C/ min (Watson, 2000).

Para o transporte de sémen congelado ser efetuado é imprescindível o uso de um contentor de azoto líquido, o qual tem a capacidade para manter a temperatura a -196°C (Blendinger, 2007b).

3.7.6 Descongelação do sémen

A taxa de descongelação é um importante fator que afeta a qualidade do sémen criopreservado (Tuli *et al.*, 1991). A taxa ideal visa a recuperação de uma maior proporção de spz sendo variável de acordo com a espécie.

Tradicionalmente, o sémen de caprino armazenado em palhinhas é descongelado a 37°C durante 12 a 30s (Cabrera *et al.*, 2005; Purdy, 2006), porém, outro protocolo mais lento (5°C/2min em banho-maria) pode ser utilizado com menor eficiência na taxa de recuperação espermática (Deka & Rao, 1987). Kozdrowski *et al.* (2007) utilizaram uma taxa de descongelação de 40°C/30s para o sémen caprino, obtendo resultados consideráveis de motilidade após a descongelação. Tuli *et al.* (1991) observaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da MIP para o sémen caprino descongelado a 70°C/ 7s (36,9%) e na integridade da membrana plasmática (39,8%), comparado a taxa de descongelação de 37°C/2min (31,5% e

33,7% de motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática, respetivamente) ou 40°C/20s (32,4% e 33,5% de MIP e integridade de membrana plasmática, respetivamente). Assim, é possível que haja uma interação entre o volume da palhinha e a taxa de descongelação que promova uma maior taxa de recuperação espermática em caprinos (Purdy, 2006).

Em ovinos, é mais seguro utilizar temperaturas da ordem dos 38°C porque a temperaturas superiores, basta 1s ou 2s de demora na remoção do banho-maria para ser letal aos spz (Guerin, 1990).

Atenção deve ser dada à temperatura e ao tempo de descongelação, pois em temperaturas superiores a 37°C, com tempo não controlado tornam-se uma variável crítica e podem resultar em elevadas taxas de mortalidade espermática (Purdy, 2006).

3.7.6.1 Avaliação do sémen à descongelação

Os danos causados pela criopreservação são prejudiciais ao transporte e sobrevivência dos spz no trato reprodutivo feminino (Salamon & Maxwell, 1995). Segundo Bailey *et al.* (2000), a capacitação espermática induzida pela congelação poderia produzir uma população de spz após a descongelação com viabilidade curta e ineficaz.

Após o processo de preservação, as células espermáticas devem apresentar boa motilidade a fim de alcançar o local de fecundação e manter a integridade das membranas espermáticas para levar a cabo a penetração do oócito (Royere, 1996), já que qualquer falha inerente à fisiologia espermática poderia prejudicar a sua capacidade de fertilização do oócito como também de suportar o desenvolvimento embrionário (Holt & Look, 2004).

Durante a congelação/dcongelação, os spz são submetidos a condições desfavoráveis como desidratação, mudanças da fase de transição dos fosfolípidos da membrana, efeito solução e a formação de gelo intracelular (Parks & Graham, 1992). A consequência imediata destes processos é a rutura da membrana plasmática (Watson, 1995) devido ao *stress* térmico, mecânico, químico e osmótico exercido sobre a célula durante a congelação (Parks & Graham, 1992). O acrossoma também pode sofrer mudanças estruturais e degenerativas, como a rutura da membrana acrossómica (Hafez, 1995).

Após descongelação, o sémen deve ser colocado num tubo aquecido a 37°C, temperatura que simula o ambiente de inseminação e pode ser avaliado microscopicamente numa platina aquecida a 37°C. Observa-se a MIP que deve ser superior a 40% (Evans & Maxwell, 1987). A viabilidade das células pode ser avaliada através da coloração eosina-negrosina e a quantidade de spz não viáveis não deve exceder os 70% (Evans & Maxwell, 1987).

O teste de endosmose efetuado após descongelação do sémen parece não ser tão correto na estimativa da fertilidade, já que o processo de congelação afeta a membrana espermática e a sua resposta ao meio hiposmótico, apesar de não afetar as propriedades da membrana envolvidas no processo de fertilização (Hauser *et al.*, 1992).

3.8 Sincronização de cios para inseminação artificial

Por razões fisiológicas (inerentes às espécies ovina e caprina), comerciais, técnicas ou mesmo de manejo, a sincronização e/ou indução de estro podem ser justificadas. Basicamente, as biotecnologias podem ser estabelecidas durante a estação de acasalamento natural ou de anestro e transição. Os métodos de manipulação do ciclo éstrico podem através da utilização de fármacos, como prostaglandinas, progestagénios, gonadotrofinas e os seus substitutos apresentar vantagens e desvantagens (Fonseca *et al.*, 2008). Os progestagénios, análogos sintéticos da progesterona são utilizados em esponjas intravaginais, com um cordão de aproximadamente 15cm de comprimento para facilitar a retirada. As doses convencionais impregnadas são de 50 mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP) ou 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA) (Moraes, 2002). A colocação de implantes intravaginais deve ser feita com cuidados de higiene com o material (espécúlo) e aplicação de antibiótico em *spray* para redução da fauna saprófita dos animais evitando infeções (Moraes *et al.*, 2002). Prostaglandinas, PGF₂ e os seus análogos são utilizados apenas para sincronização de ovelhas cíclicas, enquanto que os progestagénios podem ser usados nas cíclicas e nas que estejam em anestro (Keisler & Buckrell, 1997; Forcada & Abecia, 2000; Jainudeen *et al.*, 2000). O efeito luteolítico promove a regressão do corpo lúteo e a diminuição da concentração sérica de progesterona. O consequente aumento da libertação de gonadotrofina estimula o crescimento de folículos e o estro ocorre.

	Tipo de estro	Tipo de IA	Momento ideal inseminação
Ovelhas	Natural	Cervical ou Vaginal	12-18h após o início do estro
	Sincronizado	Cervical ou Vaginal	48h-58h após a remoção da esponja
			IA única: 55h após a remoção da esponja
			Dupla IA: 48-50h e 58-60h após a remoção da esponja
		Intrauterina	60-66h após a remoção da esponja
		Intrauterina em fêmeas superovuladas	36-48h (preferencialmente 44-48h) após a remoção da esponja
Cabras	Natural		12-18h após o início do estro
	Induzido		Tratamento longo ou curto com progestagénio: duas IA- cerca de 30 e 50h após a remoção das esponjas
			Tratamento curto com progestagénio: uma única IA- 43 a 46 h após a remoção das esponjas dependendo da raça
			Fêmeas jovens: cerca 45 ± 1 h após a remoção das esponjas

Tabela 8: Protocolo de sincronização de cios. Adaptado: Bettencourt, 1999.

4. Inseminação artificial

O russo Elias Ivanov, entre 1901 e 1905 efetuou de forma massiva as primeiras inseminações artificiais em ovinos (Bonadonna,1937). Por volta de 1932 desenvolveram-se as primeiras observações sobre a vitalidade do spz no aparelho reprodutor da ovelha, os trabalhos relativos à construção da primeira vagina artificial para ovinos, a utilização de seringas para administrar microdoses de sémen nos ovinos e o lançamento das bases teóricas para diluição do sémen (Bonadonna,1937).

O método mais simples de IA é a inseminação vaginal, o que pode resultar numa taxa de concepção menor. A utilização de técnicas cervicais e transcervicais poderia originar taxas de gestação muito mais elevadas, mas a IA laparoscópica é a mais eficaz. No entanto, também é o método mais caro e complexo. Para além das tendências gerais, as publicações mostram uma gama bastante ampla de taxas de sucesso de prenhes: 31,25% em vaginal, 18% (Anel *et al.*, 2005) (Yamaki *et al.*, 2003), 42% (King *et al.*, 2004); e 65-75% (Salamon & Maxwell, 1995; Donovan *et al.*, 2001; Stefanov *et al.*, 2006) no colo do útero; 69,6-76,4% (Szabados, 2006) em cervico-uterina. 44,89% (Anel *et al.*, 2005), 64% (Yamaki *et al.*, 2003) e 69% (King *et al.*, 2004) na inseminação laparoscópica. Deve notar-se que estes resultados são afetados de acordo com o sémen utilizado (fresco, refrigerado ou congelado) (Perkins *et al.*, 1996; Moses *et al.*, 1997).

A IA é uma biotecnologia reprodutiva que se adapta às diferenças entre as espécies, sendo neste caso, mais fácil em cabras que em ovelhas, devido às particularidades anatómicas do cérvix ovino, referidas anteriormente.

4.1 Inseminação vaginal (IV)

A IV é uma técnica simples e consiste na deposição do sémen na vagina, o mais profundo possível, sem a preocupação de localizar o cérvix. Em caprinos não se visualiza a abertura do canal cervical (Buckrell *et al.*, 1991).

Requer pouco treino do operador, utiliza-se apenas sémen fresco ou sémen diluído. Esta técnica é contraindicada para sémen congelado, devido aos baixos resultados de fertilidade por ela obtidos. O animal permanece em estação e a pipeta é inserida aproximadamente 13 cm. Utilizando 200×10^6 a 400×10^6 spz/ml, o índice de concepção esperado é de 40 a 65% (Buckrell *et al.*, 1991).

4.2 Inseminação cervical

Com a técnica cervical, o sémen é depositado dentro do cérvix (1 a 3 cm). Utiliza-se um espéculo para visualização do cérvix, inserindo-o 10 a 14 cm. Geralmente utiliza-se sémen fresco ou refrigerado sendo uma técnica rápida e de fácil aplicação, com custos relativamente baixos. Pode ser utilizado sémen refrigerado na concentração de 100×10^6 a

200x10⁶ spz/ml, apresentando índices de concepção de 60 a 70% (Ax *et al.*, 2004). A fertilidade obtida por inseminação cervical, com sémen congelado, aumenta de acordo com a profundidade com que é depositado, permitindo assim, a redução do número de spz na dose inseminante (Bettencourt, 1999).

4.3 Inseminação transcervical

A inseminação transcervical em ovelhas baseia-se na localização, retração e estabilização do cérvix permitindo uma penetração intrauterina. É necessário o uso de vaginoscópio/espécule e de instrumentos de fixação do cérvix. Fatores como a idade, a estação reprodutiva e o tempo pós-parto condicionam o sucesso da técnica (Ax *et al.*, 2004).

4.4 Inseminação intrauterina - Técnica de inseminação laparoscópica

A técnica consiste na deposição do sémen diretamente nos cornos uterinos por meio de instrumentos utilizados em procedimentos laparoscópicos. A aplicação de sémen nos dois cornos uterinos permite obter taxas de fertilidade mais elevadas comparativamente à inseminação num único corno uterino (Killeen, 1982). Além de permitir a transposição da barreira física imposta pelas características anatômica do cérvix, a técnica favorece a redução da dose a inseminar. Pode ser utilizada independentemente da época do ano, do manejo, do tipo de estro: natural, sincronizado ou induzido, da forma de apresentação e da preparação do sémen (Maxwell, 1986b; Findlater *et al.*, 1991; Ghalsasi, 1996; Luz, 2000; Hollinshead *et al.*, 2002). Embora seja uma técnica que necessite de material sofisticado e de mão-de-obra especializada, permite obter taxas de concepção elevadas, até 75% com sémen congelado (Buckrell *et al.*, 1992).

A IA intrauterina ou laparoscópica, tem sido a melhor técnica para utilização de sémen de ovino congelado, contrariamente aos caprinos, segundo Evans & Maxwell (1990), as taxas de concepção normalmente são de 50 a 55%, podendo chegar até a 60 ou 75%. Os mesmos autores afirmam também que as taxas de concepção poderão sofrer influência dependendo do intervalo entre a retirada das esponjas e a inseminação, recomendando a deposição do sémen a partir das 60h após a retirada das esponjas. Mesmo sendo um ato invasivo, a IA intrauterina não oferece risco de morte ao animal, a técnica possibilita a plena visualização do útero e a eleição do melhor ponto de deposição do sémen, superando todas as barreiras cervicais (Salamon & Maxwell, 2000).

5. Diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes

O período médio de gestação da ovelha é de 147 dias (Cunha *et al.*, 2004) e das cabras 152 dias (Ribeiro *et al.*, 1996), salientando que estes valores podem variar de acordo com fatores nutricionais, manejo sanitário, peso de animal, número de fetos entre outros.

O controlo reprodutivo das fêmeas é uma forma simples de prever e gerir os efetivos, sendo que o índice de retorno de cio, por exemplo, é um método simples, pois necessita apenas de se saber se a fêmea retornou ao cio após o acasalamento ou após a IA. Porém, há o risco de diagnosticar o retorno ao cio em momento tardio e perde-se o período de acasalamentos (FAO, 1987).

Para o diagnóstico de gestação, numerosos métodos já foram testados em caprinos e ovinos. Alguns são muito simples e outros mais dispendiosos e sofisticados. Entre eles os mais utilizados são: avaliação clínica e ultrassonografia.

No caso da avaliação clínica, realiza-se a palpação abdominal e do úbere. Aos 3 meses após o acasalamento/ IA obtém-se uma precisão de diagnóstico superior a 90%. No entanto é um intervalo de tempo longo para diagnosticar a prenhez (ACPA, 2003). Os caprinos mostram frequentemente sinais de estro durante a gestação. Por isso é preciso ter cuidado a diferenciar a gestação da atividade cíclica normal e da pseudogestação.

O exame ultrassonográfico pode ser realizado em pequenos ruminantes pelas vias transretal, transcutânea abdominal ou mesmo pela via transvaginal.

A ultrassonografia transretal proporciona uma precocidade diagnóstica, por possibilitar a visualização de estruturas entre 20 e 30 dias de gestação, bem como a identificação da vesícula embrionária (Calamari *et al.*, 2003). É importante lembrar que para um diagnóstico conclusivo é imprescindível a observação dos batimentos cardíacos (Freitas & Simplício, 2001; Bicudo, 2002) e também é possível nesta fase a identificação de movimentos peristálticos e o fluxo do conteúdo intestinal. Este método é o mais utilizado em pequenos ruminantes, sendo aos 30 dias após a cobrição, o período ideal para iniciar os exames pois será possível a observação de fluídos uterinos. Aos 40 dias de gestação torna-se mais evidente, pois é neste momento que o útero se encontra no lado direito da cavidade abdominal, enquanto que na gestação avançada devido à presença do rúmen, os fetos ficam situados na região abdominal ventrolateral direita (Freitas & Simplício, 2001).

A via transvaginal apesar de ser bastante eficiente, é pouco usada devido às consequências que este método pode gerar, como aborto e infecções.

Estudos

Os estudos apresentados foram desenvolvidos no Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada (CRAHA), tendo como principal objetivo identificar quais os protocolos de congelação de sémen mais adequados para as raças autóctones ovinas (Raça Merino Branco e Merino Preto) e caprinas (Raça Serpentina) a serem utilizados no CRAHA, promovendo um sinergismo entre as características dos ejaculados, a maximização dos índices de fertilidade do sémen congelado, bem como o processo de diluição, o tempo de equilíbrio e as taxas de arrefecimento, congelação e descongelação, além do efeito da fêmea que, pelas características anatómicas, é um importante limitador da utilização massiva da inseminação artificial.

1. Estudo 1

1.1 Objetivo

Este estudo teve como objetivo comparar três protocolos de congelação de sémen de carneiro e bode, utilizando distintos diluidores, através da avaliação da viabilidade dos spz, após a descongelação, em termos de motilidade individual progressiva (MIP) e da sua utilização na inseminação artificial.

1.2 Materiais e Métodos

O estudo foi desenvolvido no Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada (CRAHA), inserido no Centro de Experimentação do Baixo Alentejo (CEBA), Vila Nova de São Bento, Serpa.

1.2.1 Animais

Foram utilizados 4 carneiros, com idades compreendidas entre os 3 e 5 anos, sendo dois de raça Merino Branco e dois de Merino Preto. Foram igualmente utilizados três bodes de raça Serpentina com idades compreendidas entre os 3 e 5 anos.

Os ovinos utilizados neste estudo estão inscritos nos Livros Genealógicos das respetivas raças e estão avaliados geneticamente para características de interesse zootécnico, nomeadamente através dos parâmetros: VG-PROL, rPROL, VG-PDdi, rPDdi, VG-PDma, rPDma. Nos caprinos, a avaliação genética é feita com base no VGP 240, P240, VGProL e INTP.

Os animais selecionados pertencem ao efetivo reprodutor do CEBA, estando os machos a serem utilizados como dadores de sémen no CRAHA.

Os reprodutores foram submetidos a exame físico do estado geral e exame andrológico aquando da entrada no CRAHA.

1.2.2 Colheita e análise de sémen

Foram realizadas várias recolhas de sémen num total de 52 colheitas: 12 de sémen de bode e 40 de sémen de carneiro. Foram estudadas 16 amostras das duas espécies (ovinos 10 amostras e caprinos 6 amostras) que correspondiam aos parâmetros definidos pelo estudo. As doses recolhidas, no período decorrente entre 17 de Dezembro de 2015 e 2 de Março de 2016 integram o BPGA. As recolhas foram realizadas em dias diferentes consoante a espécie, de acordo com o “Guia de Boas Práticas e Procedimentos do CRAHA” (ver apêndice I) pois não podem ser realizadas colheitas de espécies diferentes no mesmo dia. Todo o sémen foi obtido pelo mesmo operador, com o intuito de eliminar quaisquer variações na qualidade do sémen resultantes da técnica de colheita.

As recolhas dos ejaculados de ambas as espécies foram realizadas em sala própria para recolha de sémen, com recurso ao método da vagina artificial, na presença de uma fêmea em cio colocada num tronco de contenção. Imediatamente após a recolha, e já no laboratório de tecnologia de sémen, procedeu-se à análise dos ejaculados recolhidos em relação aos seguintes parâmetros macroscópicos: cor, odor, consistência e volume de sémen estimado, por pesagem em balança digital e comparação com a leitura do tubo de ensaio graduado. Após esta avaliação inicial a amostra foi colocada em banho-maria a 37°C.

A avaliação microscópica do sémen incidiu sobre os seguintes aspetos: determinação da motilidade massal numa escala de 0 a 5; determinação da concentração de spz, utilizando o espectrofotómetro; estimativa da MIP (sémen diluído) através da observação ao microscópio; estimativa da percentagem de spz vivos e morfologia (a morfologia foi somente avaliada em spz vivos).

Para determinação da motilidade massal (parâmetro indicador da qualidade do sémen) utilizou-se um microscópio com platina aquecida numa ampliação de 100x, colocando uma gota de sémen não diluído sobre uma lâmina aquecida (37°C). A classificação atribuída baseou-se em Evans & Maxwell (1987), atribuindo uma escala de 0-5 referente à motilidade massal. Para o estudo 1, a motilidade massal padronizada foi ≥ 4 , pois estima-se que 70 a 85% dos spz estejam ativos.

A determinação da concentração de spz por ml foi executada utilizando o espectrofotómetro *Hyperion Inc., Miami, USA* calibrado para pequenos ruminantes. A medição é realizada em *cuvettes* apropriadas, em que se fez uma diluição de 0,1 ml de sémen em 3,9 ml de cloreto de sódio.

A observação da percentagem de spz com movimento progressivo (sémen diluído) no microscópico contraste de fase (ampliação 100x) baseia-se numa estimativa percentual da MIP através da retirada 10µl de sémen puro, com uma micropipeta e colocá-la numa lâmina aquecida, adicionando na outra extremidade da lâmina uma gota de diluidor a 37°C. Uma vez que a MIP é um parâmetro a ter em conta para uma posterior diluição, para este estudo considerou-se como motilidade aceitável um valor de $\geq 60\%$ spz em movimento rectilíneo progressivo.

1.2.3 Diluição, Processamento e Congelação de sémen

Nos protocolos de congelação de sémen de carneiro, os diluidores foram adicionados a cada amostra de sémen, consoante os volumes calculados, para obtenção da concentração de spz pretendida em cada dose. Os diluidores utilizados para congelação de sémen de carneiro foram o Ovixcell® composto por água, sais, açúcares, eletrólitos, glicerol, antibióticos e proteínas vegetais, e um protocolo desenvolvido na Ex- Estação Zootécnica Nacional (EZN) em que o sémen é diluído num meio adaptado de Evans & Maxwell (1987), composto por 4,4% Tris + 7% glicerol + 16,2% gema de ovo.

Para formulação do diluidor EZN foi necessário adicionar gemas provenientes de ovos frescos, sendo separadas da clara manualmente com recurso a papel de filtro. Com o auxílio de uma seringa esterilizada, perfurou-se a calaza e aspirou-se o volume necessário do seu conteúdo.

Após as avaliações qualitativas realizadas, referidas anteriormente, adicionámos o diluidor lentamente ao sémen, na proporção de 1:1 a uma temperatura constante.

Seguidamente efetuaram-se os cálculos para se obter a diluição final de sémen, de modo a garantir uma concentração constante em ovinos de 1×10^8 em cada palhinha. Para o sémen ser processado exigiu-se um mínimo de 60% de células vivas na contagem.

Para calcular a exata taxa de diluição foi necessário conhecer o volume, a concentração e a MIP do ejaculado, assim como estabelecer o volume e concentração desejada na dose inseminante.

Para uma dose com 1×10^8 spz móveis numa palhinha de 0,22 ml, a concentração final no sémen diluído será de 4×10^8 espermatozoides/ ml. Com essa informação calcula-se o volume do diluidor que será acrescido ao ejaculado. Por exemplo, se o ejaculado possui (ver apêndice II):

Volume: **Vi**

Concentração: **Ci**

Motilidade individual progressiva: **MIP**

1ª Diluição = **1ªD (1:1)**

Total de espermatozoides no ejaculado: **SPZt** = $V_i \times C_i \times MIP$

Concentração desejada na dose: **Cd** = 1×10^8 spz viáveis

Volume da palheta: **Vp** = 0,22ml

Número de palhinas: **Np** = $SPZt / 100 \times 1000$

Volume final: **Vf** = $N_p \times V_p$

Volume de diluidor a ser adicionado: **Vd** = $V_f - 1^aD - V_i$

	Folha cálculo: Taxa de diluição	Espécie: Ovíno Data: Página 1 de 1
---	--	--

Animal				Avaliação				Taxa de Diluição					Palhinhas realizadas	Palhinhas guardadas	Cor	Tampão	Canister
Recolha	Nº	Hora	Raça	Mobilidade massal	Mobilidade individual progressiva	Volume (mL)	Concentração (10 ⁶ spz/ml)	1ª diluição	SPZ totais	N.º de palhinhas	Volume final	Volume diluidor a adicionar					
				Mm	MIP	Vi	Cl	1ºD (1:1)	SPZl	Np	Vf	Vd					
Exemplo	PT 414 291 565	11:27	MB	4	0,8	0,45	2,78	0,45	1,0	10,0	2,20	1,30					

Tabela 9: Folha de cálculo para formulação da taxa de diluição de sémen de ovino

Nos protocolos adotados para congelação de sémen de bode foram utilizados para além do protocolo EZN, um outro com base no diluidor Bioxcell® que contém lincomicina, espectomicina, gentamicina e tilosina, lecitina de soja, glicerol, propanediol ou dimetilsulfoxide.

Após as avaliações qualitativas/quantitativas realizadas (concentração, volume, MIP, motilidade massal), procedeu-se à lavagem do sémen. O sémen de caprino para ser processado necessitou de ser submetido a uma lavagem, pois o protocolo de congelação EZN assim o indica.

A retirada do plasma seminal foi realizada imediatamente após a recolha. Para isso, o processo de lavagem do sémen baseou-se na diluição do ejaculado (solução de lavagem na proporção de 1:9) numa solução de *Krebs-Ringer*-fosfato glucose como se pode observar na tabela 10, de modo a obter uma concentração de 200 milhões de spz/ml. A solução de lavagem foi preparada no dia anterior à recolha e colocada num tubo no banho-maria (30-32°C) aquando das colheitas de sémen.

Solução Inicial	Volume da solução Inicial (ml) na solução final
Cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%	100 ml
Cloreto de potássio (KCl) a 1,15%	4,0 ml
Cloreto de cálcio (CaCl ₂) a 1,22%	3,0 ml
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄) a 2,11%	0,4 ml
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ ·7H ₂ O) a 3,82%	1,0 ml
Tampão fosfato pH 7,4*	12,0 ml
Glicose anidra (C ₆ H ₁₂ O ₆) a 5,34%	4,5 ml

Tabela 10: Solução de lavagem *Krebs-Ringer-fosfato*. (Fonte: Chemineau *et al.* (1991))

Centrifugou-se durante 10 min a 500 G, estando a solução de *Ringer* a uma temperatura de 30°C (temperatura do banho-maria). O sobrenadante foi retirado (por aspiração utilizando uma bomba de vácuo) e adicionou-se ao tubo o mesmo volume de solução de *Ringer* mantida à temperatura ambiente, realizando-se posteriormente uma 2ª centrifugação. Segundo Andrade *et al.* (1999), é necessário a retirada do plasma seminal para que não haja prejuízo na viabilidade das células espermáticas e na taxa de fertilidade nas inseminações artificiais com sémen congelado, sendo assim, o sémen deverá ser centrifugado de 500 a 600G para se obter um precipitado consistente de células espermáticas que permita a eliminação apenas do plasma seminal (Baril, 1995; Andrade *et al.*, 1999); a eliminação do plasma seminal tem como objetivo melhorar a crioconservação do sémen.

Seguidamente efetuaram-se os cálculos para se obter a diluição final de sémen, de modo a garantir uma concentração constante em caprinos 200×10^6 spz em cada palhinha. Para o sémen ser processado exigiu-se um mínimo de 60% de células vivas na contagem.

Para calcular a exata taxa de diluição foi necessário conhecer o volume do ejaculado, a concentração e a MIP do ejaculado, assim como estabelecer o volume e concentração desejada na dose inseminante.

Para uma dose com 2×10^8 spz móveis numa palhinha de 0,22 ml calcula-se o volume do diluidor que será acrescido ao ejaculado. Por exemplo, se o ejaculado possui (ver apêndice III):

Volume: **Vi**

Concentração: **Ci**

Motilidade individual progressiva: **MIP**

1ª Diluição = **1ªD (1:1)**

Total de espermatozoides no ejaculado: **SPZt** = $V_i \times C_i \times MIP$

Concentração desejada na dose: **Cd** = 2×10^8 spz viáveis

Volume da palheta: **Vp** = 0,22ml

Número de palhinas: **Np** = $SPZt / 100 \times 1000 =$

Volume final: **Vf** = $N_p \times V_p$

Volume de diluidor a ser adicionado: **Vd** = $V_f - 1^aD - V_i$

	Folha de cálculo: Taxa de diluição	Espécie: Caprinos Data: Página 1 de 1
---	---	---

Animal				Avaliação				Taxa de Diluição									
Recolha	Nº	Hora	Raça	Mobilidade massal	Mobilidade individual progressiva	Volume (mL)	Concentração (10 ⁶ spz/ml)	1ª diluição	SPZ totais	N.º de palhinhas	Volume final	Volume diluidor a adicionar	Palhinhas realizadas	Palhinhas guardadas	Cor	Tampão	Canister
				Mm	MIP	Vi	Ci	1ºD (1:1)	SPZ _i	NP	Vf	Vd					
Exemplo	PT41429 1626	10:57	SP	5	0,9	0,85	2,50	0,85	1,9	19,1	4,21	2,51					

Tabela 11: Folha de cálculo para formulação da taxa de diluição de sémen de caprino.

Para cada animal foram utilizadas palhinhas de 0,25 ml de cores diferentes. A necessidade de criar uma câmara de expansão e o espaço ocupado pelo tampão de álcool polivinílico resulta numa capacidade útil final de 0,22 ml. Para facilitar a distinção entre protocolos de congelação, optou-se por utilizar diferentes cores de tampão nas palhinhas, sendo o verde para o protocolo Ovixcell®, vermelho para o protocolo EZN e o azul para Bioxcell®. Cada palhinha foi previamente identificada com a identificação do animal, raça, proprietário, data, local e o número do centro de colheita onde se processou a dose de sémen.

As palhinhas foram cheias por pressão negativa, criando-se de seguida uma câmara de expansão, e seladas com o tampão respetivo (2mm) (Chemineau *et al.*, 1991). Seguidamente, as palhinhas foram colocadas numa caixa isotérmica pequena e colocadas na estufa a 4°C, durante 4h (refrigeração gradual). Após este período de tempo, as palhinhas foram colocadas em *racks* para a primeira etapa da congelação, onde foram submetidas a vapores de azoto líquido, a 4 cm acima do nível do líquido e mantidas durante 20 min. A congelação finalizou-se com a imersão das palhinhas no azoto, sendo de seguida transferidas para o contentor de armazenamento devidamente acondicionadas em *canisters*, utilizando visotubos.

1.2.4 Descongelação de sémen

O método de descongelação depende do processo de congelação utilizado, embora de um modo geral, quanto mais rápido for o processo de congelação mais rápido deverá ser o de descongelação. Em ovinos é mais seguro utilizar temperaturas da ordem dos 38°C porque a temperaturas superiores, 1 ou 2s de demora na remoção do banho-maria são suficientes para matar os spz (Guerin, 1990). Tradicionalmente, o sémen de caprino armazenado em palhinhas é descongelado a 37°C, durante 12 a 30s (Cabrera *et al.*, 2005; Purdy, 2006).

Após a retirada dos *canisters*, as palhinhas foram imersas em banho-maria a 37,5°C, durante 40s, secando com papel, antes de serem utilizadas. Cortaram-se as duas extremidades da palhinha e colocou-se o sémen num tubo aquecido a 37°C.

Posteriormente, colocou-se uma gota do sémen numa lâmina pré-aquecida a 37°C sobre uma platina aquecida.

Para a IA de ovinos e caprinos do CEBA foram utilizadas palhinhas dos mesmos lotes e foi igualmente efetuada a medição MIP e não a funcionalidade.

1.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, recorrendo ao SPSS (*IBM statistics* versão 22). Para comparação de frequências, utilizou-se o teste do Qui-quadrado (χ^2) (Snedecor & Cochran, 1980).

1.4 Resultados

1.4.1 Exame físico dos animais

Todos os animais usados no estudo encontravam-se em bom estado de saúde, não tendo sido detetadas quaisquer alterações no exame de estado geral nem no exame andrológico.

1.4.2 Volume e concentração

Os valores médios para os parâmetros volume e concentração encontram-se descritos na tabela 12, bem como o número de recolhas efetuadas em cada carneiro. Como podemos observar, a tabela apresenta a média do volume e concentração total do sémen de 4 carneiros reprodutores, não havendo diferenças entre as médias da concentração e do volume dos ejaculados dos animais das raças Merino Branco e Merino Preto, no total de recolhas realizadas ($n=10$; $p>0,05$).

A média de volumes dos ejaculados nas diferentes recolhas de sémen apresenta um valor médio entre 0,88 e 1,55ml que estão de acordo com Evans & Maxwell, que relatam uma variação de 0,5 a 1,5 ml de volume do ejaculado.

A concentração espermática dos ejaculados variou em média de 2,83 a 3,40x10⁹ spz/ml de sémen em ovinos coincidindo com o intervalo indicado por Evans & Maxwell (1987).

Raça	Merino Branco (MB)		MB Total	Merino Preto (MP)		MP Total	MERINO TOTAL
Nº Animal	PT214291603	PT414291565		PT017025503	PT414291546		
n (nº de recolhas)	1	4	5	2	3	5	10
Concentração (x10 ⁹)	3,40	3,23	3,26	2,83	2,83	2,83	3,05
Volume (ml)	1,50	0,89	1,01	1,08	1,67	1,43	1,22

Tabela 12: Média do volume e concentração do sémen de 4 reprodutores ovinos de raça Merino Branco e Merino Preto.

O número de recolhas efetuadas em cada bode, assim como os valores médios para os parâmetros volume e concentração, encontram-se descritos na tabela 13. Como podemos observar, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as médias da concentração e do volume dos ejaculados dos animais de raça Serpentina, no total de recolhas realizadas ($n=6$).

O volume do ejaculado dos 3 reprodutores utilizados no estudo variou entre 0,79 e 1,65 ml, coincidindo com o intervalo indicado por Evans & Maxwell (1987).

A concentração espermática dos ejaculados variou em média de 3,57 a $4,10 \times 10^9$ nos bodes, que estão de acordo com Evans & Maxwell (1987).

Raça	Bodes Serpentinicos (SP)			SP Total
Nº Animal	PT414291626	PT417546365	PT514211695	
n (nº recolhas)	2	1	3	6
Concentração ($\times 10^9$)	4,08	4,10	3,57	3,43
Volume (ml)	1,65	0,79	1,18	1,24

Tabela 13: Média do volume e concentração do sêmen de 3 reprodutores caprinos de raça Serpentina.

1.4.3 Morfologia

A avaliação morfológica das amostras de sêmen recolhidas nos 4 ovinos em estudo, não revelou uma incidência significativa de formas anormais ($<5\%$), apenas o ejaculado do carneiro PT414291565 apresentava alguns spz com gotas citoplasmáticas na cauda. Assim, todos os ejaculados foram considerados aptos para congelação.

1.4.4 Protocolos de diluição

A distribuição da motilidade individual progressiva dos spz de caprinos e ovinos antes da congelação e após descongelação, recorrendo a três protocolos de congelação de sêmen com distintos diluidores, está representada na tabela 14 e 15.

A distribuição das médias relativas à MIP após a descongelação, pelo método do qui-quadrado não apresenta diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre o protocolo utilizado nos ovinos, EZN (vs) Ovixcell®. Testados os protocolos para a mesma amostra de ejaculado.

Raça	Merino (MB e MP)	
Protocolo de congelação	EZN	Ovixcell®
n (nº de amostras)	4	6
Média de motilidade individual progressiva antes da congelação	80,0%	69,2%
Média de motilidade individual progressiva após a descongelação	63,75%	35,0%

Tabela 14: Distribuição da MIP antes da congelação e após descongelação recorrendo a protocolos de congelação de sêmen de carneiro, utilizando os diluidores EZN e Ovixcell®.

Para o protocolo com sêmen de caprino, a MIP dos spz analisados à descongelação com o diluidor Bioxcell® não diferiu estatisticamente da congelação realizada com EZN ($p > 0,05$).

Raça	Serpentina	
Protocolo de congelação	EZN	Bioxcell®
n (nº de amostras)	4	2
Média de motilidade individual progressiva antes da congelação	62,50%	70,0%
Média de motilidade individual progressiva após a descongelação	27,50%	25,0%

Tabela 15: Distribuição da MIP antes da congelação e após descongelação recorrendo a protocolos de congelação de sêmen de bode, utilizando os diluidores EZN e Bioxcell®.

1.4.5 Características do sêmen antes da congelação

A MIP foi o parâmetro de avaliação do sêmen antes da congelação. A tabela 16 descreve a média da distribuição da motilidade individual progressiva dos spz à congelação. Como podemos observar, estatisticamente não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias de MIP antes da congelação dos ejaculados dos animais das espécies ovino de raça Merino Branco e Merino Preto.

A MIP dos ejaculados de ovino antes da congelação apresentava uma média de 73,25%.

444444

Raça	Carneiros Merino Branco (MB)		Carneiros Merino Preto (MP)		MERINO Total
n (nº de amostras)	1	4	2	3	
Nº Animal	PT214291603	PT414291565	PT017025503	PT414291546	
Motilidade Individual Progressiva	70,0%	76,3%	80,0%	66,7%	73,25%

Tabela 16: Médias de MIP à congelação sêmen de 4 reprodutores ovinos de raça Merino Branco e Merino Preto.

Relativamente ao parâmetro MIP para avaliação do sémen à congelação nos bodes, a tabela 17 descreve a média da distribuição da MIP progressiva dos spz à congelação. Como podemos observar, estatisticamente não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias de MIP à congelação dos ejaculados dos reprodutores da espécie caprino de raça Serpentina. A MIP dos ejaculados de caprino antes da congelação apresenta uma média de 65,0%.

Raça	Bodes Serpentinus (SP)			SP Total
n (nº amostras)	2	2	2	
Nº Animal	PT414291626	PT417546365	PT514211695	
Motilidade Individual Progressiva	70,0%	70,0%	60,0%	65,0%

Tabela 17: Médias de MIP à congelação sémen de 3 reprodutores caprinos de raça Serpentina.

Estes valores encontram-se abaixo dos parâmetros definidos no início do estudo (MIP congelação $> 70\%$). Porém, estas alterações na parametrização dos dados não causa o insucesso do mesmo, pois na escala de motilidade individual (tabela 7), segundo Evans & Maxwell, os valores encontram-se na mesma escala, ou seja, estima-se que cerca de 20 a 40% dos spz se encontram ativos (apesar de ocorrer movimento individual, existe pouco movimento de massa).

1.4.6 Características do sémen após descongelação

A tabela 18 descreve a média da distribuição da MIP dos spz após a descongelação. As amostras foram analisadas 24h após a congelação. Estatisticamente não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias de MIP após a descongelação dos ejaculados dos animais da espécie ovino de raça Merino Branco e Merino Preto. A MIP após a descongelação mostrava uma média de 38,55%.

Raça	Merino Branco (MB)		Merino Preto (MP)		MERINO Total
n (nº amostra)	1	4	2	3	
Nº Animal	PT214291603	PT414291565	PT017025503	PT414291546	
Motilidade individual progressiva	10%	65,0%	42,5%	36,7%	38,55%

Tabela 18: Médias de MIP à descongelação sémen de 4 reprodutores ovinos de raça Merino Branco e Merino Preto.

A tabela 19 descreve a média da distribuição da motilidade progressiva dos spz à descongelação. Estatisticamente não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias de MIP à descongelação dos ejaculados dos animais da espécie caprino de raça Serpentina. A MIP após a descongelação mostrava uma média de 26,67% em caprinos.

Raça	Bodes Serpentinus (SP)			SP Total
n (nº amostra)	2	2	2	
Nº Animal	PT414291626	PT417546365	PT514211695	
Motilidade individual progressiva	15,0%	40,00%	30,00%	26,67%

Tabela 19: Médias de MIP após a descongelação de sêmen de 3 reprodutores caprinos de raça Serpentina.

Estes valores encontram-se abaixo dos parâmetros definidos no início do estudo (MIP descongelação $\geq 30\%$). Porém, estas alterações na parametrização dos dados não causam o insucesso do mesmo, pois na escala de motilidade individual (tabela 7), segundo Evans & Maxwell, os valores encontram-se na mesma escala, ou seja estima-se que cerca de 20 a 40% dos spz se encontram ativos (apesar de ocorrer movimento individual, existe pouco movimento de massa).

1.5 Discussão dos resultados

Das 12 amostras de sêmen de caprino, somente 6 estavam aptas para congelação e posteriormente utilizar em IA. As 6 restantes amostras apresentavam valores de MIP após a descongelação entre 5 a 25%, o que não correspondia aos critérios do estudo ($\geq 30\%$) e uma delas não tinha sido avaliada após a descongelação. Relativamente aos ovinos, das 40 amostras recolhidas, somente 10 se encontravam aptas para congelação e posterior utilização em IA. Nove das amostras excluídas apresentavam antes da congelação, valores de MIP $< 60\%$, valores inferiores aos parâmetros estabelecido ($\geq 60\%$); 7 apresentavam spz com morfologia anormal e MIP abaixo dos valores estipulados e das restantes 14 amostras não foram avaliadas após a descongelação.

Os resultados obtidos permitem afirmar que os animais utilizados neste estudo tinham características seminais dentro dos padrões das espécies, não se observando diferenças estatisticamente significativas entre volume, concentração e MIP independentemente do protocolo de congelação utilizado. Contudo, a MIP sofre quebras aquando da descongelação, pois os processos envolvidos na refrigeração, congelação e descongelação do sêmen provocam prejuízos à cinética dos spz, danos nas estruturas celulares e um significativo aumento da reação acrossómica.

O diluidor EZN em ambas as espécies demonstrou maior capacidade de preservação da funcionalidade dos spz congelados, com base na metodologia utilizada.

Algumas reflexões críticas, com base na metodologia utilizada deverão ser tidas em consideração como perspectiva futura.

De acordo com o descrito e com os resultados obtidos, os testes funcionais após a descongelação deveriam ser sempre realizados para efetivar a qualidade do sémen, sendo indispensável a reavaliação dos métodos de estudos atuais, que podem trazer uma melhoria significativa para a avaliação da qualidade seminal.

1.6 Conclusão

Nas condições de realização deste estudo e dentro das finalidades a que foi proposto, pode-se concluir que:

I. o protocolo EZN, que utilizou o diluidor com gema de ovo, apresentou resultados de qualidade do sémen após a descongelação que sugerem ser mais eficiente que os diluidores Bioxcell® (lecitina de soja) e Ovixcell® na criopreservação dos spz de pequenos ruminantes.

II. o diluidor EZN protege de forma mais eficiente os spz durante o processo de congelação/dcongelação, minimizando os danos bioquímicos e ultraestruturais, permitindo melhor MIP.

Como indicações futuras, os protocolos de congelação de sémen devem ser adequados para as características do sémen, sendo que se deverá realizar um estudo prévio do animal e das particularidades do seu ejaculado. É fundamental o desenvolvimento de diluidores de sémen específicos para cada espécie, e mesmo para diferentes raças da mesma espécie, de acordo com as suas limitações/características.

2. Estudo 2

2.1 Objetivo

Testagem de sémen de ovino criopreservado no CRAHA, recorrendo a dois protocolos de congelação através da fertilidade à inseminação artificial por laparoscopia.

2.2 Materiais e Métodos

O estudo foi desenvolvido no Centro de Reprodução da Herdade da Abóbada (CRAHA), inserido no Centro de Experimentação do Baixo Alentejo (CEBA), Vila Nova de São Bento, Serpa.

2.2.1 Animais

Foram utilizadas amostras de sémen congelado de 4 carneiros de raça Merino Branco e Preto, com idades compreendidas entre os 3 e 5 anos e 37 ovelhas das mesmas raças e com idades semelhantes. Todos os ovinos que integram este estudo estão envolvidos nos programas de conservação e melhoramento genético das respetivas raças.

O sémen foi congelado de acordo com a metodologia adotada no estudo 1, recorrendo ao diluidor EZN (n=12 ovelhas inseminadas) e Ovixcell® (n=25 ovelhas inseminadas).

A qualidade mínima do sémen após a descongelação foi avaliada tendo como parâmetro a MIP $\geq$ 30%.

2.2.2 Inseminação artificial

As fêmeas a ser inseminadas foram submetidas a um programa prévio de sincronização deaios, recorrendo a esponjas vaginais (*Chronogest*®) com 20 mg de acetato de fluorogestona. O progestagénio foi retirado após 11 dias, altura em que se administraram 450 UI de eCG (*Intergonan*®) a cada animal, por via intramuscular. Quarenta e oito horas após a retirada das esponjas, realizaram-se as inseminações artificiais.

No grupo de ovelhas a inseminar por laparoscopia, estas foram submetidas a um período de 12 h de jejum antes do procedimento cirúrgico.

Na inseminação intrauterina por laparoscopia, os animais foram colocados em decúbito dorsal, em mesas apropriadas, com inclinação de 45°. O campo cirúrgico, 10 a 15cm cranial à linha de inserção anterior do úbere, foi preparado (tricotomia e desinfeção com solução iodada e álcool) e feita a infiltração do local de incisão com cloridrato de lidocaína a 2% (*Anesthesin*®).

Um pneumoperitoneu artificial foi criado através de insuflação de ar filtrado na cavidade abdominal até se obter aproximadamente a pressão de 12mmHg, o que facilita o

acesso ao aparelho reprodutor. As duas incisões realizadas situaram-se aproximadamente 5 a 7cm cranialmente ao úbere e 3 a 4cm lateralmente à linha branca (Mylne *et al.*, 1997) sendo a incisão esquerda para colocação da pinça e do *pistolet* de inseminação, através da cânula do trocarter e a incisão da direita para colocação do laparoscópio ligado a uma fonte de luz fria, igualmente guiado pela cânula com trocarter.



Figura 3: Incisões para laparoscopia. Fonte: CRAHA.



Figura 4: Incisão para colocação do laparoscópio guiado pela cânula com trocarter. Fonte: CRAHA.

Os dois cornos uterinos foram fixados com pinça aplicada no ligamento intercornual e tracionados ventralmente, permitindo a escolha do local de aplicação do sémen, entre a junção útero-tubal e a bifurcação do útero. Após a observação do local, a pinça foi retirada da cânula e substituída pelo ASPIC de inseminação.

O sémen aplicado foi previamente escolhido, tendo em consideração o parâmetro de MIP antes da congelação ($\geq 60\%$ MIP). A descongelação do sémen é realizada por imersão da palhinha no banho-maria entre 35 e 37°C, durante 30s, sendo de imediato aplicada no útero, aproximadamente metade da dose em cada corno uterino. As incisões foram fechadas com agrafos *Michel* e nebulização com cloridrato de oxitetraciclina (*Engemicina*®). As ovelhas foram colocadas num local tranquilo para recuperação.

2.2.3 Diagnóstico de gestação

Para o diagnóstico de gestação de ovinos foi utilizada a técnica transabdominal, colocando-se o operador caudalmente ao animal. Lubrificou-se a sonda e a zona de contacto com gel, pois o que se pretende é o contacto sem ar entre a pele e a superfície da sonda. A zona de eleição foi a zona glabra inguinal, adjacente ao úbere. Gearhart *et al.* (1988) referem que dos dias 25 a 50 se consegue detetar corretamente o estado de gestação pela abordagem transabdominal (89,9%). O diagnóstico de gestação foi feito nas fêmeas ao dia 42 após a inseminação, por ultrassonografia transabdominal (inseminações realizadas a 22, 23 e 24 de Março de 2016).

Os machos foram introduzidos no rebanho 15 dias após as inseminações para um período de cobertura de repescagem e daí a necessidade de um diagnóstico de gestação precoce que permita diferenciar uma gestação proveniente de IA ou resultante da cobertura natural (desenvolvimento embrionário mais tardio).

2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente recorrendo ao SPSS (*IBM statistics* versão 22). Para comparação de frequências, utilizou-se o teste do Qui-quadrado (χ^2) (Snedecor & Cochran, 1980).

2.4 Resultados

2.4.1 Diagnóstico de gestação

Quarenta e dois dias após a IA, o diagnóstico de gestação foi positivo em 56,8% (n=21) das 37 ovelhas inseminadas.

2.4.2 Parições

Ao parto, a taxa de fertilidade foi de 32%, sendo o valor observado inferior à taxa de gestação diagnosticada 42 dias após a inseminação. Na totalidade pariram 12 ovelhas sendo que dessas nasceram 12 crias provenientes de IA.

A taxa de fertilidade ao diagnóstico de gestação e ao parto diminuiu significativamente (56,8% (vs) 32,4%; $p > 0,05$) o que poderá resultar de uma mortalidade embrionária.

2.4.3 Fertilidade dos machos

O número de fêmeas inseminadas, a % de diagnósticos positivos e de partos e o número de crias nascidas por cada carneiro encontram-se descritos na tabela 20. Como podemos observar, não houve diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros que definem a fertilidade dos carneiros ($p > 0,05$).

Raça	Nº Carneiro	Nº fêmeas inseminadas	Diagnóstico Gestação positivo (%)	Partos (%)	Número de crias nascidas
Merino Preto	PT017025503	11	63,6%	18,2%	3
	PT414291546	7	57,1%	28,6%	2
Merino Branco	PT214291603	8	50%	25%	2
	PT414291565	11	54,5%	36,4%	5

Tabela 20: Análise da fertilidade dos 4 reprodutores Merino através dos parâmetros: número de fêmeas inseminadas, a % de diagnósticos positivos e de partos e o número de crias nascidas por cada carneiro.

2.4.4 Protocolos de congelação

Na tabela 21, podemos observar os resultados de acordo com os dois protocolos de diluição utilizados. O protocolo EZN mostra-nos que perante os carneiros utilizados, se obteve o maior número de crias.

Raça	Nº Carneiro	Nº total de fêmeas inseminadas	Nº total de fêmeas inseminadas por protocolo de congelação	Protocolo	Número de crias nascidas
Merino Preto	PT017025503	11	1	EZN	0
			10	Ovixcell®	3
	PT414291546	7		Ovixcell®	2
Merino Branco	PT214291603	8		Ovixcell®	2
	PT414291565	11		EZN	5

Tabela 21: Análise do número de crias nascidas de acordo com os dois protocolos de diluição utilizados nos 4 machos reprodutores de raça Merina.

2.5 Discussão dos Resultados

Tendo como base o número de ovelhas paridas, a fertilidade obtida foi de 56,76%. Contudo, entre o diagnóstico de gestação e o registo efetivo dos partos, a % de fêmeas “gestantes” com proveniência na IA diminuiu significativamente 56,76% (vs) 32,4%.

A mortalidade embrionária tem sido considerada responsável por uma expressiva parcela da baixa eficácia de IA com sémen congelado. Segundo Edey (1969), numa fase inicial da gestação, o aumento da mortalidade embrionária pode ocorrer devido aos processos de refrigeração ou congelação do sémen, os quais promovem o envelhecimento dos spz que, apesar de promoverem a fertilização, causam aumento no número de mortes de embriões. Hipoteticamente é possível que à medida que se introduzem novas biomanipulações nos gâmetas masculinos, via colheita, diluição, congelação e inseminação, ou no ciclo éstrico das fêmeas, torna-se mais difícil a obtenção da fertilização e a sobrevivência embrionária.

Aos 42 dias de gestação, debitar somente à mortalidade embrionária os insucessos em termos de prenhez, obtidos na IA com sémen congelado, não é correto porque podem ocorrer outras falhas.

A morte embrionária pode estar relacionada com os tratamentos aplicados, com o manejo a que as fêmeas estiveram sujeitas (nomeadamente alimentar) ou a problemas sanitários. A questão do manejo da exploração, mais concretamente a realização da tosquia dos rebanhos poderá ter influenciado esta queda na fertilidade, pois dois a três dias após as inseminações artificiais, as ovelhas foram todas tosquiadas (o correto seria antes da estação da monta) o que influencia a implementação do embrião devido ao *stress* e, a retirada de lã

estimula o consumo de alimentos que nem sempre estão disponíveis, dada a altura do ano (Sá *et al.*, 1998).

A possibilidade de abortos após a data das ecografias é colocada pois, como as ovelhas estão em regime extensivo, pode ocorrer morte embrionária e não haver observação nem registo.

Relativamente aos diluidores utilizados, o diluidor EZN demonstrou, através do número de nascimentos (Fr EZN= 40% de crias nascidas; Fr Ovixcell®=30% de crias nascidas), uma maior eficácia na congelação e criopreservação do sémen.

O efeito do diluidor sobre a fertilidade aumenta com esta técnica de inseminação provavelmente devido ao facto de que ao depositar-se as células espermáticas próximo do local de ovulação, aumenta a hipótese de a fertilização ocorrer. Estes resultados confirmam os relatos de Eppleston *et al.* (1994) os quais afirmam que o índice de fertilidade aumenta linearmente à medida que a inseminação se processa em maior profundidade no trato genital da ovelha. Segundo Fukui & Roberts (1978), utilizando-se a laparoscopia não há diferença na fertilidade entre sémen fresco e congelado.

2.6 Conclusão

Nas condições de realização deste estudo e dentro das finalidades a que foi proposto, pode-se concluir que:

I. o diluidor EZN mostrou-se mais eficiente que o diluidor Ovixcell® na criopreservação de spz ovinos para IA por laparoscopia com sémen congelado.

3. Estudo 3

3.1 Objetivo

Testagem da fertilidade de sémen de caprino criopreservado no CRAHA, recorrendo a dois protocolos de congelação através da fertilidade à inseminação artificial por via cervical.

3.2 Materiais e Métodos

O estudo foi desenvolvido no CRAHA, inserido no Centro de Experimentação do Baixo Alentejo (CEBA), Vila Nova de São Bento, Serpa.

3.2.1 Animais

Foram utilizadas amostras de sémen congelado de 3 bodes de raça Serpentina, com idades compreendidas entre os 3 e 5 anos e 38 cabras da mesma raça e com idades semelhantes. Todos os caprinos que integram este estudo estão envolvidos nos programas de conservação e melhoramento genético das respetivas raças.

O sémen foi congelado de acordo com a metodologia adotada no estudo 1, recorrendo ao diluidor EZN (n=17 cabras inseminadas) e Bioxcell® (n=21 cabras inseminadas).

A qualidade do sémen após a descongelação foi avaliada tendo como parâmetro a MIP $\geq$ 30%.

3.2.2 Inseminação artificial

As fêmeas a inseminar foram submetidas a um programa prévio de sincronização deaios, recorrendo a esponjas vaginais (*Chronogest*®) com 20 mg de acetato de fluorogestona. O progestagénio foi retirado após 9 dias, altura em que se administraram 450 UI de eCG (*Intergonan*®) e 50µ de cloprostenol (*Estrumate*®) a cada animal, por via intramuscular. Quarenta e oito horas após a retirada das esponjas, realizaram-se as inseminações artificiais por via cervical, superficial ou profunda, acordo com a profundidade de penetração do *pistolet*.

A organização e higiene dos materiais utilizados na inseminação (soluções desinfetantes de largo espectro) e os cuidados com o animal (lubrificação dos lábios vulvares utilizando gel não espermicida na ponta do espéculo, introduzindo o espéculo vaginal, adaptando as pontas fechadas à fissura vulvar) são extremamente importantes para o sucesso das inseminações.

Em alguns animais foram realizadas IA cervicais superficiais, onde, com o auxílio do espéculo vaginal e uma fonte de luz foi localizado o cérvix, e com o *pistolet* a deposição

do sémen o mais profundo possível, não excedendo 1 ou 2cm após o início do cérvix. Nos caprinos, a inseminação cervical profunda consistiu na passagem através dos anéis cervicais até uma profundidade de 2 a 4cm no interior do cérvix. Embora o local de deposição do sémen possa influenciar a fertilidade (Corteel *et al.*, 1988), a pressão excessiva exercida sobre o *pistolet* foi um dos cuidados tidos, pois para além de causar lesão, poderá pôr em causa os resultados da inseminação.

O sémen congelado utilizado foi previamente escolhido, tendo em consideração o parâmetro de MIP antes da congelação e após a descongelação. A descongelação do sémen é realizada por imersão da palhinha no banho-maria entre 35 e 37°C, durante 30s, sendo de imediato aplicada.

3.2.3 Diagnóstico de gestação

No diagnóstico de gestação de caprinos foi utilizada a técnica transabdominal, colocando-se o operador caudalmente ao animal. Lubrificou-se a sonda e a zona de contacto com gel, pois o que se pretende é o contacto sem ar entre a pele e a superfície da sonda. A zona de eleição foi a zona glabra inguinal, adjacente ao úbere. Gearhart *et al.* (1988) referem que entre os dias 25 a 50 se consegue detetar corretamente o estado de gestação pela abordagem transabdominal (89,9%). O diagnóstico de gestação foi feito nas fêmeas ao dia 42 após a inseminação, por ultrassonografia transabdominal (inseminação realizada a 6 de Abril de 2016).

Os machos foram introduzidos no rebanho 15 dias após as inseminações, para um período de cobrição de repescagem, daí a necessidade de um diagnóstico de gestação precoce que permita diferenciar uma gestação proveniente da IA ou resultante da cobrição natural (desenvolvimento embrionário mais tardio).

3.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, recorrendo ao SPSS (*IBM statistics* versão 22). Para comparação de frequências, utilizou-se o teste do Qui-quadrado (χ^2) (Snedecor & Cochran, 1980).

3.4 Resultados

3.4.1 Diagnóstico de gestação

Quarenta e dois dias após a IA, o diagnóstico de gestação foi positivo em 39,5% (n=17) das 38 cabras inseminadas.

3.4.2 Parições

Ao parto, a taxa de fertilidade foi de 27,9%, sendo o valor observado inferior à taxa de gestação diagnosticada por ecografia aos 42 dias após a inseminação. Na totalidade, pariram 12 cabras, sendo que dessas nasceram 20 crias provenientes de IA, ou seja 1,6 cria/cabra.

A taxa de fertilidade ao diagnóstico de gestação e ao parto diminuiu significativamente (39,5% (vs) 27,9%: $p < 0,01$) o que poderá resultar de uma mortalidade embrionária.

3.4.3 Fertilidade dos machos

O número de fêmeas inseminadas, a % de diagnósticos positivos, a % de partos e o número de crias nascidas por cada bode encontram-se descritos na tabela 22. Como podemos observar, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os parâmetros que definem a fertilidade dos bodes.

Raça	Nº Bode	Nº fêmeas inseminadas	Diagnóstico Gestação positivo (%)	Partos (%)	Número de crias/cabra parida
Serpentina	PT417546365	4	25%	25%	3
	PT414291626	8	25%	12,5%	2
	PT514211695	31	45,2%	32,3%	15

Tabela 22: Análise da fertilidade dos 3 reprodutores Serpentininos através dos parâmetros: número de fêmeas inseminadas, a % de diagnósticos positivos e de partos e o número de crias nascidas por cada bode.

3.4.4 Protocolo de congelação

Na tabela 23, podemos observar os resultados correspondentes à utilização de dois protocolos de diluição distintos. O protocolo Bioxcell® mostra-nos que, perante os bodes utilizados, foi o diluidor que obteve maior número de crias.

Raça	Nº Bode	Nº fêmeas inseminadas	Nº total de fêmeas inseminadas por protocolo de congelação	Protocolo	Número de crias/cabra parida
Serpentina	PT417546365	4	4	EZN	3
	PT414291626	7	2	EZN	0
			5	Bioxcell®	2
	PT514211695	27	11	EZN	2
			16	Bioxcell®	13

Tabela 23: Análise do número de crias nascidas de acordo com os dois protocolos de diluição utilizados nos 3 machos reprodutores de raça Serpentina.

3.5 Discussão dos Resultados

Tendo como base o número de cabras paridas, a fertilidade obtida foi de 27,9%. Contudo, entre o diagnóstico de gestação e o registo efetivo dos partos, a % de fêmeas “gestantes” com proveniência na IA diminuiu significativamente 39,5% (vs.) 27,9%. Ao dia 42 após a IA, a precisão da ecografia é elevadíssima (100% ou próximo). A morte embrionária poderá ser a causa para o decréscimo na fertilidade. Em 1981, para Lunstra & Christenson, a baixa taxa de fertilidade após a inseminação cervical com sémen conservado deve-se ao tratamento com progestagénio e eCG, para a indução do cio, que acaba por promover um efeito nocivo no transporte, sobrevivência e capacidade de fertilização dos spz, assim como induz o aumento na mortalidade embrionária.

Causas infecciosas também poderiam ser um dos motivos para a quebra da fertilidade proveniente dos abortos, contudo foram realizadas análises laboratoriais aos fetos abortados e os resultados foram inconclusivos.

Segundo Vanroose *et al.* (2000), as causas não infecciosas podem ser responsáveis por cerca de 70% dos casos de perda embrionária.

As deficiências energéticas da fêmea gestante, proveniente da redução na disponibilidade ou na qualidade do alimento contribuem diretamente na incidência de abortos. Reduzindo-se a energia metabolizável da dieta para 35% da taxa de manutenção, as cabras observadas apresentavam índices de perda embrionária a rondar os 44%, frente aos 10% contabilizados para o grupo de animais a receber dieta integral (Conway *et al.*, 1996).

As deficiências nutricionais específicas, a desnutrição e subnutrição produzem efeitos negativos sobre o embrião, especialmente a severa deficiência de vitamina A e de minerais como cobre, zinco, iodo e manganês que funcionam como reguladores do metabolismo animal (Vanroose *et al.*, 2000).

Algumas plantas tóxicas levam à ocorrência de abortos ou nascimento de animais debilitados que morrem após o parto. O período de maior prevalência das intoxicações ocorre na época de queda da folha (Silva *et al.*, 2006), que, por sua vez, coincide com uma menor disponibilidade de forragem e, por conseguinte, predispõe ao consumo de uma ampla variedade de plantas tóxicas.

Independentemente do estímulo stressante (escassez de forragem, uma maior disputa por alimento, superlotação), o *stress* ambiental provoca alterações fisiológicas. O animal responde às condições adversas através do aumento da produção e secreção de cortisol, que por sua vez, altera a produção de progesterona e estradiol, resultando na reabsorção embrionária, aborto ou nascimento prematuro (Romero *et al.*, 1998).

A comparação entre a fertilidade dos machos permite concluir que o bode PT514211695 apresentou uma maior % de diagnósticos positivos (45,2%), de partos (32,3%) e do número de crias nascidas. Contudo, o número de fêmeas inseminadas com o protocolo Bioxcell® foi maior o que pode enviesar um pouco os resultados. Ao longo de todo o tempo de duração de estudo, a caracterização do sémen mostra coerência relativamente ao parâmetro MIP aquando da congelação e descongelação (MIP congelação: 60% e MIP descongelação 30%).

Relativamente aos diluidores utilizados, o diluidor Bioxcell® demonstrou, através do número de nascimentos (Fr EZN=29% de crias nascidas; Fr Bioxcell®=71% de crias nascidas), maior eficácia na congelação e criopreservação do sémen.

3.6 Conclusão

Nas condições de realização deste estudo e dentro das finalidades a que foi proposto, pode-se concluir que:

I. o diluidor Bioxcell® mostrou-se mais eficiente que o diluidor EZN na criopreservação de spz caprinos para IA com sémen congelado.

Bibliografia

ACPA, Asociación Cubana de Producción Animal – *Manual del Productor Caprino*, 2003.

Amann, R.P., Pickett, B.W. (1987). *Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa*. Equine Veterinary Science. v. 7, pp. 145-173.

ANCORME, Associação Nacional de Criadores de Ovinos de Raça Merina (2016). *Livro Genealógico da Raça*. Acedido a 17 de Setembro de 2016 em: <http://www.merina.com.pt>

Anderson, J. (1945). *The semen of animals and its use for A.I.* Edinburgh, Tech. Com. Inp. Bur. Ab. And Genetics.

Anel, L., Kaabi, B., Abroug, M., Alvarez, E., Anel, C., Boixo, F. *et al.* (2005). *Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: a field assay*. Theriogenology, 63, 1235-1247.

APCRS, Associação Portuguesa de Caprinicultores da Raça Serpentina. (2016). *Livro Genealógico da Raça*. Acedido a 22 de Outubro de 2016 em: [http:// www.cabraserpentina.pt](http://www.cabraserpentina.pt)

Artiga, C.G., Martinez, E., Perez- Fuentes, J., Vasquez, I. (1995). *Determinacion de la calidad seminal en morueco*. Ovis, 36: pp. 27-36.

Ax, R.L., Dally, M.R., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D *et al.* (2004). *Inseminação artificial*. In: Hafez, B., Hafez, E. S. E. Reprodução animal. 7ª ed Barueri: Manole, p.531.

Azevedo, D. M. M. R., Toniolli, R. (2005) *Seminal characteristics of marota bucks in the northeast of Brazil*. R. Bras. Ci. Vet., v. 12, n. 1/3, p. 127-130.

Bailey, J.L., Bilodeau, J.F., Cormier, N. (2000). *Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon*. Journal of Andrology, v.21, p.1-7.

Bettencourt, E. M.V. (1999). Caracterização de parâmetros reprodutivos nas raças ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça, 1999.126f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

Bettencourt, C. (2015). Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada (CRHA). Herdade da Abóbada.

Blendinger, K. (2007a). *Collection and evaluation of the semen in the dog*. Paper presented at the SCIVAC congress, Rimini, Italy.

Blendinger, K. (2007b). *How to organize export/import of frozen semen towards to/from countries*. Paper presented at the SCIVAC Congress, Rimini, Italy.

Bicudo, S. D. (2002). Características da Reprodução de ovinos e importância do diagnóstico de gestação. In: simpósio brasileiro de ovinocaprinocultura. Anais Botucatu: Associação Paulista dos Criadores de Ovinos, pp.88-100.

Bonadonna, T. (1937). *Le basi scientifiche e le possibilità applicative de la fecondazione artificiale negli animali domestici*, GiulioVanini (Ed)., v. I, Bescia, Italia.

Brito, M., Carolino, N., Afonso, F., Dantas, R., Espadinha, P., Vicente, A., et al. (2013). *Plano Nacional para os Recursos Genéticos Animais*. Secretaria de Estado da Alimentação e Investigação Agroalimentar. Governo de Portugal.

Buckrell, B.C., Halbert, G.W., Gartley, C.J., Bretzlaff, K.N. (1994). *Artificial Insemination of small ruminantes*. Theriogenology, New York, v.10, pp.87-91.

Buckrell, B.C., et al. (1992). *A breeding trial using a transcervical technique for artificial insemination in sheep*. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. 12. Hague, Holland.

Cabrera F, González F, Batista M, Calero P, Medrano A, Gracia A. (2005). *The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season of sperm freezabiliby of canary Buck (Capra hircus)*. Reprod Dom Anim. Pp: 191-195.

Calamari, C.V.; Ferrari, S.; Leinz, F.F.; Rodrigues, C.F.C.; Bianchini, D.; Ferreira, F., et al. (2003). *Avaliação de dois métodos de diagnóstico precoce de gestação em ovelhas: ultrasonografia transretal e detetor de prenhez para pequenos ruminantes (DPPR-80)*. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.

Castelo, T. S., Frota, T. R., Silva, A. R. (2008). *Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos*. Acta Vet. Bras., v. 2, n. 3, p. 67-75.

Carolino, N. (2015). *I Simpósio Internacional de Raças Nativas: Sustentabilidade e Propriedade Intelectual*. Teresina

Carolino, N., Horta, A., Simões. J., Afonso. F., Bettencourt. C., Matos, C., Pinto, S. (2015). *Proposta de Conservação Ex Situ de Recursos Genéticos Animais Autóctones*. Ministério da Agricultura e do Mar.

CBRA. (1998). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*, 2ª edição, Belo Horizonte, MG.

Chagas e Silva, J.N. (1992). Inseminação artificial em ovinos. Coletânea S.P.O.C.,3 (1), pp. 61-80.

Chemineau, P., Cagnié, Y., Guérin, Y., Orgeur, P., Vallet, J.C. (1991). *Training manual on artificial insemination in sheep and goats*. FAO Animal Production and Health Paper, 83. Editor: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Colas, G; Guerin, Y. (1984). *Fertility of ram semen after thawing and storage at 15°C for a few hours*. In: Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 10. University of Illinois. Abstracts, p.188.

Concannon, P. W., Battista, M. (1989). *Canine semen freezing and artificial insemination*. In: KIRK, R.W. Current Veterinary Therapy. Philadelphia: WB Saunders, pp. 1247- 1259.

Conway, M.L.T., Blackshaw, J.K., Daniel, R.C.W. (1996). *The effect of agonistic behaviour and nutritional stress on both the success of pregnancy and various plasma constituents in Angora goats*. Applied Animal Behaviour Science, v.48, pp.1-13.

Corteel, J. M., Leboeuf, B., Baril, G. (1988). *Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season*. Small Rum. Res., v.1, pp. 19- 35.

Cortés, S., Nunes, R., Vasquez, I. (1993). *Capacidad de reaccion a endosmosis del espermatozoide de macho cabrio*. In: 5º Simposio Internacional de Reprodução Animal, 5. Portugal: Comunicações livres. Pp: 224-230.

Cunha, E., Santos, L., Bueno, M., Veríssimo, C. (2004). *Produção de Ovinos para corte*. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia.

Cunningham, J. G. (2002). *Textbook of veterinary physiology* (3rd ed.). Philadelphia, Pa. W.B. Saunders Co.

Deka B.B., Rao A.R. (1987). *Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen*. Ind Vet J 64 Pp: 591–594.

Delgadillo J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P. (1991). *Decrease in the seasonality of sexual behaviour and sperm production in bucks by exposure to short photoperiod cycles*. Theriogenology 36. Pp:755-770.

Dias, A. J. (2006). *Aspectos Gerais da Reprodução de Caprinos e Ovinos*. 1ª Edição, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

Donovan, A. J.P., Hanrahan, T. Lally, M.P. Boland, G. P., Lonergan, D.J. O'Neil (2001). *Alfor sheep using frozen-thawed semen*. ARMIS 4047. Project report, under the Research Stimulus Fund; OPARDF measure 5b.

Dott, H. M., Foster, G.C. (1972). *A Technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a diferencial "live/dead" stain*. Journal of Reproduction and Fertility, 29: pp 443-445.

Duguma, G., Cloete, S.W.P., Schoeman, S.J., Jordan, G.F. (2002). *Genetic parameters of testicular measurements in Merino rams and the influence of scrotal circumference on total flock fertility*. South Africa Journal of Animal Science, 58(2): pp. 76-82.

Duran Del Campo, A. (1980). *Anatomia, fisiologia de la reproduccion e inseminacion artificial en ovinos*. Montevideo: Hemisfério Sul. Pp: 264.

Eppleston, J., Salamon, S., Moore, N. W., Evans, G. (1994). *The depth of cervical insemination and site of intra-uterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen*. Animal Reproduction Science, Amsterdam, v. 36, pp. 211-225.

Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). *Salamon's Artificial Insemination of sheep and goats*. Butterworths Pty Limited, Sydney, Australia.

Fahy, G.M. (1986). *The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology*. Cryobiology. V. 23, pp. 1-13.

FAO. (1987). *Tecnología de la Producción Caprina*. Oficina Regional de la FAO para la América Latina y el Caribe Santiago, Chile.

FAO, (2007). *Plano de Ação Mundial para os Recursos Genéticos Animais e Declaração de Interlaken*. Conferência Técnica Internacional sobre Recursos Genéticos Animais para a Alimentação e a Agricultura Interlaken. Embrapa. Suíça.

Farstad, W. (2008). *Cryopreservation of canine semen - new challenges*. Paper presented at the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biennial EVSSAR Congress, Vienna, Austria.

Feldman, E. C., Nelson, R. W. (2004). *Canine and feline endocrinology and reproduction (3rd ed.)*. St. Louis, Mo.Saunders.

Fialho, J. (1995). *A Cabra Serpentina - Origem, Efectivos, Registo Zootécnico, Características Genéticas, Morfológicas e Produtivas*. Centro de Experimentação do Baixo Alentejo. Herdade da Abóbada, Portugal.

Findlater, R.C.F. *et al.* (1991). Evaluation of intrauterine insemination of sheep with frozen semen: effects of time of insemination and semen dose on conception rates. Animal Production. v. 53, pp. 89-96.

Fonseca, J. F. *et al.* (2005). *The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa*. Animal Reproduction, v.2, n2, pp. 139-144.

- Fonseca, J.F., Simplício, A.A. (2008). *Inseminação artificial e transferência de embriões em ovinos e caprinos*. In: Encontro Internacional da Pecuária Amazônia- AMAZONPEC. I. Anais, Belém, Pará.
- Forcada, F., Abecia, J.A. (2000). *Control de la actividade reproductiva del ovino*. Mundo Ganadero, p. 122.
- Freitas, V.J.F., Simplício, A.A. (1999). *Diagnóstico de prenhez em caprinos: Uma revisão*. Ciência animal.
- Freitas, V.J.F., Simplício, A.A. (2001). *Diagnóstico de prenhez em caprinos*. In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 1ª Ed. Livraria Varela.
- Freshman, J. L. (2002). *Semen collection and evaluation*. Clin Tech Small Anim Pract, 17(3), 104-107.
- Fukui, Y., Roberts, E.M. (1978). *Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe*. Theriogenology, v.10, n.5, p.381-386
- Ghalsasi, P.M., Nimbkar, C. (1996). *Evaluation of laparoscopic intrauterine insemination in ewes*. Small Ruminant Research. v. 23, p. 69-73.
- Gibbons, A. (2002). *Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora*. Revista Taurus, v. 4, n. 16, p. 24-32.
- Granados, L.B.C. (2006). *Aspectos Gerais da Reprodução de Caprinos e Ovinos*. Capacitação dos técnicos e produtores do Norte e Noroeste Fluminense em Reprodução de Caprinos e Ovinos. 1ª Edição, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.
- Guerin, Y. (1990). *Méthodes de conservation de la semence ovine*. Élevage & Insemination, 236: pp. 3-14.
- Hafez, E.S.E. (1993). *Artificial insemination*. In: Reproduction in Farm Animals, 6th edition. Editor: E.S.E Hafez. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 424-439.

Hauser, R., Yavetz, G., Paz, G.F., Homonnai, T., Amit, A., Lessing, J.B., Peyser, M.R., Yogev, L. (1992). *The predictive fertilization value of the hypoosmotic swelling test (HOST) for fresh and cryopreserved sperm*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 9 (3):pp. 265-270.

Henderson, D.C., Robinson, J.J. (2000). The reproductive cycle and its manipulation. In: Martin WB, Aitken ID. Diseases of Sheep. 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Hollinshead, F.K. *et al.* (2002). *Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome bearing spermatozoa*. Reproduction of Fertility Development. v.14, pp. 503-508.

Holt, W.V., Van Look, K.J.W. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. Reproduction, v. 127, pp.527-535.

Iguer-ouada, M., Verstegen, J. P. (2001). *Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders*. Theriogenology, pp. 671- 684, 2001.

Jainudeen, M. R., Wahid, H., Hafez, E.S.E. (2000). *Ovulation induction, embryo production and transfer*. In: Reproduction in Farm Animals, 7th edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, pp. 405-430.

Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D. (1984). *Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics*. Journal of Reproduction & Fertility, 70: pp. 219-228.

Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V., Olson, P. S. (2001). *Canine and feline theriogenology (1st ed.)*. Philadelphia, PA: Saunders.

Keisler, D.H., Buckrell. B.C. (1997). *Breeding strategies*. In: Current therapy in large animal theriogenology, 1st edition. Editor: Robert S. Youngquist, Philadelphia, USA, pp. 603-611.

- Kershaw, C.M., Khalid, M., McGowan, M.R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G. *et al.* (2005). *The anatomy of the sheep cervix and its influence of the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen.* Theriogenology, New York, v. 64, pp.1225-1235.
- Killeen, I.D., Caffery, G.J. (1982). *Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope.* Australian Veterinary Journal. v. 59, p. 95.
- King, M.E., McKelvey, W.A.C., Dingwall, W.S., Matthews K.P., Gebbie, F.E., Mylne, M.J.A. *et al.* (2004). *Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen-thawed semen with or without oxytocin administration.* Theriogenology, 62, pp. 1236-1244.
- Kutzler, M. A. (2005). *Semen collection in the dog.* Theriogenology, pp. 747-754.
- Kimberling, C.V., Marsh, D.J (1997). *Breeding soundness evaluation and surgical sterilization of the ram.* In: Current therapy in large animal theriogenology, 1st edition. Editor: Robert S. Youngquist, Philadelphia, USA, pp. 575-584.
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. (2000). *Production and storage of goat semen for artificial insemination.* Anim. Reprod. Sci., v. 62, pp. 113-141.
- Lima, A.J. (2000). *Coleta, Conservação de semen e inseminação artificial de caprinos e ovinos.* PEQ.
- Lopez, J.G. (1991). *Actividad sexual del morueco, produccion de semen e inseminacion artificial.* Coletânea da S.P.O.C., 2 (1): pp.79-98.
- Lopez- Brea, J.J.G., Aguado, M.I., Perez, S., Garrido, D., Vazquez, I. (1995). *Tecnologia para la conservacion del semen de morueco.* Ovis, 36: pp. 37-47.
- Lunstra, D.D., Christenson, R.K. (1981). *Fertilization and embryonic survival in ewes synchronized with exogenous hormones during anestrus and oestrus season.* Journal of Animal Science, v.53, n.2, pp. 458-465.

Luz, S.L.N., Neves, J.P., Gonçalves, P.B.D. (2000). *Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica*. Brazilian Journal of Veterinary Research on Animal Science. v. 37, pp.10-18.

Maia, M. (2010). *Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos*. Revisto por Maria de Fátima Pinto Barreto. Natal: EMPARN.

Mann, T. (1954). *The biochemistry of semen*. London, Methuen.

Martinez, A. I. (2004). *Canine fresh and cryopreserved semen evaluation*. Anim Reprod Sci, pp.82-83, 209-224.

Matos, C.A.P., Thomas, D.L (1992). *Physiology and genetics of testicular size in sheep: a review*. Livestock Production Science, 32 (1):pp. 1-30.

Mazur, P. (1984). *Freezing of living cells: mechanisms and implications*. Am. J. Physiol. Cell. Physiol., v. 247, pp. 125-142.

Mazur, P. (2007). *Freezing of living cells: mechanisms and implications*. Am. J. Physiol. Cell. Physiol., v. 247, pp. 125-142.

Kozdrowski, R., Dubiel, A., Bielas, W., Dzielciol, M. (2007). *Two Protocols of Cryopreservation of Goat Semen with the Use of Computer-Assisted Semen Analysis System*. Acta Vet. Brno, 76: pp. 601-604.

Mies, F., (1987). *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 6 ed. Porto Alegre: Editora Sulina, v. 2, p. 475.

Monteiro, J. C., Goncalves, J. S., Rodrigues, J. A., Lucio, C. F., Silva, L. C., Assunção, M. E. (2009). *Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen*. Reprod Domest Anim, 44 Suppl 2, pp. 359-362.

Moraes, J.C.F. (2002) *O Emprego da Inseminação artificial nas ovelhas*. Bagé: Embrapa Pecuária Sul.

Moraes, J.C.F., Souza, C.J.H., Gonçalves, P.B.D. (2002). *Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos*. In: Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Livraria Varela, p. 340.

Moses, D., A.G., Martinez, G., Iorio, A., Valcárcel, A., Ham, H., Pessi, R., *et al.* (1997). *A large-scale program in laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed semen in Australian Merino sheep in Argentine Patagonia*, Theriogenology, 48, pp. 651-657.

Mylne, M.J.A., Hunton, J.R., Buckrell, B.C. (1997). Artificial insemination of sheep. In: Current therapy in large animal theriogenology, 1st edition. Editor: Robert S. Youngquist, Philadelphia, USA, Pp. 575-584.

Nelson, E.A., Lin, T. Y. (1983). *Collecting, evaluation, processing and storage of goat and sheep semen*. In: Reproduction and Genetics, presented by International Sheep and Goat Institut, UTAH, USA. Pp. 229-252.

Neves, J. P., Nunes, J. F., Moraes, J. C. F., Souza, C. J. H., Salgueiro, C. C. M., Almeida, J. L. (2008). *Inseminação artificial em pequenos ruminantes*. In: Gonçalves, P. B. D., Figueiredo, J. R., Freitas, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2^a ed. São Paulo: Ed. Roca. P. 395.

Nunes, J. F., Corteel, J. M., Combarous, Y., Baril, G. (1982). *Rôle du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoïes de bouc*. Reprod. Nutr. Dév., v. 22, pp. 611-620.

Nunes, J. F. (2002). *Inseminação artificial em caprinos*. In: Gonçalves, P. B. D., Figueiredo, J. R., Freitas, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Livraria Varela, pp. 340.

O'Callaghan, D. (1994). *Physiology of seasonality in sheep: role of photoperiod and melatonin*. Proceedings of the First European Conference on Progress in embryo technology and genetic engineering in cattle and sheep breeding. Krakow. Pp. 35-43.

Parkinson, T.J. (2001). *Fertility and infertility in male animals*. In: Artur's Veterinary Reproduction & Obstetrics, 8th edition. Editores: D.E. Noakres, T. J. Parkinson, G.C.W. England, London, WB Saunders Company Limited, pp. 695-750.

Parks, J.E., Graham, J.K. (1992). *Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes*. Theriogenology, 38: pp. 209-222.

Perkins, N.R., Hill, J.R., Pedrana, R.G. (1996). *Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronised Merino ewes*. Theriogenology, 46, pp. 541-545.

Purdy, P.H. (2006). *A review on goat sperm cryopreservation*. Small Rumin Res, 63. Pp. 215–225.

Quinn, P.J., Chow, P.Y.W., White, I.G (1980). *Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site*. Journal of Reproduction and Fertility, 60: pp. 403- 407.

Ribeiro, A.C., *et al.* (1996). *Análise do comprimento de gestação em cabras Saanen*. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 33, Anais.

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., Kruif, A. (2005). *New techniques for the assessment of canine semen quality: a review*. Theriogenology, pp. 64(3), 706-719.

Romero, C.M., Lòpez, G., Luna, M. (1998). *Abortion in goats associated with increased maternal cortisol*. Small Ruminant Research, v.30, pp.7-12.

Root Kustritz, M. V. (2007). *The value of canine semen evaluation for practitioners*. Theriogenology, pp. 68(3), 329-337.

Roy, A. (1957). *Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat*. Nature, n. 179, pp.318–319.

Royere, D., Barthelemy, C., Hamamah, S. (1996). *Cryopreservation of spermatozoa: a review*. Human Reproduction Update, v. 2, pp. 553-559.

Sá, C. O. *et al.* (1998). *Estudo do efeito macho na concentração dos partos de ovelhas e borregas expostas à monta no anestro sazonal*. Anais da XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. FMVZ - UNESP. Botucatu - SP, v.3, pp. 163-165.

Salamon, S., Maxwell W.M.C. (1995). *Frozen storage of ram semen*. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination, *Animal Reproduction Science*, 37, pp. 185-249.

Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (2000). *Storage of ram semen*. *Animal Reproduction Science*, 62, pp. 77-111.

Santos, A. (2001). *Características reprodutivas e congelabilidade do sêmen de reprodutores das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo de fotoperíodo*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 73. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

Schafer-Somi, S., Aurich, C. (2007). *Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution*. *Anim Reprod Sci*, pp.102 (1-2), 1-13.

Shahiduzzaman, A. K., Linde-Forsberg, C. (2007). *Induced immotility during long-term storage at +5 degrees C does not prolong survival of dog spermatozoa*. *Theriogenology*, pp. 68(6), 920-933.

Sharkey, S., Callan, R.J., Mortimer, R., Kimberling, C. (2001). *Reproductive techniques in sheep*. *Veterinary Clinics of North America: food animal practice*, 17 (2): pp. 435-455.

Silva, D.M., Riet-Correa, F., Medeiros, R.M.T. *et al.* (2006). *Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, n.4, pp.223-236.

Snedecor, G.W., Cochran, W.G. (1980). *Statistical methods*. 7ª Edição, Ilowa State University Press, Ames, IA, EUA, pp. 185.

Sousa, J. P. F., Barbas, J. P., Ferreira, G. M. B. C., Horta, A. E. M. (2001). *Variação anual das características seminais em bodes da raça Serrana*. *Rev. Port. Zootec.*, pp. 297- 311.

Sousa, B.P.A., Andrade, J. C.O., Wischral, A., Guerra, M.M.P. (2010). *Viabilidade in vitro de células espermáticas ovinas submetidas a diferentes diluentes e a refrigeração*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 3, pp. 528 – 535.

Stefanov, R., E., Krumova, M., Dolashka, W., Voelter, Z., Zachariev (2006). Artificial insemination of sheep and cow with semen treated by Cu/Zn-superoxide dismutase from fungal *Humicola lutea* 103, *World Journal of Zoology*, 1 (1), 36-39.

Stilwell, G. (2013). *Clínica de Bovinos*. Publicações Ciência & Vida, Lisboa.

Szabados, T. (2006). *A cervikouterinális inszeminálás eredményességének vizsgálata juhászatokban /Study of effectiveness in cervico-uterinal insemination of ewes*. PhD thesis, University of Western Hungary, Faculty of Agriculture and Food Sciences, Mosonmagyaróvár, Hungary.

Thwaites, C.J. (1995). *The comparative effects of undernutrition, exercise and frequency of ejaculation on the size and toe of the testes and on semen quality in the ram*. *Animal Reproduction Science*, 37: pp. 299-309.

Tuli, R. K, Schmidt-Baulain, R., Holtz, W. (1991). *Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats*. *Anim Reprod Sci* 1991;25: pp.125-131.

Vanroose, G., Kruif, A., Soom, A. (2000). *Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions*. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, pp.131-143.

Verstegen, J. P., Onclin, K., Iguer-Ouada, M. (2005). *Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies*. *Theriogenology*, pp. 64(3), pp. 720-733.

Vianna, F.P.; Papa, F.O.; Zahn, F.S.; Melo, C.M.; Dell'Aqua JR, J.A. (2009). *Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen*. *Animal Reproduction Science*, v. 113, pp. 279 – 282.

Watson, P.F. (1995). *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function*. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, pp. 871-891.

Watson, P.F, Martin, I.C. (2000). *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-1, pp. 481- 492.

Yamaki, K., Morisawa, M., Ribadulla, A., Kojima, J. (2003). *Sheep semen characteristics and artificial insemination by laparoscopy*. Tohoku Journal of Agricultural Research, 54 (1-2), pp. 17-26.

Apêndices

Apêndice I - Guia de Procedimentos e Boas Práticas



REPÚBLICA
PORTUGUESA

AGRICULTURA, FLORESTAS
E DESENVOLVIMENTO RURAL
MAR



MANUAL DE PROCEDIMENTOS E BOAS PRÁTICAS CENTRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA HERDADE DA ABÓBADA

Doutor Carlos Manuel Varela Bettencourt

Ana Beatriz Dinis Rogério Lopes Carvalho

Setembro 2016



REPÚBLICA
PORTUGUESA

AGRICULTURA, FLORESTAS
E DESENVOLVIMENTO RURAL

MAR



MANUAL DE PROCEDIMENTOS E BOAS PRÁTICAS
CENTRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA HERDADE DA ABÓBADA

Doutor Carlos Manuel Varela Bettencourt
Ana Beatriz Dinis Rogério Lopes Carvalho

Setembro 2016

PREFÁCIO

O objectivo deste documento é apresentar aos colaboradores, professores e alunos, usuários do Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada (CRAHA) os princípios e conceitos básicos da biossegurança, visando minimizar os riscos, maximizar a eficiência no uso dos laboratórios, evitar acidentes durante a utilização de equipamentos, materiais e reagentes, evitar o risco de más práticas que culminarão no insucesso dos procedimentos, neste caso específico uma criopreservação de qualidade deficitária.

ÍNDICE

1	CENTRO DE COLHEITA DE SÉMEN DA HERDADE DA ABÓBADA (CCSHA)	5
1.1	CONDIÇÕES GERAIS DE FUNCIONAMENTO DO CCSHA	5
1.1.1	SISTEMA DE REGISTOS	6
1.2	PRODECIMENTOS E BOAS PRÁTICAS NA QUARENTENA	6
1.3	PROCEDIMENTOS E BOAS PRÁTICAS NA ADMISSÃO DE ANIMAIS E NA PRODUÇÃO DO SÉMEN	7
1.4	PROCEDIMENTOS E BOAS PRÁTICAS NA RECOLHA E AVALIAÇÃO DE SÉMEN	8
1.4.1	SALA DE COLHEITA DE SÉMEN	8
1.4.2	LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE SÉMEN	9
1.5	PROCEDIMENTOS E BOAS PRÁTICAS NO ARMAZENAMENTO DO SÉMEN	10
1.5.1	SALA DE ARMAZENAMENTO DE PRODUTOS GERMINAIS	10
1.5.2	SALA NÚCLEO DO BANCO PORTUGUÊS DE GERMOPLASMA (BPGA)	11
1.5.3	EXPEDIÇÃO DO SÉMEN REFRIGERADO/ CONGELADO	11
1.6	PROCEDIMENTOS E BOAS PRÁTICAS DE HIGIENE PESSOAL, EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	11
1.6.1	HIGIENE PESSOAL	11
1.6.2	HIGIENE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	12
1.6.2.1	PROCEDIMENTOS DE LAVAGEM	12
1.6.2.2	PROCEDIMENTOS DE PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE DETERGENTE E DESINFECTANTE	13
1.6.2.2.1	PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO <i>TEEPOL</i>	13
1.6.2.2.2	PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO <i>D10</i>	13
1.6.3	DESINFECÇÃO QUÍMICA OU DESCONTAMINAÇÃO	14
1.6.3.1	DESINFECÇÃO E ESTERILIZAÇÃO POR CALOR	15
1.6.3.1.1	ESTERILIZAÇÃO EM AUTOCLAVE	15
1.6.3.1.2	ESTERILIZAÇÃO EM ESTUFA	16
2	ANEXOS	17
2.1	PLANTA DO CENTRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA HERDADE DA ABÓBODA	17
2.2	FORMULÁRIOS	18
2.2.1	FICHA INDIVIDUAL DO ANIMAL	18
2.2.2	REGISTO DE RECOLHA DE SÉMEN	20

2.2.3	REGISTO CONTENTORES	22
2.2.4	CONTROLO DE TEMPERAATURA DOS EQUIPAMENTOS	23
2.3	PROCEDIMENTOS.....	24
2.3.1	PROTOCOLOS DE RECOLHA E PROCESSAMENTO DE SÉMEN	24
2.3.1.1	OVINOS	24
2.3.1.2	CAPRINOS	29
2.4	PROTOCOLOS DE PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DESINFECTANTES.....	34

MANUAL DE PROCEDIMENTOS E BOAS PRÁTICAS

1 CENTRO DE COLHEITA DE SÉMEN DA HERDADE DA ABÓBADA (CCSHA)

As instalações principais que integram esta unidade encontram-se delimitadas por uma rede de malha de arame de 1,50m de altura, implementadas a uma distância superior a 5 metros do espaço exterior ao CCSHA constituindo uma barreira sanitária eficaz. As instalações edificadas estão construídas de forma a assegurar os isolamentos térmicos necessários e a permitir a sua fácil limpeza, desinfecção e desinsectização (planta em anexo). O CCSHA dispõe de parques para alojamento de animais, equipados com bebedouros e comedouros; instalações de quarentena/isolamento e retenção distante do CCSHA que constituem um filtro sanitário próprio para animais que provêm de outras explorações; sala de colheita de sémen, laboratório de tecnologia de sémen; sala de contentores de produtos germinais; sala com contentores de azoto que constitui um Pólo do Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA); sala de recolha, sala para o processamento e criopreservação de embriões (em fase de licenciamento); sala de lavagem e esterilização de material; gabinete de auxiliares, gabinete de técnicos, vestiário; instalações de armazenamento de alimentos (concentrados, palha e fenos) especificamente destinados a animais do centro; parque de enfermaria e recuperação de animais.

1.1 CONDIÇÕES GERAIS DE FUNCIONAMENTO DO CCSHA

O Centro de colheita de sémen deve assegurar as seguintes condições:

- Acesso restrito a pessoas afetas ao centro;
- A entrada no centro por parte do pessoal autorizado é realizada pela porta principal dirigindo-se de seguida ao vestiário, devendo respeitar todos os procedimentos de higiene;
- Utilização de indumentária e calçado específico para a sala de colheita e para a sala de processamento de sémen;
- Os tratadores de animais terão de usar vestuário e calçado apropriado para o trabalho e uso exclusivo no centro;

- Os tratadores de animais e o pessoal que efectuará as colheitas terão acesso específico ao centro por uma porta secundária;
- Registo de visitantes autorizados pelo médico veterinário responsável do centro que devem utilizar vestuário e calçados protectores;
- Mecanismo para assegurar que os visitantes autorizados observam as condições estabelecidas através da colocação de sinais de aviso colocados em locais do centro onde assim se justifique;
- Após a saída de cada grupo de animais ou quando termina um ciclo de produção, os parques e o material de produção (comedouros, bebedouros) devem ser limpos e desinfectados, bem como assegurado um vazio sanitário;
- Deve ainda ser estabelecido e mantido um plano de controlo de pragas e de outros invasores;
- Recolha de cadáveres assegurada pelo SIRCA (Sistema de Recolha de Cadáveres de Animais Mortos na Exploração);
- Animais com patologia serão colocados numa zona de tratamento;
- Todas as operações do centro são realizadas de forma contínua, sem retornos, de forma a evitar contaminações.

1.1.1 SISTEMA DE REGISTOS

Os registos serão processados informaticamente numa base de dados adequada às actividades realizadas.

Os cadernos de laboratório são utilizados para registo permanente do trabalho de laboratório, associado a cada experiência que está a ser executada.

1.2 PRODECIDMENTOS E BOAS PRÁTICAS NA QUARENTENA

As instalações que constituem o Centro de Quarentena (CQ) estão fisicamente separadas das restantes zonas em que coabitam outras espécies pecuárias de forma a garantir a prevenção do contágio por agentes patogénicos. Estão delimitadas por uma rede de malha de arame de 1,50m de altura, a mais de 5 metros do espaço exterior ao CQ, constituindo uma barreira sanitária eficaz. As áreas destinadas ao efeito são

construídas com materiais de fácil lavagem e desinfecção. Os parques possuem uma zona coberta, comedouros e bebedouros apropriados. Os animais a admitir ao CQ devem obedecer aos seguintes requisitos:

- Provir de explorações isentas de doenças de declaração obrigatória durante os últimos seis meses;
- Não terem estado em serviço por monta natural nos 30 dias que antecedem a admissão ao CQ;
- Registrado à entrada no CQ dados referentes à identificação do reprodutor, da exploração de origem, testes realizados e respectivos resultados e tratamentos e vacinações efectuadas; (modelo em anexo)
- Período de quarentena de 30 dias;
- Alimentação disponível com base em feno, cereais e alimento concentrado;
- Água potável disponível;
- Rastreio sanitário de: *Border disease*, Paratuberculose, Brucelose (*B. ovis*, *B. melitensis*) - 2 testes consecutivos negativos com intervalo de 30 dias à entrada e saída do CQ com igual saneamento de machos e fêmeas utilizadas para as colheitas.
- Registo de existências e deslocação de Ovinos e Caprinos (REDOC) conforme previsto na lei.

“Sistema tudo dentro, tudo fora!”

1.3 PROCEDIMENTOS E BOAS PRÁTICAS NA ADMISSÃO DE ANIMAIS E NA PRODUÇÃO DO SÉMEN

Os animais integram o CCSHA procedentes do CQ após o cumprimento dos requisitos descritos em 1.2. Deverão ser preenchidas fichas individuais de cada animal que integre o CCSHA em que deverão constar os seguintes registos:

- Número de identificação (SIA e LG), raça, idade, genealogia, origem (criador e marca de exploração), mérito genético para características de interesse no programa de melhoramento da raça e objectivo de produção de sémen. Cada ficha deverá ser autenticada pelo responsável do CCS;
- Datas referentes ao período de quarentena e resultados de testes realizados;

- Relatório de avaliação clínica;
- Programa alimentar e profiláctico;
- O director do centro aprovará a transição dos animais da quarentena para o CCSHA.

Durante o período de adaptação, os machos são treinados na sala de colheitas, para servirem na vagina artificial como manequim vivo, com utilização preferencialmente de fêmeas em cio natural ou induzido. Ainda durante este período deve realizar-se a avaliação andrológica e comportamental dos machos com elaboração de um relatório detalhado sobre a sua capacidade funcional.

As condições ambientais deverão ser constantes, promovendo o bem-estar dos animais e consequentemente uma boa produção de sémen. Entende-se que as condições ambientais são constantes quando:

- Temperatura, ventilação, níveis de amoníaco no ar, humidade relativa e intensidade da iluminação mantêm amplitudes reduzidas e estão de acordo com os valores de referência para ovinos e caprinos;
- O espaço mantém-se limpo e desinfectado, utilizando apenas produtos autorizados e respeitando sempre as diluições indicadas nos rótulos.
- Os parques e zonas comuns do estábulo, comedouros e bebedouros são regularmente limpos.
- Garantir a disponibilização de alimento de qualidade e água
- Prática de um maneio que não cause *stress* aos animais, evitando ruídos e barulhos que possam afectar o seu bem-estar.

1.4 PROCEDIMENTOS E BOAS PRÁTICAS NA RECOLHA E AVALIAÇÃO DE SÉMEN

1.4.1 SALA DE COLHEITA DE SÉMEN

- A recepção do macho dador processa-se através da porta 1, proveniente do parque de espera e a saída pela porta 2 após recolha de sémen;
- O piso da sala de colheita é de material antiderrapante, lavável e não abrasivo;
- Possui um tronco de contenção para um manequim vivo residente no CCSHA;
- A recolha de sémen de carneiro deverá ser efetuada em dias distintos da de bode;

- Antecedendo e no final de cada sessão de recolhas deverá proceder-se à limpeza do terço posterior e zona genital e períneo do manequim, bem como uma higienização da zona genital do macho dador;
- O operador deverá usar luvas descartáveis para cada recolha e evitar o contacto direto com o pénis do macho dador;
- A vagina artificial aquecida utilizada na recolha deve estar seca e desinfetada; Após cada recolha será desmontada, lavada, enxaguada, desinfetada e seca, (*vide* produtos e protocolos de lavagem e esterilização);
- O lubrificante a utilizar na recolha deverá ser estéril e não espermicida. Assegurar a não contaminação com poeiras, dejetos animais e outros contaminantes;
- Após a recolha deverá ser evitada a agitação da vagina de forma a minimizar o risco de contaminação do ejaculado recolhido com restos de lubrificantes ou detritos;
- As vaginas artificiais não podem ser reutilizadas nem mesmo para o mesmo animal sem previamente serem lavadas e desinfetadas.
- Os tubos de recolha esterilizados e selados (*vide* protocolos de lavagem e esterilização). Até serem utilizados deverão estar a 37°C,
- Após a recolha de sémen, os tubos deverão ser fechados com tampa e transferidos através da janela de comunicação basculante existente entre a sala de recolha e o laboratório de avaliação;
- O desmontar das várias componentes da vagina artificial e o seu enxaguamento é feito nas tinas de lavagem existentes na sala de recolha.

1.4.2 LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE SÉMEN

- O laboratório de sémen está fisicamente isolado da sala de recolha e das restantes zonas sujas e inclui zonas de trabalho distintas para avaliação de sémen, processamento, pré-armazenamento ou preparação da expedição.
- O pessoal de laboratório deverá ter formação técnica especializada, ser competente e cumpridor de padrões elevados de higiene pessoal, de forma a minorar os riscos de contaminação dos ejaculados durante a fase de avaliação, processamento e armazenamento das doses.

- A limpeza e desinfecção de superfícies, materiais e equipamentos são feitas numa base regular e no final de cada dia de trabalho.
- O sémen é processado de acordo com os protocolos que constam em anexo e é expedido ou posteriormente armazenado em contentores de sémen localizados na Sala de Armazenamento de Produtos Germinais ou passa a integrar o Núcleo do Banco Português de Germoplasma Animal.
- O programa de controlo de qualidade inclui procedimentos para determinação do número de espermatozóides por dose, documentação dos valores pós-descongelação e desenvolvimento de procedimentos para treino e avaliação de competência.

1.5 PROCEDIMENTOS E BOAS PRÁTICAS NO ARMAZENAMENTO DO SÉMEN

1.5.1 SALA DE ARMAZENAMENTO DE PRODUTOS GERMINAIS

- A sala de armazenamento é construída com materiais facilmente laváveis, e está dotada de exaustores de tecto que asseguram uma ventilação adequada.
- Os produtos germinais (sémen e embriões) a armazenar deverão ser da espécie bovina, ovina e caprina e proceder de recolhas realizadas no CCSHA.
- O sémen é armazenado em contentores de azoto de volume variável (20, 40 e 50 litros) identificados por espécie animal (ovinos, bovinos, e caprinos).
- A sala possui identificação das zonas de colocação dos recipientes por espécie e por produto germinal (sémen/ embriões).
- O registo dos produtos germinais armazenado em cada contentor é mantido atualizado para cada contentor assim como datas de entradas e saídas de material e o seu destino.
- O abastecimento dos contentores de armazenagem com azoto é feito através de contentores de transporte.
- Todos os contentores, quer os de armazenamento quer os de transporte, são limpos e desinfetados antes de entrar no centro.
- O pessoal afecto ao manuseamento dos recipientes deverá possuir a indumentária adequada (bata, calçado apropriado, óculos de proteção, luvas).

- A medição dos níveis de azoto em cada contentor deve ser controlada com periodicidade semanal através da utilização de uma régua graduada para o efeito sendo registado a data, o nível, a data do reabastecimento e o nome do técnico responsável pela verificação.
- A régua de medição dos níveis de azoto deve ser desinfectada sempre que utilizada em contentores com sémen de animais de estatuto sanitário inferior.

1.5.2 SALA NÚCLEO DO BANCO PORTUGUÊS DE GERMOPLASMA (BPGA)

A sala de armazenagem do núcleo do BPGA deverá obedecer às mesmas condições que constam para a Sala de APG. No entanto poderá armazenar produtos germinais com estatuto sanitário inferior ao exigido para a sala de APG de acordo com as normas que constam no Regulamento do Banco Português de Germoplasma Animal.

1.5.3 EXPEDIÇÃO DO SÉMEN REFRIGERADO/ CONGELADO

O sémen destina-se a associações de criadores de raças autóctones parceiros do CRHA.

1.6 PROCEDIMENTOS E BOAS PRÁTICAS DE HIGIENE PESSOAL, EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

1.6.1 HIGIENE PESSOAL

- Sempre que possível, devem utilizar-se luvas apropriadas para manipular materiais apresentando riscos biológicos;
- Lavar as mãos regularmente e corretamente antes e depois de sair do laboratório;
- Lavar bem as mãos com água e sabão e em situações de risco com sabões germicidas;
- Higienização das mãos com produtos à base de álcool no caso de sujidade ligeira.

1.6.2 HIGIENE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Todas as operações de lavagem e desinfecção de material são realizadas de forma contínua, sem retornos, de forma a evitar contaminações cruzadas. A sala de lavagem está desenhada de forma a assegurar um fluxo de materiais de acordo com o grau de limpeza desde a lavagem inicial até ao completar do processo de esterilização e armazenagem dos objetos esterilizados. Todo o material de recolha e processamento de sémen será lavado e esterilizado em sala.

Para garantir um nível eficaz de desinfecção e esterilização do laboratório é importante conhecer os princípios básicos associados a estas ações e compreender os fundamentos da limpeza antes da desinfecção (limpeza prévia). A limpeza precede a desinfecção e consiste em remover o lixo, a matéria orgânica e as manchas, lavar e esfregar com água contendo sabão ou detergente e enxaguar. Muitos produtos germicidas só são activos em materiais previamente limpos. A limpeza prévia deve ser realizada com cuidado para evitar exposição a agentes patogénicos. Devem utilizar-se produtos quimicamente compatíveis com os germicidas a aplicar mais tarde. É vulgar utilizar o mesmo germicida químico para limpeza prévia e desinfecção.

1.6.2.1 PROCEDIMENTOS DE LAVAGEM

O procedimento de lavagem do material não descartável do CCSHA deverá ser adotado para todo o material não descartável utilizado no CCSHA incluindo:

- Materiais de vidro: Tubos, pipetas, lâminas, placas, frascos de vidro e tampas, suportes para tubos, recipientes para reagentes, e outros.
- Materiais de plástico e borracha: Tubos reutilizáveis, pontas de micropipetas, vaginas artificiais, bainhas, cones de recolha entre outros.

O material de vidro deverá ser lavado logo após a sua utilização de acordo com a seguinte sequência:

- Imersão numa solução de desinfectante apropriada;
- Imersão numa solução de detergente;

- Enxaguamento com água corrente;
- Imersão em água destilada;
- Colocar a escorrer.

O material de plástico e borracha não descartável deverá ser lavado de acordo com a sequência seguinte:

- Enxaguamento com água corrente;
- Imersão 24 horas numa solução desinfectante adequada;
- Enxaguamento com água corrente;
- Imersão em água destilada;
- Secagem em estufa.

1.6.2.2 PROCEDIMENTOS DE PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE DETERGENTE E DESINFECTANTE

Os procedimentos a adoptar na preparação de soluções detergentes e desinfectantes em uso no CCSHA aplicam-se à utilização do detergente com o nome comercial *TEEPOL* e ao desinfectante com o nome comercial *D10*. No entanto, a opção por outros produtos alternativos não deverá ser descurada adaptando-se os procedimentos às instruções prescritas pelos fabricantes dos produtos.

1.6.2.2.1 PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO *TEEPOL*

Com uma proveta medir 15 ml de *Teepol* e adicionar a 5 litros de água. Em materiais ou superfícies com elevado grau de conspurcação, realizar uma solução com 30 ml de *Teepol* para 5 litros de água.

1.6.2.2.2 PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO *D10*

Com uma proveta medir 50 ml de *D10* e adicionar a 5 litros de água.

1.6.3 DESINFECÇÃO QUÍMICA OU DESCONTAMINAÇÃO

Existe uma grande variedade de produtos químicos que podem ser utilizados como desinfectantes e/ou anti-sépticos. A variedade de produtos comerciais obriga a que seja realizada uma escolha criteriosa de acordo com os produtos de risco e o tipo de materiais a desinfectar. A desinfecção química é o método a utilizar para a descontaminação dos componentes que constituem as vaginas artificiais e os materiais que não sejam passíveis de suportar temperaturas de esterilização por calor. Os germicidas comerciais deverão ser escolhidos, armazenados, manipulados, utilizados e eliminada com cuidado, respeitando as instruções dos fabricantes. Para proteção pessoal, recomenda-se a utilização de luvas, aventais e proteções oculares durante a preparação de diluições de germicidas químicos. Para a limpeza regular de solos, paredes, materiais e mobiliário não se exige geralmente germicidas químicos devendo no entanto ser usado em certas situações de risco. O quadro seguinte resume as diluições recomendadas de compostos que libertam cloro.

Diluições recomendadas de compostos libertando cloro¹

	Situação “limpa”	Situação “suja”²
Cloro activo necessário	0,1% (1g/l)	0,5% (5g/l)
Solução de hipocloreto de sódio (5% de cloro activo)	20 ml/l	100 ml/l
Solução de hipocloreto de cálcio (70% de cloro activo)	1,4 g/l	7,0 g/l
Pó de dicloroisocianureto de sódio (60% de cloro activo)	1,7 g/l	8,5 g/l
Comprimidos de dicloroisocianureto de sódio (1,5 g de cloro activo/comprimido)	1 comprimido/l	4 comprimidos/l
Cloramina (25% de cloro activo)	20 g/l	20 g/l

Fonte: **MANUAL DE SEGURANÇA BIOLÓGICA EM LABORATÓRIO**, Terceira edição, da **Organização Mundial da Saúde**.

²Situação limpa= Depois do lixo mais importante ter sido removido.

Situação suja= Para deitar directamente, por exemplo, sobre o sangue ou antes do lixo mais importante ter sido removido

1.6.3.1 DESINFECÇÃO E ESTERILIZAÇÃO POR CALOR

O calor (seco ou húmido) é o agente físico mais vulgarmente utilizado para a descontaminação de material de laboratório passível de suportar altas temperaturas (> 160°C durante 2-4 horas). O calor “húmido” é muito eficaz quando utilizado em autoclave. A ebulição uma vez que não elimina todos os microrganismos e/ou agentes patogénicos pode ser utilizada como tratamento mínimo para desinfeção. Os materiais esterilizados devem ser manuseados e armazenados de forma a não serem contaminados até serem utilizados de novo.

1.6.3.1.1 ESTERILIZAÇÃO EM AUTOCLAVE

As esterilizações por vapor saturado sob pressão (autoclave) são a meio mais eficaz e seguro de esterilizar materiais de laboratório pois os microrganismos são destruídos pela ação combinada do calor, da pressão e da humidade, que promovem a coagulação e a desnaturação das proteínas da estrutura celular. Na maior parte dos casos, os ciclos a seguir indicados assegurarão a esterilização de materiais correctamente carregados.

- Calor húmido/autoclave: Esterilizações por vapor saturado sob pressão (autoclave) são a meio mais eficaz e seguro de esterilizar materiais de laboratório. Na maior parte dos casos, os ciclos a seguir indicados asseguraram a esterilização de materiais corretamente carregados em autoclave:

1. Durante 3 minutos a 134°C
2. Durante 10 minutos a 126°C
3. Durante 15 minutos a 121°C
4. Durante 25 minutos a 115°C.

1.6.3.1.2 ESTERILIZAÇÃO EM ESTUFA

As estufas realizam o processo de esterilização através de temperatura elevada, por um tempo pré-determinado. Esse tipo de esterilização causa a destruição dos microrganismos fundamentalmente por um processo de oxidação, que promove a desidratação progressiva do núcleo das células.

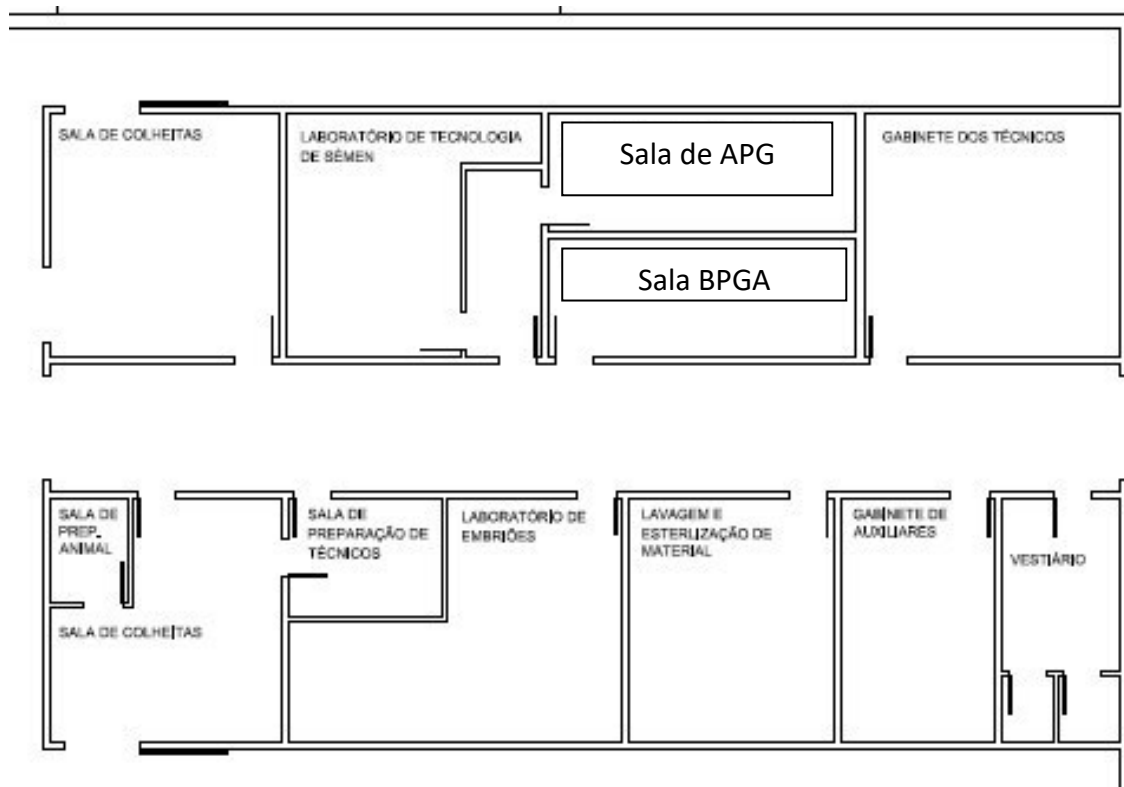
- Calor seco/estufa: Descontaminação de agentes patogénicos de objetos de laboratório a temperaturas de 160°C ou superiores durante 2 - 4 horas;

Todos os equipamentos requerem manutenção e calibração adaptada às exigências do mesmo. São efectuados todos os registos de controlo de temperatura (estufas, câmara frigorífica e banho-maria); controlo semanal dos níveis de azoto nos contentores de armazenamento.

As regras de funcionamento e de segurança com vista a minimizar os perigos inerentes à utilização de aparelhos sob pressão na esterilização de matérias de laboratório poderão ser consultadas no **MANUAL DE SEGURANÇA BIOLÓGICA EM LABORATÓRIO**, Terceira edição, da **Organização Mundial da Saúde**.

2 ANEXOS

2.1 PLANTA DO CENTRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA HERDADE DA ABÓBODA



2.2 FORMULÁRIOS

2.2.1 FICHA INDIVIDUAL DO ANIMAL

	Ficha Individual do animal	Data: MV: Página 1 de
---	-----------------------------------	-----------------------------

- **Identificação animal**

Raça	Idade	SIA	LG	Genealogia	Mérito Genético

- **Criador/ Exploração**

Criador	Marca de Exploração	Estatuto Sanitário	REDOC	Veterinário Assistente da Exploração

- **Objetivo da entrada do animal no CRAHA**

--

- **Período de quarentena**

- História sanitária do animal na exploração de origem

(Data da última cobrição natural, testes realizados e respectivos resultados, tratamentos e vacinações efetuadas)

--

- Rastreio sanitário CQ:

(Dois testes consecutivos negativos com intervalo de 30 dias à entrada e saída do Centro de Quarentena com igual saneamento de machos e fêmeas)

Despistes a efectuar	Resultados 1º	Resultado 2º
<i>Border Disease</i>		
Paratuberculose		
Brucelose (<i>B. ovis</i>)		
Brucelose (<i>B. melitensis</i>)		

2.2.2 REGISTO DE RECOLHA DE SÉMEN

	<u>Registos de recolha de sémen</u>	Data: MV: Página 1 de
---	--	-----------------------------

Data de admissão ao CCSHA:

- Registo do Animal:**

Espécie	Raça do Animal	Número Casa	Número SIA

- Avaliação andrológica:**

Monorquídio/Criptorquídio	
Escroto (feridas; cor; elasticidade; aderências)	
Perímetro escrotal	
Mobilidade	
Consistência	
Sensibilidade	

- Comportamento do Animal durante a recolha de Sémen:**

Data recolha						
Mostra interesse em saltar						
Mostra interesse em saltar mas não apresenta erecção						
Não mostra qualquer interesse em saltar						
Salto realizado						
Salto não realizado						
Líbido (escala de 0 a 10*)						

***Líbido** - O interesse sexual pode ser identificado pelos seguintes requisitos: identificação de fêmeas em estro; cheiradas; cabeçadas; lambidelas; reflexo de Flehmen; movimentos pélvicos e pingos de sémen ou plasma seminal. O macho pode ser classificado de acordo com a nota obtida no teste da libido: zero a três – questionável; quatro a seis – bom; sete a oito – muito bom e; nove a dez – excelente ou superior

PT:

- Avaliação quantitativa e qualitativa do líquido seminal:

DATA RECOLHA	
HORA RECOLHA	
Volume (ml)	
Cor*	
PH	
Morfologia (Normal/Anormal)	
Tipo de anomalias (cabeça; cauda; gota citoplasmática – proximal/distal)	
Motilidade massal (Numa escala de 0 a 5)**	
Motilidade individual progressiva (Muito bom; Bom; Médio)***	
Aglutinação (0; +; ++; +++)****	
Concentração	
Protocolo	
Sémen apto para inseminação	Sim ☐ Não ☐
Sémen p/criopreservação	
Sémen p/utilização a fresco	
Concentração de spz desejada p/palhinha	
Nº palhinhas previstas	
Nº palhinhas realizadas	
Nº palhinhas armazenadas	
Cor palhinha	
Tampão	
Hora início da refrigeração	
Hora da congelação	

*Cor: marfim ($\geq 750 \times 10^6$ espz/ml) – Muito Bom; leite (400 a 750×10^6 espz/ml) - Bom; leite magro (250 a 400×10^6 espz/ml) – Médio; translúcido ($< 250 \times 10^6$ espz/ml) – Mau

** **Motilidade massal** 0 – Imóveis ou mortos; 1 – Sem movimentos progressivos, rodando sobre si mesmos (cabeça dos espermatozoides ficam fixas só movem as caudas); 2 – Com movimentos anormais (em círculos); 3 – Com movimentos progressivos lentos ou sinuosos; 4 – Com movimentos rápidos e progressivo ; 5 - Com movimentos progressivos muito rápidos.

*****Motilidade individual progressiva**: Muito bom – 80 a 100%; Bom – 60 a 79%; Médio – 40 a 59%

******Aglutinação** 0 – sem aglutinação; + - pouco evidente; ++- evidente; +++ - muito evidente.

2.2.3 REGISTO CONTENTORES

	<u>Registos Contentor</u>	Data: MV: Página 1 de
---	----------------------------------	-----------------------------

Canister 1	Raça	Nº	Data	Cor	# palhinhas	Observações
CIMO						
BAIXO						
Canister 2	Raça	Nº	Data	Cor	# palhinhas	Observações
CIMO						
BAIXO						
Canister 3	Raça	Nº	Data	Cor	# palhinhas	Observações
CIMO						
BAIXO						
Canister 4	Raça	Nº	Data	Cor	# palhinhas	Observações
CIMO						
BAIXO						
Canister 5	Raça	Nº	Data	Cor	# palhinhas	Observações
CIMO						
BAIXO						

2.2.4 CONTROLO DE TEMPERATURA DOS EQUIPAMENTOS

	<u>Registos Temperatura Equipamentos</u>	Data: MV: Página 1 de
---	---	-----------------------------

[illegible]

2.3 PROCEDIMENTOS

2.3.1 PROTOCOLOS DE RECOLHA E PROCESSAMENTO DE SÉMEN

2.3.1.1 OVINOS

A. Recolha de Sémen

- Recolher o sémen através do método de vagina artificial;
- Colocar o material que compõe a vagina na estufa a uma temperatura entre os 30° e os 37°C;
- Colocar água no interior da vagina a uma temperatura entre os 48°C- 50°C;
- Acoplar um tubo graduado (aquecido a 30-37°C) numa das extremidades da vagina artificial;
- Insuflação pela válvula;
- Higienizar o prepúcio do macho com uma toalha de papel;
- Aproximar o reprodutor da fêmea, devidamente contida;
- O operador deve então, agachar-se ao lado do reprodutor;
- Esperar que o reprodutor realize o salto e exteriorize o pénis;
- Desviar cuidadosamente o pénis com a mão, pegando no prepúcio e simultaneamente, com a outra mão, aproximar a vagina artificial para a penetração e ejaculação;
- Se ocorrer penetração na vagina artificial e o macho não ejacular, verificar a temperatura e a pressão da vagina;
- Imediatamente após a colheita, proteger o sémen da variação de temperatura, remover o tubo, identificar, cobrir e colocar em banho-Maria a 33°- 35° C;
- Após a colheita, a vagina deve ser lavada, desinfetada, enxaguada com água destilada e seca. Antes de utilização, a membrana de borracha deve ser desinfetada com álcool a 70% e esperar para que esteja totalmente seca.

B. Avaliação do ejaculado

1. Volume

- Avaliar directamente no tubo de recolha graduado.

2. Cor e Odor

- Observar a coloração das paredes do tubo de recolha graduado
- Normal: Coloração esbranquiçada (branco marmoreado ou creme claro)
- Analisar odor (presença de urina, cheiro característico)

3. Consistência ou densidade

- Avaliar visualmente a concentração do ejaculado pela proporção de esperma e de líquido seminal;
- Classificar através da escala seguinte:

Número de espermatozóides ($\times 10^9/\text{ml}$)		
Consistência	Média	Variação
Creososo espesso	5.0	4.5-6.0
Creoso	4.0	3.5- 4.5
Creoso fino	3.0	2.5-3.5
Leitoso	2.0	1.0-2.5
Opaco	0.7	0.3-1.0
Aquoso	Insignificante	

4. Concentração

- Utilizar o espectrofotómetro, calibrado para espécie ovina/caprina, para medir a concentração espermática. Realizar uma diluição de 1:100 a 1:400.

5. Motilidade Massal

- Colocar uma gota de sémen não diluído sobre uma lâmina aquecida (37°C);
- Examinar no microscópio 100x usando uma platina aquecida;
- Determinar a motilidade, baseando-se na tabela seguinte:

Nota	Descrição das ondas	Descrição do movimento
0	Totalmente sem movimento.	Todos os spz são imóveis
1	Apenas movimento individual de poucos spz. $\pm 10\%$ de spz vivos.	Poucos spz mostram algum sinal de vida, com movimento fraco, tremendo ou com oscilação da cauda.
2	Observam-se os movimentos espermáticos, mas não forma ondas. 20-40% de spz activos.	Spz com movimento oscilatório e desorganizado e deslocamento lento, alguns movem-se mais rápido, grande número de spz imóveis
3	Ondas de baixa amplitude e movimento lento. 45-65% de spz activos.	Prevalecem os spz com movimento circular, alguns com trajectória progressiva, sem movimento oscilatório (tremor), metade são imóveis.
4	Ondas rápidas e vigorosas, não forma remoinho. 70 a 85% de spz activos.	Maioria dos spz tem movimentos rápidos, com trajectória progressiva e alguns com trajectória circular.
5	Ondas muito rápidas e densas que se juntam formando um remoinho (difícil determinar ondas isoladas). 90% ou mais de spz vivos.	Todos ou quase todos os spz exibem enérgicos movimentos progressivos

6. Motilidade individual progressiva

- Avaliar a motilidade individual, retirar 10 μ l de sémen puro, com uma micropipeta e colocá-la numa lâmina. Adicionar na outra extremidade da lâmina uma gota de diluidor e observar ao microscópio.

7. Avaliação da concentração pelo método da Câmara de *Neubauer*

- Diluir uma amostra de 0.01 ml (10 µl) de sémen puro em 4 ml de água destilada ou solução de formol salina (1/400);
- Preparar a câmara de *Neubauer* colocando uma lamela sobre a área de contagem. Para que a lamela fique aderente à câmara, humedecer as bordas que rodeiam a área de contagem com saliva ou vaselina, coloque a lamela e exercer pressão;
- Aspirar com uma pipeta uma pequena quantidade da solução contendo os espermatozóides e introduza entre a lâmina e a lamela. Atenção para que o líquido não transborde a área delimitada e não fique em áreas com bolhas de ar.
- Deixar a câmara na posição horizontal por alguns minutos para que os espermatozóides repousem;
- Colocar a câmara na plataforma do microscópio e focar a área de contagem;
- Contar no mínimo 10 quadrados maiores/ejaculado (5 em cada área de contagem). Somente serão considerados os espermatozóides que estiverem no interior de cada quadrado e aqueles cujas cabeças se encontram nas linhas que formam o ângulo inferior esquerdo de cada quadrado (entrando no quadrado);
- A concentração de espermatozóides/ml de sémen é calculada multiplicando-se o número de espermatozóides contados nos 10 quadros por 10.000.000.

C. Diluição do ejaculado

- Diluir o sémen utilizando um diluidor comercial contendo antibiótico, água, sais, açúcares, electrólitos, glicerol, antibióticos e proteínas vegetais;
- Colocar o sémen diluído numa *cuvette*;
- Através de sucção (efectuar do lado do tampão), aspirar para palhinhas de 0,25ml ou 0,5ml de cor estipulada e previamente identificada;
- Através de um pente, criar a câmara de expansão (inserção 4 a 5x) com um máximo de 0.5 cm.
- Higienizar as palhinhas com papel absorvente;
- Introduzir a ponta (contrária ao tampão) das palhinhas em álcool polivinílico com máximo de 2mm;
- Colocar as palhinhas numa caixa térmica para posterior refrigeração.

D. Refrigeração Sémen

- Colocar as palhinhas na estufa durante 4h a uma temperatura de 4°C, numa caixa térmica (refrigeração gradual).

E. Congelação Sémen

- Distribuir as palhinhas horizontalmente numa *rack* em contacto com os vapores de azoto (-75° a -125°C) a 4 cm acima do nível do líquido e manter durante 20 minutos;
- Submergir totalmente as palhinhas no azoto;
- Transferir as palhinhas para o contentor de azoto líquido devidamente acondicionadas em *canisters* utilizando *goblets*.

F. Descongelção do Sémen

- Retirar o *canister* do contentor;
- Mergulhar imediatamente, a 37,5°C durante 40 segundos no banho-maria;
- Secar a palhinha com papel, antes do uso;
- Cortar as duas extremidades da palhinha;
- Colocar o sémen num tubo aquecido a 37°C podendo ser necessária uma diluição adicional
- Colocar uma gota do sémen numa lâmina pré-aquecida a 37°C sobre uma platina aquecida.

Avaliação à descongelção

- Observar a mobilidade individual > 30%

2.3.1.2 CAPRINOS

A. Recolha de Sémen

- Recolher o sémen através do método de vagina artificial;
- Colocar o material que compõe a vagina na estufa a uma temperatura entre os 30° e os 37°C;
- Colocar água no interior da vagina a uma temperatura entre os 48°- 50°C;
- Acoplar um tubo graduado (aquecido a 30-37°C) numa das extremidades da vagina artificial;
- Insuflação pela válvula;
- Higienizar o prepúcio do macho com uma toalha de papel;
- Aproximar o reprodutor da fêmea, devidamente contida;
- O operador deve então, agachar-se ao lado do reprodutor;
- Esperar que o reprodutor realize o salto e exteriorize o pénis;
- Desviar cuidadosamente o pénis com a mão, pegando no prepúcio e simultaneamente, com a outra mão, aproximar a vagina artificial para a penetração e ejaculação;
- Se ocorrer penetração na vagina artificial e o macho não ejacular, verificar a temperatura e a pressão da vagina;
- Imediatamente após a colheita, proteger o sémen da variação de temperatura, remover o tubo, identificar, cobrir e colocar em banho-maria a 30°C.
- Após a colheita, a vagina deve ser lavada, enxaguada com água destilada e seca. Antes de utilização, a membrana de borracha deve ser desinfetada com álcool a 70% e esperar para que esteja totalmente seca.

B. Avaliação do ejaculado

1. Volume

- Avaliar directamente no tubo de recolha graduado

2. Cor e Odor

- Observar a coloração das paredes do tubo de recolha graduado
- Normal: Coloração amarelada
- Analisar odor (presença de urina, cheiro característico)

3. Consistência ou densidade

- Avaliar visualmente a concentração do ejaculado pela proporção de esperma e de líquido seminal
- Classificar através da escala seguinte:

Número de espermatozóides ($\times 10^9$/ml)		
Consistência	Média	Variação
Creoso espesso	5.0	4.5-6.0
Creoso	4.0	3.5- 4.5
Creoso fino	3.0	2.5-3.5
Leitoso	2.0	1.0-2.5
Opaco	0.7	0.3-1.0
Aquoso	Insignificante	

4. Motilidade Massal

- Colocar uma gota de sémen (10 μ) não diluído sobre uma lâmina aquecida (37°C);
- Examinar no microscópio 100x usando uma platina aquecida;
- Determinar a motilidade, baseando-se na tabela seguinte:

Nota	Descrição das ondas	Descrição do movimento
0	Totalmente sem movimento.	Todos os spz são imóveis
1	Apenas movimento individual de poucos spz. $\pm$ 10% de spz vivos.	Poucos spz mostram algum sinal de vida, com movimento fraco, tremendo ou com oscilação da cauda.
2	Observam-se os movimentos espermáticos, mas não forma ondas. 20-40% de spz activos.	Spz com movimento oscilatório e desorganizado e deslocamento lento, alguns movem-se mais rápido, grande número de spz imóveis
3	Ondas de baixa amplitude e movimento lento. 45-65% de spz activos.	Prevalecem os spz com movimento circular, alguns com trajectória progressiva, sem movimento oscilatório (tremor), metade são imóveis.
4	Ondas rápidas e vigorosas, não forma redemoinho. 70 a 85% de spz activos.	Maioria dos spz tem movimentos rápidos, com trajectória progressiva e alguns com trajectória circular.
5	Ondas muito rápidas e densas que se juntam formando um redemoinho (difícil determinar ondas isoladas). 90% ou mais de spz vivos.	Todos ou quase todos os spz exibem enérgicos movimentos progressivos

5. Motilidade individual progressiva

- Avaliar a motilidade individual, retirar 10µl de sémen puro, com uma micropipeta e colocá-la numa lâmina. Adicionar na outra extremidade da lâmina uma gota de diluidor

6. Concentração

- Utilizar o espectrofotómetro, calibrado para espécie caprina, para medir a concentração espermática. Realizar uma diluição de 1:100 a 1:400.

7. Avaliação da concentração pelo método da Câmara de *Neubauer*

- Diluir uma amostra de 0.01 ml (10 µl) de sémen puro em 4 ml de água destilada ou solução de formol salina (1/400);
- Preparar a câmara de *Neubauer* colocando uma lamela sobre a área de contagem. Para que a lamela fique aderente à câmara, umedecer as bordas que rodeiam a área de contagem com saliva ou vaselina, coloque a lamela e exercer pressão
- Aspirar com uma pipeta uma pequena quantidade da solução contendo os espermatozóides e introduza entre a lâmina e a lamela. Atenção para que o líquido não transborde a área delimitada e não fique em áreas com bolhas de ar.
- Deixar a câmara na posição horizontal por alguns minutos para que os espermatozóides repousem;
- Colocar a câmara na plataforma do microscópio e focar a área de contagem
- Contar no mínimo 10 quadrados maiores/ejaculado (5 em cada área de contagem). Somente serão considerados os espermatozóides que estiverem no interior de cada quadrado e aqueles cujas cabeças se encontram nas linhas que formam o ângulo inferior esquerdo de cada quadrado (entrando no quadrado);
- A concentração de espermatozóides/ml de sémen é calculada multiplicando-se o número de espermatozóides contados nos 10 quadros por 10.000.000.

C. Lavagem do Sémen

- O sémen é diluído e lavado (retirar o plasma seminal) com uma solução de utilizando uma solução de Krebs-Ringer-Phosphate (solução de Krebs-Ringer-fosfato glucose).
- Realizar uma primeira centrifugação durante 10 minutos a 500 G, estando a solução de Ringer a uma temperatura de 30 °C (temperatura do banho-Maria).

- Retirar o sobrenadante (por aspiração utilizando uma bomba de vácuo), adicionar igual volume de solução de Ringer mantida à temperatura ambiente, realizar uma 2ª centrifugação.
- Retirar o sobrenadante e o sémen deposita-se no fundo do tubo colector.

D. Diluição do ejaculado

- Diluir o sémen utilizando um diluidor comercial
- Colocar o sémen numa *cuvette* e através de sucção o sémen é aspirado para palhinhas de 0,25 ou 0,5 ml de cor estipulada e previamente identificada
- Através de uma pente, criar a câmara de expansão (inserção 4 a 5x) com um máximo de 0.5 cm.
- Posteriormente selar com álcool polivinílico

E. Refrigeração Sémen

- Colocar as palhinhas na estufa durante 3.30h a uma temperatura de 4°C, numa caixa térmica.

F. Congelação Sémen

- Distribuir as palhinhas horizontalmente num suporte metálico em contacto com os vapores de azoto a 3,5cm acima do nível do líquido e manter durante 20min;
- Submergir as palhinhas e azoto;
- Transferir as palhinhas para o azoto líquido devidamente acondicionadas em *canisters* utilizando *goblets*.

G. Descongelção Sémen

- Retirar o *canister* do contentor;
- Mergulhar imediatamente, a 37,5°C durante 40 segundos no banho-maria;
- Secar a palhinha com papel, antes do uso;
- Cortar as duas extremidades da palhinha;
- Colocar o sémen num tubo aquecido a 37°C;
- Colocar uma gota do sémen numa lâmina pré aquecida a 37°C sobre uma platina aquecida;
- Posteriormente avaliar a mobilidade individual, % de spz viáveis e normais.

2.4 PROTOCOLOS DE PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DESINFECTANTES

 Centro de Reprodução Herdade da Abóbada	Protocolos de preparação das soluções de detergente e de desinfectante	Edição: Data: Página 1 de 1
--	---	-----------------------------------

1.Objectivo

Esta instrução tem como objectivo descrever os procedimentos de preparação das soluções de detergente e de desinfectante em uso no Centro de Reprodução da Herdade da Abóbada.

2.Campo de aplicação

Este procedimento aplica-se à utilização do detergente com o nome comercial *TEEPOL* e ao desinfectante com o nome comercial *D10*.

3.Procedimento

3.1 Protocolo de preparação do *TEEPOL*

- Com uma proveta medir 15 ml de Teepol e juntar a 5 litros de água.
- Se a sujidade for difícil de remover pode-se fazer uma solução com 30 ml de Teepol para a 5 litros de água.

3.2 Protocolo de preparação do *D10*

- Com uma proveta medir 50 ml de *D10* e juntar a 5 litros de água.

4. Documentos / Registos associados

4.1. Documentos Associados

4.2. Registos Associados

Elaborado por:	Data:
	Responsável

[illegible]

Apêndice III - Folha de cálculo: Taxa de diluição de sémen de Caprino

[illegible]