

DIOGO OLIVEIRA RODRIGUES GUERREIRO SILVA

Exame Andrológico em carneiros. Avaliação do efeito da criopreservação no sémen de carneiro e seu impacto sobre a fertilidade.

Orientador: Professor Doutor Carlos Manuel Varela Bettencourt

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2019

DIOGO OLIVEIRA RODRIGUES GUERREIRO SILVA

Exame Andrológico em carneiros. Avaliação do efeito da criopreservação no sémen de carneiro e seu impacto sobre a fertilidade.

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 15 de Janeiro de 2019, perante o júri nomeado pelo Despacho Reitoral nº 417/2018 com a seguinte composição:

Presidente do Júri: Professora Doutora Laurentina Maria Rilhas Pedroso

Arguente: Professor Doutor Daniel de Moura Murta

Orientador: Professor Doutor Carlos Manuel Varela Bettencourt

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2019

Agradecimentos

Ao Doutor Carlos Bettencourt, por aceitar a orientação deste trabalho e pela disponibilidade sempre manifestada.

À Dra. Elisa Bettencourt, Dr. Ricardo Romão, Dra. Helena Lalanda, Dra. Matilde Vítor e Dr. Rui Silva pelos conhecimentos que me transmitiram e pelo auxílio prestado.

A todo o pessoal do Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, que demonstrou sempre assinalável profissionalismo.

Ao Nuno, Gabriela, Catarina e Diogo, pela amizade, pelo empenho e dedicação a este trabalho e cuja colaboração foi essencial à realização do mesmo.

À Anabela pela paciência e compreensão ao longo do tempo.

Aos meus pais, Graciete e José, e ao meu irmão Daniel pelo apoio e aconselhamentos de sempre.

Aos colegas que me acompanharam diariamente durante os 6 anos de formação em Medicina Veterinária, pela amizade e companheirismo.

Finalmente, àqueles que, embora não referidos, contribuíram direta ou indiretamente.

Resumo

Este estudo pretendeu: I- Descrever o procedimento do exame andrológico em carneiros e relaciona-lo com a qualidade do sémen; II- Demonstrar as alterações induzidas pela criopreservação e descongelação no sémen de carneiro; III- Comparar a eficácia de dois extensores de sémen (OVIXCell® e Glucose-Citrato-Gema de ovo); IV- Determinar os Índices de Fertilidade, Natalidade e número médio de borregos por parto resultantes da inseminação artificial com sémen refrigerado e descongelado.

Através da estatística de Pearson, determinou-se uma correlação positiva entre os vários parâmetros do exame andrológico e a qualidade do sémen. A concentração apresentou uma correlação forte ($r=0,8$), A circunferência escrotal ($r=0,59$), motilidade ($r=0,59$), volume ($r=0,58$) e morfologia ($r=0,46$) apresentaram correlações médias. Os resultados permitem afirmar com alguma segurança que um carneiro “Apto para Reprodução” produzirá um ejaculado de boa qualidade.

Foram feitas 13 sessões de colheitas de sémen. O sémen obtido foi submetido a um protocolo de congelação com dois extensores diferentes; OVIXCell® e Glucose-Citrato-Gema de ovo. Todas as amostras de sémen foram avaliadas antes da criopreservação e após a descongelação, quanto á motilidade, vitalidade e morfologia.

A criopreservação e descongelação têm um impacto bastante negativo na viabilidade do sémen, independentemente do extensor utilizado. Registou-se um decréscimo de 50% na motilidade progressiva; de 40% na vitalidade espermática e um aumento de 20% de espermatozoides com morfologia anormal. A utilização de Glucose-Citrato-Gema de ovo mostrou-se vantajosa relativamente à utilização de OVIXCell® por apresentar um perfil de alterações menos significativo à descongelação. O sémen diluído com OVIXCell® teve uma perda de motilidade 10% superior, de vitalidade 7% superior e uma contagem de espermatozoides com morfologia anormal 23% superior quando comparado com o sémen diluído com Glucose-Citrato-Gema de ovo.

Relativamente ao índice de Fertilidade e Natalidade, a preparação de doses de inseminação artificial com 50×10^6 spz viáveis/dose poderá compensar a fraca viabilidade do sémen descongelado aplicado por laparoscopia. A utilização desta concentração permitiu obter índices de fertilidade de 34% e de natalidade de 42%, ambos satisfatórios relativamente aos índices descritos na bibliografia. Os resultados não foram conclusivos quanto á média de borregos por parto.

Palavras Chave: carneiro, sémen, criopreservação, exame andrológico, inseminação artificial, fertilidade, OVIXCell®, Glucose-Citrato-Gema de ovo.

Abstract

This study aimed to: I- Describe the procedure of the breeding soundness evaluation in rams and relate it to the quality of semen; II– Demonstrate the changes induced by cryopreservation and thawing in ram semen; III - Compare the change profile induced by freezing and thawing in semen extended with OVIXCell® and with Glucose-Citrate-Egg yolk); IV– Determine the Fertility and Birth rates and average of lambs per lambing resulting from artificial insemination with refrigerated and thawed semen.

Using Pearson's statistics, determined a positive correlation between the various parameters of the breeding soundness evaluation and the quality of semen. Concentration had a strong correlation ($r = 0.8$); scrotal circumference ($r = 0.59$), motility ($r = 0.59$), volume ($r = 0.58$) and morphology ($r = 0.46$) had medium correlations. This analysis allows us to assert, that a "Suitable for Reproduction" ram will produce a good quality ejaculate.

Thirteen semen collection sessions were carried out. Collected semen was submitted to a freezing protocol with two different extenders; OVIXCell® and Glucose-Citrate-Egg Yolk. All semen samples were evaluated before freezing and after thawing for motility, vitality and morphology.

Cryopreservation and thawing had a very negative impact on semen viability, regardless of the used extender. It was noted, a 50% decrease in progressive motility, a 40% decrease in sperm vitality and a 20% increase in abnormal morphology count. The use of the Glucose-Citrate-Egg Yolk Extender was advantageous over the use of OVIXCell® because it presented a less significant change profile after thawing. Semen extended with OVIXCell® had 10% higher motility loss, 7% higher vitality loss and a 23% higher abnormal sperm morphology count when compared to semen diluted with Glucose-Citrate-egg yolk.

Regarding the Fertility and Birth rates, artificial insemination with a concentration of 50×10^6 viable spz/dose may compensate for the poor viability of thawed semen when applied by intrauterine laparoscopy. Insemination of sheep with these concentrations resulted on a fertility rate of 34% and a 42% birth rate. These rates are satisfactory relative to those described in literature. Results were not conclusive regarding the average number of lambs per lambing.

Key Words: ram, semen, cryopreservation, breeding soundness, artificial insemination, fertility, OVIXCell®, Glucose-Citrate-egg yolk.

Lista de abreviaturas

ACBM - Associação de Criadores de Bovinos Mertolengos
ACBRA - Associação de Criadores de Bovinos de raça Alentejana
APCRS – Associação Portuguesa de Caprinicultores de Raça Serpentina
AMIBA - Associação de Criadores de Bovinos de Raça Barrosã
ANCORME - Associação Nacional de Criadores de Ovinos de Raça Merina
BDV – Vírus da *Border Disease*
BPGA – Banco Português de Germoplasma Animal
BVDV - Vírus da Diarreia Viral Bovina
CC – Condição Corporal
CEBA – Centro de Experimentação do Baixo Alentejo
CN – Cabeça Normal
CRAHA – Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abobada
EE – Electro-Ejaculação
G.C.G.o. – Glucose-Citrato-Gema de ovo
IA - Inseminação Artificial
LG – Número de identificação do Livro Genealógico
PMSG - Hormona Gonadotrofina Coriónica Equina
S.I.A - Número do Sistema Identificação animal
Spz - Espermatozoides
TRIS - tris(hidroximetil)-Aminometano
VA – Vagina Artificial

Índice Geral

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract.....	4
Lista de abreviaturas	5
Índice de Tabelas.....	10
Índice de Figuras	13
I. Casuística de estágio	15
1. Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abobada (CRAHA).....	16
2. Vettotal, Serviços Veterinários Lda.....	19
II. Revisão bibliográfica	20
1. introdução.....	20
1.1. Conservação “ <i>in-situ</i> ”	21
1.2. Conservação “ <i>ex-situ</i> ”	21
1.3. Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, Herdade da Abóbada	22
2. Criopreservação	23
3. Inseminação artificial em ovinos	25
3.1. Inseminação Artificial Cervical.....	26
3.2. Inseminação Artificial Intrauterina por Laparoscopia	27
3.3. Propriedades do Cérvix Ovino	28
3.4. Administração de Oxitocina	29
4. Exame Andrológico	30
4.1. Exame Físico e de Estado Geral.....	31
4.2. Condição corporal.....	31
4.3. Avaliação anatômica e estrutural	31
4.4. Aprumos e membros	31
4.5. Dentição	32
4.6. Visão	32
4.7. Líbido	32
4.8. Avaliação testicular.....	33
4.9. Consistência, Textura, Mobilidade e Simetria testicular.....	33

4.10.	Alterações Anatômicas	34
4.11.	Epidídimo	34
4.12.	Circunferência escrotal	34
4.13.	Prepúcio e pênis	35
5.	Doenças associadas à reprodução de ovinos	37
5.1.	Postite Ulcerativa	37
5.2.	Epididimite Contagiosa Ovina.....	37
5.3.	<i>Brucella ovis</i>	38
5.4.	<i>Actinobacillus seminis</i>	40
5.5.	Vírus da <i>Border Disease</i>	41
6.	Processamento do sémen.....	42
6.1.	Colheita de sémen	42
6.2.	Avaliação laboratorial da qualidade do sémen	42
6.2.1.	Motilidade espermática	43
6.2.2.	Motilidade progressiva	44
6.2.3.	Motilidade massal	45
6.2.4.	Morfologia e Vitalidade	45
6.2.5.	Morfologia espermática.....	47
6.2.5.1.	Espermatozóides normais	47
6.2.5.2.	Categorização de anomalias espermáticas.....	48
6.2.5.3.	Defeitos de cabeça.....	49
6.2.5.3.1.	Cabeças destacadas	49
6.2.5.3.2.	Cabeças piriformes	50
6.2.5.3.3.	Macrocefalia e Microcefalia	50
6.2.5.3.4.	Defeitos de acrossoma.....	50
6.2.5.4.1.	Ventroflexão distal	53
6.2.5.4.2.	Cauda enrolada	53
6.2.5.4.3.	Cauda dobrada.....	53
6.2.5.5.1.	Defeito DAG	55
6.2.5.5.2.	Gotas citoplasmáticas	55
6.2.5.6.	Artefactos.....	56
7.	Sémen destinado à inseminação artificial	57
7.1.	Conservação do sémen para inseminação artificial.....	57
7.2.	Diluição do sémen	59
8.	Sémen refrigerado (0-5°C)	60

9. Sémen criopreservado (-196°C).....	61
10. Descongelção de sémen.....	62
11. Efeito da criopreservação e descongelção na viabilidade dos espermatozoides.....	63
11.1. Capacitação espermática	63
III. Componente prática.....	65
1. Objetivos do estudo	65
2. Materiais e Métodos	66
2.1. Colheita de sémen.....	67
2.2. Avaliação do ejaculado	70
2.3. Diluição do sémen	72
2.4. Refrigeração e criopreservação	73
2.5. Relação entre os parâmetros do exame andrológico e a qualidade do sémen	76
2.6. Viabilidade do sémen à descongelção.....	76
2.7. Perfil de alterações induzidas pela criopreservação e descongelção no sémen diluído com Glucose-Citrato-Gema de ovo e OVIXCell®.....	77
2.8. Índice de Fertilidade, Índice de Natalidade e número medio de borregos por parto.	78
2.9. Programa de inseminação artificial.....	80
3. Resultados	81
3.1. Serologia e exame andrológico	81
3.2. Relação entre os parâmetros do exame andrológico e a qualidade do sémen	83
3.3. Viabilidade do sémen à descongelção.....	84
3.4. Perfil de alterações induzidas pela criopreservação e descongelção no sémen diluído com Glucose-Citrato-Gema de ovo e OVIXCell®.....	86
3.5. Índice de Fertilidade, Índice de Natalidade e número medio de borregos por parto.	88
4. Discussão.....	90
4.1. Relação entre os parâmetros do exame andrológico e a qualidade do sémen	90
4.2. Avaliação laboratorial da qualidade do sémen.	90
4.3. Perfil de alterações induzidas pela criopreservação e descongelção no sémen diluído com Glucose-Citrato-Gema de ovo e OVIXCell®.....	92

4.4. Índice de Fertilidade, Índice de Natalidade e número medio de borregos por parto.	92
5. Conclusão	94
IV. Bibliografia	97
Anexo I.....	I
Anexo II.....	II
Anexo III	IV
Anexo IV	V
Anexo V	IX
Anexo VI.....	XII
Anexo VII.....	XVI

Índice de Tabelas

Tabela 1 Casuística do estágio Curricular no Centro de Reprodução Animal Da Herdade da Abóbada. Número aproximado de intervenções por espécie animal.	18
Tabela 2 Casuística do estágio Curricular na Vetttotal. Número aproximado de intervenções por espécie animal.	19
Tabela 3 Concentração e volume de sémen requeridos para os diferentes tipos de inseminação artificial. Adaptado de (Youngquist and Threlfall 2007)	60
Tabela 4 Relação entre o Índice de Fertilidade e o tempo de corrido entre a aplicação cervical de sémen refrigerado e a colheita. Adaptado de (Salamon and Maxwell 2000)	60
Tabela 5 Composição dos extensores de sémen utilizados no CRAHA. À esquerda Glucose-Citrato-Gema de ovo preparado diariamente e à direita OVIXCell®.	72
Tabela 6 Constituição dos grupos de inseminação dos dias 25, 26 e 27 de Março. Tipos de inseminação e de sémen aplicados.	79
Tabela 7 Classificação do exame andrológico dos carneiros selecionados para o estudo.	81
Tabela 8 Parâmetros utilizadas para relacionar o exame andrológico com a qualidade do sémen.	83
Tabela 9 Estatística de Pearson. Cálculo do valor r para determinar a força da correlação entre os parâmetros do exame andrológico e a qualidade do sémen.	83
Tabela 10, Variação dos parâmetros motilidade individual, vitalidade e morfologia antes da congelação e após a descongelação. Valores médios de todas as colheitas	84
Tabela 11 Avaliação detalhada da morfologia do sémen fresco e descongelado por defeito espermático. Valores médios de todas as colheitas	85

Tabela 12 Variação dos parâmetros motilidade individual, vitalidade e morfologia antes da congelação e após a descongelação para sémen diluído com OVIXCell® e Glucose-Citrato-Gema de ovo.....	86
Tabela 13 Avaliação detalhada da morfologia por defeito espermático. Comparação da média dos valores obtidos nas diluições feitas com OVIXCell® e extensor Glucose-Citrato-Gema de ovo.....	87
Tabela 14 Representação dos dados relativos às inseminações artificiais de Março de 2018. Valor dos Índices de Fertilidade, Natalidade e número médio de borregos por parto para inseminação cervical com sémen refrigerado e inseminação intrauterina por laparoscopia com sémen descongelado.....	88
Tabela 15 Caracterização do sémen descongelado do carneiro III dador de sémen para BPGA, cujas doses foram utilizadas para inseminação intrauterina por Laparoscopia. Média de todas as colheitas entre Setembro e Dezembro de 2017.	89
Tabela 16 Avaliação da qualidade do sémen do carneiro III aplicado nas inseminações intrauterinas por laparoscopia. Dados relativos às doses de sémen utilizadas.	89
Tabela 17 Representação dos dados relativos às inseminações artificiais intrauterinas com sémen descongelado. Índices de Fertilidade, Natalidade e número médio de borregos nascidos por parto. Dados detalhados por carneiro	89
Tabela 18 Score de condição corporal, geralmente utilizado na avaliação de ovinos. Adaptado de (Youngquist and Threlfall 2007)	I
Tabela 19 Classificação da motilidade espermática massal. adaptado de (Gourley and Riese 1990; Maxwell and Evans 1987; Youngquist and Threlfall 2007)	II
Tabela 20 Relação entre a consistência do ejaculado e a concentração. Os ejaculados que obtenham o score entre 0 e 2 não devem ser utilizados para inseminação artificial adaptado de (Youngquist and Threlfall 2007).....	II

Tabela 21 Recomendações para classificação de Carneiros submetidos a exame andrológico, Classificação de Reprodutores, adaptado de (Youngquist and Threlfall 2007)	III
Tabela 22 Exame andrológico detalhado dos carneiros selecionados.	IV
Tabela 23 Registo de colheitas de sémen, e seu aproveitamento relativo á criopreservação. Número teórico de doses preparadas por ejaculado.....	VIII
Tabela 24 Registo das colheitas de sémen selecionadas para o estudo. Resultado da análise dos padrões de Motilidade Massal, Progressiva, Vitalidade e Morfologia espermática do sémen fresco e descongelado. Contagem total de defeitos morfológicos, e Diferencial dos defeitos de Cabeça, Peça Intermédia e Cauda.....	XI
Tabela 25 Avaliação detalhada da morfologia dos ejaculados em fresco selecionados para o estudo. Valores médios por defeitos morfológicos considerado.....	XV
Tabela 26 Avaliação detalhada da morfologia dos ejaculados descongelados selecionados para o estudo. Valores médios por defeitos morfológicos considerado.....	XIX

Índice de Figuras

Figura 1: Contentores de armazenamento de sémen do Banco Português de Germoplasma Animal. Centro de Reprodução animal da Herdade da Abóbada. Fotografia cedida pelo autor 2017.....	24
Figura 2 medição da circunferência escrotal de um carneiro Merino Preto. Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abobada. Fotografia cedida pelo autor 2017	35
Figura 3 Orquite / Epididimite supurativa causada por <i>Actinobacillus seminis</i> (diagnóstico presuntivo) num Carneiro Merino Preto. Fotografia cedida pelo autor 2017	40
Figura 4 Avaliação da vitalidade.....	46
Figura 5. Avaliação da morfologia espermática. Defeitos de cabeça. A – Alteração do acrossoma; B – Alteração do acrossoma (seta preta) rebordo acrossómico irregular; C – Espermatozóide morto com alteração do acrossoma, espessamento da peça intermédia e uma gota citoplasmática proximal; D – Espermatozóide morto com defeito no acrossoma e defeito DAG; E – Espermatozóide morto com cabeça piriforme e microcefálica; F – Espermatozóide morto entre vários vivos, cabeça globosa macrocefalia/ teratóide (seta preta; G – Cabeças destacadas. Microscopia do campo claro, ampliação 400X, coloração Eosina-Nigrosina, fotografia cedida pelo autor 2017.	52
Figura 6. Avaliação da morfologia espermática. Defeitos de cauda. A - Espermatozóide morto com cauda enrolada e uma cabeça isolada; B - Espermatozóide vivo com cauda enrolada; C – Espermatozoides mortos com cauda terminalmente enrolada (setas pretas), gota citoplasmática distal (seta vermelha); D – Espermatozoide morto com cauda dobrada; E - Espermatozóides mortos, caudas dobradas (setas pretas) e cauda terminalmente enrolada (seta vermelha); F - Espermatozóides mortos, ventroflexão distal da cauda (seta preta), G - Espermatozóide vivo com ventroflexão distal da cauda; H - Espermatozóides mortos, defeito DAG (seta preta); I – Espermatozoide morto, defeito DAG (seta preta). Microscopia do campo claro, ampliação 400X, coloração Eosina-Nigrosina. Fotografias cedidas pelo autor 2018.....	54
Figura 7 Avaliação da morfologia Espermática. Defeitos de peça intermédia A – Espermatozoides mortos, defeito DAG (seta preta) B – Espermatozóides mortos, Gotas citoplasmáticas distais (setas pretas). Microscopia do campo claro, ampliação 400X, coloração Eosina-Nigrosina. Fotografia cedida pelo autor 2017	56

Figura 8 Modelo de vagina artificial utilizada nas colheitas de sémen no Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada. Em cima, os vários componentes de uma vagina Artificial desmontada. Em baixo, uma vagina pronta a ser utilizada e um tupo falcon rolhado. 1- Cone de silicone, 2- corpo da vagina, tubo cilíndrico, 3- válvula ar/água, 4- protetor em espuma isoladora, 5-tubo falcon graduado, 7- Bandas elásticas, Fotografia cedida pelo autor 2017	68
Figura 9 Colheita de sémen, Centro de Reprodução Animal Da Herdade da Abóbada. À direita uma ovelha manequim presa a um tronco de contenção. À Esquerda, colheita de sémen de um carneiro Merino Preto através do método da vagina artificial. Fotografia cedida pelo autor 2017	69
Figura 10 Reco / Jangada utilizado para disposição das doses de inseminação artificial durante as fases da congelação de arrefecimento lento, arrefecimento rápido e pré congelação. É possível diferenciar os carneiros pela cor da palhinha, cor do selo de PVC e pelas inscrições na palhinha. Fotografia cedida pelo Autor 2017.	74
Figura 11 Esquerda: Disposição das doses de inseminação artificial nos recos/jangadas em que são arrefecidas nas duas primeiras fases da criopreservação. Direita: Colocação de um Reco/ jangada numa caixa térmica com 10 cm de azoto líquido, fase de arrefecimento rápido e início da congelação. É visível o vapor de azoto a que as palhinhas são sujeitas dentro da caixa térmica. Fotografia cedida pelo autor 2017	75
Figura 12 Contentor de armazenamento de sémen. Organização das doses de inseminação artificial por animal em visotubos de cores diferentes. As doses permanecem imersas em azoto líquido ate serem retiradas para utilização.	76

I. Casuística de estágio

O estágio curricular foi dividido em duas áreas principais. A primeira, focando a reprodução animal, foi realizada no Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada (CRAHA) em Serpa durante um período de 4 meses que se iniciou a 1 de Setembro de 2017 e terminou a 31 de Dezembro de 2017

A segunda parte do estágio curricular foi realizada com o Dr. Rui Silva, Médico veterinário na empresa Vettotal - Serviços Veterinário Lda., em São Teotónio, Odemira, focando a clínica veterinária de espécies pecuárias em serviço ambulatorio durante um período de 2 meses que se iniciou a 1 de Janeiro de 2018 e terminou a 28 de Fevereiro de 2018.

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

O CRAHA está integrado no Centro de Experimentação do Baixo Alentejo (CEBA) na Herdade da Abóbada, em Vila Nova de São Bento. O CEBA Conta com uma área de aproximadamente 1500 hectares em sistema de produção extensivo. Possui uma capacidade máxima de 610 Cabeças Normais (CN) de bovinos, 180 CN de ovinos, 50 CN caprinos e 50 CN de suínos.

Atualmente existem na herdade caprinos de raça Serpentina, ovinos de raça Merina Branca, Merina Preta e Campaniça, bovinos de raça Mertolenga, Garvonesa, bovinos em cruzamento Charolês com Limousine e suínos de raça Alentejana.

O CRAHA, aí implementado, destina-se a funcionar como pólo do Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA), centro de colheita e processamento de sémen de pequenos ruminantes, recolha de embriões de pequenos ruminantes e armazenamento de produtos germinais. O CRAHA tem como objetivo, a promoção da utilização responsável dos recursos genéticos autóctones.

O estágio no CRAHA, incluiu as tarefas de manejo e sanidade habituais da herdade, e integrou um projeto de conservação de raças autóctones ovinas, caprinas e bovinas que incluiu as seguintes raças:

Ovinos: raças Merina Branca, Merina Preta, Churra do Minho, Bordaleira de Entre o Douro e Minho e Campaniça.

Caprinos: raça Serpentina.

Bovinos: raças Mertolenga e Alentejana

Relativamente aos ovinos, foram selecionados machos da herdade e de produtores independentes do CEBA para formar um núcleo de animais em raça pura produtores de sémen para o BPGA. A seleção de animais foi feita em colaboração com a Associação Nacional de Criadores de Ovinos de Raça Merina (ANCORME) e Associação de Criadores de Bovinos de Raça Barrosã (AMIBA). Os animais selecionados foram adjudicados ao CRAHA como produtores de sémen para integrar o BPGA.

Todos os carneiros foram treinados a servir uma ovelha manequim para facilitar as recolhas de sémen com vagina artificial e garantir o bem-estar animal. Os carneiros que não tiveram sucesso nas sessões de treino foram submetidos à Electro-Ejaculação (E.E.).

Durante os 4 meses de estágio no CRAHA foi possível aprender todas as tarefas inerentes ao CRAHA, tais como:

- Testes de pré-movimentação de animais,
- Exames andrológicos;

- Treino de carneiros;
- Procedimento de avaliação e processamento de sémen destinado a criopreservação ou refrigeração;
- Técnica de aplicação de sémen por inseminação artificial (I.A.) cervical e intrauterina por laparoscopia;
- Protocolos de sincronização de cios,
- Ecografia reprodutiva em ovinos e caprinos.

Em colaboração com a Universidade de Évora, a Associação de Criadores de Bovinos Mertolengos (ACBM) e a Associação de Criadores de Bovinos da Raça Alentejana (ACBRA), foi possível acompanhar os testes de performance de animais candidatos a reprodutores, várias sessões de exame andrológico e de inseminação artificial.

Relativamente ao efetivo do CEBA, foi possível acompanhar o veterinário da herdade em atividades como:

- Vacinação,
- Desparasitação,
- Pré-movimentação de animais,
- Resolução de alguns casos clínicos.

A Tabela 1 representa o número aproximado de intervenções por espécie animal durante o período de estágio no CRAHA.

Estágio curricular no Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada					
Intervenção por Categoria	Procedimento	Espécie			
		Bovinos	Ovinos	Caprinos	Suínos
Maneio	Identificação de animais	40	300	200	30
	Pesagem de animais	100	300	200	
Sanidade Animal	Vacinação	90	450	160	
	Desparasitação	90	450	160	
	Colheitas Sangue	90	450	50	30
Clínica	Exames Físicos		40	10	
	Aparelho Gastrointestinal		15		
	Aparelho Respiratório		5		
	Doença Metabólica	5	5		
Cirurgia	Orquiectomia		1		30
	Ovariectomia				30
Reprodução	Diagnóstico Gestação	50	520	60	
	Sincronização de Cios	30	120		
	Inseminação Artificial	30	200		
	Inseminação Artificial Laparoscópica		30		
	Exame Andrológico	40	20	2	
	Colheita / Processamento de sémen	40	220	5	
Necropsias			12	5	
Nº Total de intervenções		461	2548	452	90

Tabela 1 Casuística do estágio Curricular no Centro de Reprodução Animal Da Herdade da Abóbada. Número aproximado de intervenções por espécie animal.

2. Vetttotal, Serviços Veterinários Lda.

A Vetttotal é uma empresa sediada em São Teotónio, Odemira, dedicada à prestação de serviços veterinários ambulatoriais. A área de intervenção é maioritariamente a clínica de bovinos abrangendo parte das explorações da região litoral do sudoeste alentejano. Para além disso, também presta assistência a equinos, ovinos, caprinos e suínos. A clínica de bovinos é a mais representativa na prática laboral da empresa.

O estágio teve a duração aproximada de 2 meses com início a 3 de janeiro e término a 28 de Fevereiro.

A Tabela 2 representa o número aproximado de intervenções por espécie animal durante o estágio na Vetttotal.

Estágio Curricular na Vetttotal						
Intervenção por Categoria	Procedimento	Espécie				
		Bovinos	Ovinos	Caprinos	Suínos	Equinos
Sanidade Animal	Vacinação	900	200		30	
	Desparasitação	900	200		10	
	Colheitas Sangue	900	500	50	30	
Clínica	Exames Físicos	250	10	1	5	4
	Aparelho Gastrointestinal	90				4
	Aparelho Respiratório	30				
	Doença Metabólica	30	5			
Cirurgia	Cesariana	10	1			
	Podologia	5				
	Prolapsos Uterinos	4				
	Orquiectomia					1
Reprodução	Diagnóstico Gestação	300				
	Sincronização de Cio	20				
	Inseminação Artificial	20				
	Exame Andrológico	4				
	Partos	40	1			
Necropsias		5				
Nº Total de intervenções		3508	4425	51	75	9

Tabela 2 Casuística do estágio Curricular na Vetttotal. Número aproximado de intervenções por espécie animal.

II. Revisão bibliográfica

1. Introdução

Apesar da sua reduzida área territorial (92.200 km²), Portugal dispõe de uma enorme variedade de condições de solos, clima, relevo e estrutura fundiária que, entre outros fatores, contribuíram para uma elevada diversidade de condições agroambientais. Estas características muito peculiares das várias regiões do país, conjuntamente com as suas tradições geoculturais e atividades agro-pastoris, contribuíram para a enorme diversidade e riqueza de recursos genéticos animais que existem em Portugal.

Atualmente estão reconhecidas oficialmente 50 raças autóctones:

- 15 raças de bovinos;
- 16 de ovinos;
- 6 de caprinos;
- 3 de suínos;
- 4 de equídeos;
- 2 asininas e
- 4 de aves.

Cada uma destas raças está integrada em peculiares sistemas de produção e de comercialização que, por sua vez, integram as condições agroambientais das regiões onde são exploradas.

Nas últimas décadas, com a intensificação da agricultura, o desenvolvimento da mecanização agrícola, a introdução de espécies exóticas e o aumento das exigências do mercado, houve um declínio na biodiversidade genética nacional. (Mara et al. 2013; Myers et al. 2000) Atualmente, grande parte das raças autóctones estão em risco de extinção, o que confere uma responsabilidade acrescida de assegurar a sua conservação a longo prazo. Neste sentido, importa promover a preservação das raças pelos criadores, associações e desenvolver programas de conservação de germoplasma que permitam a salvaguarda do património genético ameaçado.

O objetivo da conservação é manter a variabilidade genética entre indivíduos de uma população mantendo as suas características de interesse como genes e combinações genéticas potencialmente importantes. A manutenção da diversidade genética permite assegurar a resistência das raças face a alterações climáticas, doenças, alterações na disponibilidade de alimento, erros de seleção genética, catástrofes imprevisíveis ou calamidades. (Mara et al. 2013; Skuterud et al. 2005) Para

este propósito são utilizadas duas modalidades de conservação de recursos genéticos, “in-situ” e “ex-situ”.

1.1. Conservação “*in-situ*”

A conservação “in-situ” consiste na salvaguarda dos recursos genéticos vivos no seu ambiente natural promovendo a manutenção das suas características e traços evolutivos, e fornecendo condições ambientais para que as espécies possam melhorar ou manter as suas características. (Holt and Pickard 1999; Mara et al. 2013)

1.2. Conservação “*ex-situ*”

Existem duas modalidades de conservação “ex-situ”; “ex-situ in-vivo” e “ex-situ in-vitro”

A conservação “ex-situ, in-vivo” consiste na salvaguarda de recursos genéticos vivos fora do seu ambiente normal ou área geográfica de referência em parques zoológicos, ou centros especializados para o efeito mantendo os princípios da conservação “in-situ”.(Mara et al. 2013)

A conservação “ex-situ in-vitro” é a preservação de material germinal criopreservado (sémen, embriões, oócitos). (Mara et al. 2013)

Idealmente as populações devem ser conservadas sob forma de animais vivos. No entanto, a criopreservação de material germinal fornece algumas vantagens relativamente à conservação in vivo:

A manutenção do material criopreservado é mais económica a longo prazo do que a manutenção de animais vivos.

A viabilidade do material criopreservado é temporalmente indefinida. O material criopreservado pode ser usado muitos anos mais tarde, mesmo após a morte do animal. (Andrabi and Maxwell 2007)

1.3. Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, Herdade da Abóbada

O Centro de experimentação do Baixo Alentejo (CEBA) integra um projeto de conservação de espécies pecuárias de algumas raças autóctones portuguesas. “In-situ” ao manter a exploração das raças em linha pura; promovendo a utilização responsável dos recursos genéticos e comercializando alguns produtos tradicionais internacionalmente reconhecidos. “Ex-situ” ao manter material germinal criopreservado (Sémen e Embriões), que integra o Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA).

2. Criopreservação

A criopreservação de germoplasma animal tornou-se possível desde década de 50 com a conservação de sémen de bovino. (Amstislavskii and Trukshin 2010) Com o passar dos anos as técnicas foram melhorando e permitiram a criopreservação de sémen de outras espécies e de uma variedade de tecidos, tais como, embriões, oócitos, células sanguíneas, fibroblastos e células estaminais. Relativamente às espécies pecuárias, estas técnicas têm sido pouco utilizadas face ao potencial que oferecem. (Mara et al. 2013)

Hoje em dia, a manutenção de sémen criopreservado em bancos de germoplasma, aliada à inseminação artificial é uma das tecnologias reprodutivas mais importantes na reprodução de espécies pecuárias. (Smith, Geisert, and Parrish 2018) Estas tecnologias são igualmente importantes no melhoramento genético e produtivo dos rebanhos e na conservação de espécies ameaçadas.

Uma das principais vantagens do estabelecimento de bancos de germoplasma é a possibilidade de utilizar o material criopreservado para apoiar a conservação de espécies “in-vivo”. Por outro lado, a utilização de material germinal permite recriar espécies extintas, ou reorientar a evolução de populações em caso de calamidade. A combinação da conservação de animais vivos com a utilização de material criopreservado é uma ferramenta poderosa na conservação de espécies. (Mara et al. 2013)

Na constituição de um banco de germoplasma animal devem ser selecionados animais portadores de características raras e consideradas geneticamente importantes para a preservação de uma determinada raça. Os animais selecionados devem representar um pedigree ou linhagem genética que importe preservar. (Mara et al. 2013) Em populações pequenas ou raças em risco de extinção devem ser selecionados o maior número de animais possível.

Um banco de germoplasma é também uma fonte primária de material de interesse científico para genotipagem de animais, estudos de pedigree e de desenvolvimento genético. (Mara et al. 2013). Importa salientar que por motivos de segurança, um banco de germoplasma deve ser armazenado em pelo menos dois locais distintos. (Mara et al. 2013) O material germinal criopreservado deve ser igualmente distribuído pelos locais de armazenamento para que não seja totalmente perdido em caso de acidente.



Figura 1: Contentores de armazenamento de sémen do Banco Português de Germoplasma Animal. Centro de Reprodução animal da Herdade da Abóbada. Fotografia cedida pelo autor 2017

3. Inseminação artificial em ovinos

A inseminação artificial (IA) é uma técnica reprodutiva poderosa quanto ao aumento da performance reprodutiva e melhoramento genético dos rebanhos. (Smith, Geisert, and Parrish 2018). Esta técnica permite:

- Aumentar e acelerar o melhoramento genético dos rebanhos ao permitir aplicar uma pressão seletiva maior sobre os carneiros;
- Aumentar a descendência de carneiros com características superiores;
- Disponibilizar sémen de carneiros com características superiores em rebanhos pequenos;
- Transportar sémen fresco e congelado, sem necessidade de movimentar animais e com pouco risco sanitário associado. O transporte de sémen não compromete o bem-estar animal implicado nas movimentações de animais. O sémen congelado pode ser transportado internacionalmente;
- Controlar doenças como a Brucelose e *Border Disease* por testagem dos carneiros dadores de sémen. O Tratamento do sémen com antibióticos reduz a transmissão de doenças (ex. *Actinobacillus seminis*);
- Obter descendência de carneiros mortos, ou com alterações físicas incompatíveis com a reprodução. (Gourley and Riese 1990; Hopper 2015; Maxwell and Evans 1987; Youngquist and Threlfall 2007)

Foram desenvolvidas várias modalidades de inseminação artificial em ovinos com taxas de sucesso diferentes. Hoje em dia aceitam-se dois métodos de inseminação artificial convencionais:

- Inseminação cervical com sémen refrigerado,
- Inseminação intrauterina por laparoscopia com sémen descongelado.

A IA aumenta rapidamente a descendência de animais com mérito genético, pois permite inseminar um número de fêmeas muito superior ao expectável por cobertura natural. Um único ejaculado pode produzir dezenas de doses para inseminação artificial (Anexo IV Tabela 23).

Apesar de a IA permitir melhorar rapidamente a genética dos rebanhos. Se a seleção for mal feita ou o sémen não for controlado, pode introduz doenças reprodutivas e defeitos genéticos com igual rapidez. (Kershaw et al. 2005) Por este motivo, deve haver vigilância ativa sobre os carneiros dadores de sémen. (Gourley and Riese 1990)

3.1. Inseminação Artificial Cervical

A inseminação artificial cervical com sémen refrigerado permite índices de fertilidade aceitáveis (40-60%). (Anel et al. 2005, 2006; King et al. 2004; Masoudi et al. 2016).

Existem alguns problemas relacionados com a utilização de sémen refrigerado como o tempo curto que os espermatozoides permanecem viáveis fora do trato genital do macho e/ou fêmea (Tabela 4). Por outro lado, a disponibilidade geográfica de carneiros com características superiores; potenciais dadores de sémen para refrigeração é reduzida e as condições estritas de transporte do sémen limitam a utilização deste método a locais de colheita e aplicação próximos. (Masoudi et al. 2016)

A inseminação com sémen descongelado trás uma enorme vantagem relativamente à inseminação com sémen refrigerado, uma vez que o intervalo de tempo entre a colheita e a aplicação do sémen é “infinito”. (Masoudi et al. 2016). No entanto, a inseminação artificial cervical com sémen descongelado tem índices de fertilidade muito baixos (10-20%); não aceites pela comunidade Veterinária internacional. (Paulenz, Adnoy, and Soderquist 2007; Salamon and Maxwell 2000) A fraca viabilidade do sémen após descongelação e a estrutura anatómica do cérvix ovino são os principais obstáculos à técnica de inseminação convencional. (inseminação artificial cervical)

Nas últimas décadas, a criopreservação de sémen de raças ovinas teve o seu desenvolvimento interrompido devido aos baixos índices de fertilidade da inseminação cervical com sémen descongelado. Atualmente, permanece a necessidade de melhorar a eficiência da utilização de sémen criopreservado. Este melhoramento envolve o aumento da qualidade do sémen após a descongelação e está, em parte, focada na modificação dos extensores de sémen. (Alcay, Toker, et al. 2015)

3.2. Inseminação Artificial Intrauterina por Laparoscopia

A inseminação artificial intrauterina por laparoscopia foi desenvolvida para superar o fraco sucesso da inseminação artificial cervical com sémen descongelado e tornar a aplicação de sémen pouco invasiva. Até então, a inseminação intrauterina era feita por laparotomia.

Esta técnica de inseminação permite índices de fertilidade médios (20-40%), raramente excedendo os 40%. (King et al. 2004).

A inseminação laparoscópica permitiu aumentar dramaticamente o potencial de melhoramento genético dos rebanhos por utilizar sémen descongelado. Este, pode ser transportado a longas distâncias sem que a duração da viagem ou do armazenamento condicione a fertilidade. (Gourley and Riese 1990). A aplicação intrauterina de sémen fresco por laparoscopia não tem melhores resultados que a inseminação cervical com sémen fresco (Paulenz, Adnoy, and Soderquist 2007). Por este motivo e por ser um procedimento caro e invasivo, não se considera a aplicação laparoscópica de sémen fresco viável. (Masoudi et al. 2016) Assume-se que a inseminação artificial por laparoscopia, utiliza sempre sémen descongelado. (Paulenz, Adnoy, and Soderquist 2007)

A Laparoscopia requer a utilização e manutenção de equipamentos cirúrgicos caros e mão-de-obra especializada. Assim sendo, não é uma realidade facilmente acessível a todos os produtores de ovinos. (Gourley and Riese 1990; King et al. 2004; Paulenz et al. 2004)

A IA com sémen descongelado torna possível a reprodução de ovinos contra estação ao permitir superar a libido e o efeito sazonal na produção espermática dos carneiros. Relativamente à utilização de sémen descongelado, a inseminação artificial trans-cervical permite obter melhores resultados que a inseminação vaginal ou cervical. No entanto são substancialmente inferiores aos resultados obtidos pela IA intrauterina por laparoscopia. (Masoudi et al. 2016)

3.3. Propriedades do Cérvix Ovino

O cérvix ovino é um órgão tubular fibroso longo com um comprimento de 5,7 a 10 cm. (Abusineina 1969; Halbert et al. 1990) O seu lúmen é estreito e tortuoso (Naqvi et al. 2005) devido à presença de 4 a 7 anéis cervicais orientados caudalmente formando uma barreira física aos contaminantes ambientais externos. (Kershaw et al. 2005) Estes anéis impossibilitam a inseminação artificial uterina em ovinos uma vez que se projetam no lúmen do cérvix. (King et al. 2004) O segundo e o terceiro anel estão desalinhados com o primeiro, (Kaabi et al. 2006) dificultando a passagem da pipeta de inseminação uma vez que a desviam do lúmen central. Para além disso, a porção inicial do cérvix é a mais estreita. (Kershaw et al. 2005)

A abertura vaginal do cérvix é altamente variável entre indivíduos. Em alguns animais a entrada do cérvix projeta-se no lúmen da vagina. Pode ter ou não pregas de tecido fibroso a cobrir a sua entrada. Em alguns casos as pregas tapam completamente a entrada do cérvix.

As características anatómicas do cérvix são influenciadas pela raça, idade, número de partos, estado fisiológico e fase do ciclo éstrico. São altamente variáveis entre animais, especialmente em ovelhas velhas. (Kershaw et al. 2005)

O momento ideal da inseminação coincide com a fase do ciclo éstrico em que ocorre o pico de LH. Neste momento, as concentrações de estradiol e a dilatação cervical são máximas. Por vezes é possível atravessar o cérvix com a pipeta de inseminação em aproximadamente 50 a 60 % do seu comprimento total. Apenas se consegue atravessar o cérvix naturalmente em aproximadamente 2% das ovelhas. (Eppleston et al. 1994; King et al. 2004)

A dilatação cervical ocorre 54 a 56 horas após a remoção das esponjas de progestagénio utilizadas nos protocolos de manipulação do cio. (Falchi et al. 2012)

A inseminação fora desta janela temporal, raramente permite a introdução da pipeta de inseminação mais do que 1 cm dentro do canal cervical. (Kershaw et al. 2005) A utilização de pipetas de inseminação modificadas permite a deposição de sémen mais profundamente mas aumenta significativamente a probabilidade de lesionar os tecidos pélvicos em fêmeas que não tenham feito uma dilatação cervical suficiente.

3.4. Administração de Oxitocina

Segundo alguns autores, a administração de 100 UI de Oxitocina, 20 minutos antes da inseminação favorece a dilatação cervical, permitindo por vezes a aplicação de sémen pós-cervical. (King et al. 2004; Wulster-Radcliffe, Costine, and Lewis 1999) A dilatação cervical poderá ser vantajosa uma vez que permite reduzir a incidência de lesões cervicais durante a inseminação e aumenta a constrição uterina sem efeitos prejudiciais na migração dos espermatozóides nos cornos uterinos. (Masoudi et al. 2016; Sayre and Lewis 1997) segundo alguns autores, a ocorrência de traumas cervicais é frequentes e o valor da administração de oxitocina depende do efeito da mesma sobre a fertilidade. Aparentemente melhora o índice de fertilidade ao permite a aplicação de sémen mais próximo dos cornos uterinos, no entanto a manipulação do cérvix pode prejudicar a fertilidade. (King et al. 2004) A relação Risco-Benefício da utilização de oxitocina antes da inseminação artificial é controversa.

4. Exame Andrológico

A performance reprodutiva de carneiros é essencial na rentabilidade dos sistemas de produção de ovinos. Neste sentido, os machos devem ser avaliados relativamente à capacidade de detetar fêmeas em cio, servi-las e de fertilizá-las. Na verdade, aproximadamente 50% do potencial reprodutivo de um rebanho é influenciado pelo carneiro. (Mozo et al. 2015) O mesmo acontece com o melhoramento genético a curto prazo dos rebanhos que é conseguido maioritariamente pelo carneiro. (Youngquist and Threlfall 2007)

Um carneiro altamente fértil aumenta o número de borregos nascidos ao emprenhar mais fêmeas e produzir maior número de gestações com múltiplos fetos. (Youngquist and Threlfall 2007)

A utilização de carneiros avaliados antes do início da época reprodutiva, aumenta em 5% o índice de fertilidade dos rebanhos. O mesmo não acontece se for colocado um número maior de machos no rebanho. (Schrag and Larson 2016) Esta prática poderá ter um efeito negativo sobre a fertilidade se o macho dominante for infértil ou subfértil, e impedir que outros machos férteis sirvam as fêmeas.

O exame Andrológico deve incluir:

- A avaliação anatómica e estrutural do animal;
- Um exame físico e de estado geral suficientemente detalhado que permita identificar patologias ou condições incompatíveis com a prática reprodutiva.

Este exame deve considerar pormenorizadamente o aparelho reprodutivo, e características como a libido, a condição corporal, e a circunferência escrotal. Devem também ser rastreadas doenças venéreas e/ou infectocontagiosas e a avaliação laboratorial da qualidade do sémen. (Mozo et al. 2015; Ott and Memon 1980; Youngquist and Threlfall 2007)

Os animais candidatos a reprodutores devem ser avaliados pelo menos 60 dias antes do início da época reprodutiva, para permitir a recuperação nos casos de doença ou de fraca condição física. Nos casos de doença em que a espermatogénese possa estar comprometida, este período de tempo é necessário para a normalização da produção e maturação espermática. (Mozo et al. 2015)

O objetivo de um exame andrológico não é distinguir melhores ou piores reprodutores, mas sim determinar se os machos são capazes de satisfazer os objetivos reprodutivos em situação de rebanho. A sociedade de Teriogenologia define um potencial reprodutor como um animal capaz de produzir taxas de conceção altas num grupo de fêmeas saudáveis, livres de doença. (Ley, Sprecher, Lessard, et al. 1990; Ott and Memon 1980)

A classificação obtida em exame andrológico deve ser inequívoca e tão simples como “Apto para reprodução”, “Questionável” ou “Não apto para reprodução”.

Os animais que obtenham classificação “Questionável” devem ser reavaliados num período de 60 dias. A classificação “Não apto para reprodução” inclui todos os animais inférteis ou subfêteis e todos aqueles que apresentem condições ou alterações hereditárias incompatíveis com a reprodução. São exemplos, lesões articulares permanentes, criptorquismo e prognatismo. (Ley, Sprecher, Thatcher, et al. 1990)

4.1. Exame Físico e de Estado Geral

O exame físico de estado geral inclui uma avaliação da condição geral de saúde do animal com especial consideração do aparelho reprodutivo. Devem ser identificadas todas as condições que alterem a performance reprodutiva do carneiro ou que sejam transmissíveis ao resto do rebanho (ex. Peeira; Postite Ulcerativa).

4.2. Condição corporal

Para que um animal tenha uma performance reprodutiva aceitável necessita de ter boa condição corporal (CC). É espectável que a CC diminua durante a época reprodutiva pelo que é desejável que hajam algumas reservas corporais no início da época. (Ott and Memon 1980) Idealmente a CC deve oscilar entre os 2,5 e os 3,5. Esta deve ser avaliada na região lombar, com base nas premissas descritas no Anexo I, Tabela nº 18

4.3. Avaliação anatômica e estrutural

A avaliação anatômica e estrutural determina a capacidade de um animal permanecer apto durante a época reprodutiva quando exposto aos fatores de stress normais. Devem avaliar-se os aprumos, membros e dentição. (Youngquist and Threlfall 2007)

4.4. Aprumos e membros

Animais com deficiências de aprumos, doenças ou alterações articulares especialmente nos membros traseiros terão maior dificuldade em servir as fêmeas. (Schrag and Larson 2016) Por outro lado se a capacidade de locomoção estiver

comprometida, haverá dificuldade na busca de alimento e na procura de fêmeas em cio. Doenças como artrites, peeira, laminítes, abscessos ou simplesmente o sobre-crescimento dos cascos produzem alterações importantes na locomoção dos animais. Assim sendo, é importante avaliar a integridade dos cascos e fazer as correções ou tratamentos necessários antes do início da época reprodutiva. (Ott and Memon 1980)

4.5. Dentição

Animais com a dentição incompleta poderão ter dificuldade de se alimentar corretamente, e sofrer oscilações significativas na sua performance reprodutiva. A falta de dentes deve ser avaliada considerando a CC no animal no momento do exame andrológico e a evolução da mesma durante o período reprodutivo. A dentição incompleta não é problemática se o animal conseguir manter a CC e a circunferência escrotal. (Mozo et al. 2015)

4.6. Visão

A visão é essencial para que os carneiros possam detetar as fêmeas em cio. É difícil prever de que maneira estará afetada, e qual a evolução das lesões. Para se determinar um animal apto para reprodução, não podem haver barreiras que o impeçam de detetar as fêmeas em cio. Todas as lesões visuais devem ser assinaladas no relatório de exame andrológico, independentemente de como o animal seja classificado. (Schrag and Larson 2016) A observação da marcha dos carneiros e o teste de reflexo de ameaça permitem inferir sob a sua acuidade visual.

4.7. Líbido

A líbido é o instinto do carneiro para servir as fêmeas. A sua avaliação deverá ser sempre incluída no exame andrológico. No entanto, é na maior parte das vezes negligenciada por requerer a presença de uma ou várias fêmeas em cio e tempo para observação e registo do comportamento do carneiro. Esta avaliação deve ser efetuada no ambiente normal do carneiro durante a época reprodutiva sob pena de produzir resultados dúbios. Por outro lado, nem sempre é possível obter bons resultados com carneiros virgens devido à sua inexperiência sexual. (Ley, Sprecher, Lessard, et al. 1990; Schrag and Larson 2016; Youngquist and Threlfall 2007)

Os testes de capacidade de serviço ou avaliação de libido poderão ser feitos em currais fechados ou abertos na presença de uma ou várias fêmeas em cio, livres ou presas num tronco de contenção. Um ou vários carneiros são colocados com as fêmeas e observados durante um intervalo de tempo estabelecido. Este tipo de testes submete os animais a algum stress pelo que a performance real pode ser mascarada pelo comportamento do animal durante o tempo de teste. Assim, as conclusões obtidas são frequentemente controversas relativamente à fertilidade dos rebanhos. (A L Ridler, Smith, and West 2012) Pelos motivos descritos anteriormente, nem sempre se avalia a libido em situação de exame andrológico.

Estima-se que aproximadamente 10% dos carneiros não tenham interesse em cobrir as fêmeas. Estes animais devem ser identificados e afastados da reprodução. (Youngquist and Threlfall 2007)

4.8. Avaliação testicular

A avaliação testicular faz-se por palpação do escroto. O primeiro objetivo é verificar a presença de dois testículos escrotais. Os animais criptorquídios são normalmente férteis, mas devem ser excluídos da reprodução por serem potenciadores desta condição nas gerações futuras. (Ott and Memon 1980) O criptorquismo é uma condição que reprova permanentemente um animal para reprodução independentemente dos restantes resultados do exame andrológico. Os animais criptorquídios devem ser refugados.

4.9. Consistência, Textura, Mobilidade e Simetria testicular

Ao mesmo tempo que se exclui o criptorquismo, deve se avaliar o tamanho, consistência, textura, mobilidade e simetria testicular. A avaliação da consistência testicular permite identificar situações de degenerescência se estiver diminuída ou de fibrose testicular se estiver aumentada. A textura e a mobilidade dos testículos devem ser avaliadas em simultâneo. Os testículos devem ser simétricos, móveis relativamente à pele do escroto e a sua textura deve ser lisa.

A presença de focos testiculares moles é geralmente indicativa de lesão recente e de focos com textura granulosa indicam locais de fibrose testicular. (Ott and Memon 1980)

Antes da época reprodutiva, os testículos devem ter consistência túrgida. Uma consistência flácida/mole antes de o carneiro ter servido as fêmeas tem correlação alta com fraca qualidade do sémen. (Youngquist and Threlfall 2007)

4.10. Alterações Anatômicas

A palpação escrotal permite ainda identificar problemas anatômicos ou patologias como varicoceles, hérnias escrotais ou abscessos escrotais. A varicocele é uma alteração da circulação de retorno venoso com dilatação sacular e trombose da veia espermática interna. Pode ser uni ou bilateral. (Ott and Memon 1980) Os animais candidatos a reprodutores que apresentem esta condição devem ser reprovados independentemente dos restantes resultados do exame andrológico.

4.11. Epidídimo

A palpação escrotal permite avaliar o grau de desenvolvimento do epidídimo. A cabeça, corpo e cauda do epidídimo são palpáveis em carneiros normais. (Youngquist and Threlfall 2007)

Assimetrias, textura granulosa ou alteração da consistência da cauda do epidídimo são sugestivas de epididimite. A epididimite resulta no bloqueio do ducto do epidídimo pelo desenvolvimento de edema e fibrose, impossibilitando a progressão dos espermatozoides. Estas alterações comprometem a fertilidade se forem unilaterais e podem causar aspermia e infertilidade se forem bilaterais. (Ott and Memon 1980; Youngquist and Threlfall 2007) A infeção por *Brucella ovis* é a causa mais comum de epididimite em carneiros. (Anne L. Ridler and West 2011)

4.12. Circunferência escrotal

A medida da circunferência escrotal (CE) é um parâmetro utilizado na avaliação da performance reprodutiva de carneiros, uma vez que existe uma correlação forte entre a produção espermática e o peso testicular. Esta correlação é facilmente medida através da determinação do perímetro escrotal. Circunferências escrotais grandes estão associadas a maior massa testicular, maior volume de ejaculado e melhor motilidade espermática. (Ott and Memon 1980; A L Ridler, Smith, and West 2012)

A circunferência escrotal sofre variações grandes ao longo do ano, sobretudo em espécies com sazonalidade marcada. Estão descritas variações de volume testicular

na ordem dos 30% entre a Primavera e o Outono. (A L Ridler, Smith, and West 2012) É necessário relacionar estas variações com a época do ano em que é feito o exame andrológico. As medidas de circunferência escrotal recomendadas pela Sociedade de Teriogenologia (Anexo II Tabela 21) são as expectáveis durante a época reprodutiva sazonal, antes de haver contacto com as fêmeas. (Youngquist and Threlfall 2007)



Figura 2 medição da circunferência escrotal de um carneiro Merino Preto. Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abobada. Fotografia cedida pelo autor 2017

A idade dos animais influencia a medida da circunferência escrotal, por este motivo, é importante conhecer a idade precisa, sobretudo em animais jovens, para poder incluí-los nas duas faixas etárias definidas pela Sociedade Internacional de Teriogenologia (Anexo II; Tabela 21).

Pelos motivos apresentados anteriormente, a classificação de animais baseada apenas na circunferência escrotal é controversa. (A L Ridler, Smith, and West 2012) Esta medida deve ser considerada uma característica indicativa da qualidade do animal adicional aos restantes parâmetros do exame andrológico. Nenhum animal deve ser classificado apenas com base na circunferência escrotal.

Raças ovinas de pequeno porte apresentam circunferências escrotais inferiores às medidas propostas pela Sociedade Internacional de Teriogenologia. As raças Bordaleira entre o Douro e Minho e Churra do Minho apresentam circunferência escrotal média de 28,5 cm e 24,7 cm respetivamente, para animais com idade superior a 12 meses. (Bettencourt, Romão, E., H., M., and Silva 2018; Bettencourt, Romão, E., H., M., N., et al. 2018)

4.13. Prepúcio e pénis

O prepúcio deve ser avaliado para condições como fimose, parafimose e lesões ulcerativas que causem exposição da mucosa prepucial como por exemplo a Postite Ulcerativa. (Ott and Memon 1980; Youngquist and Threlfall 2007) A existência de lesões exsudativas compromete a qualidade do sêmen.

O pênis deve ser examinado na fase de exteriorização da Electro-Ejaculação. Para uma visualização mais cuidada, pode ser manualmente estendido. O processo uretral estende-se cranialmente à glândula por aproximadamente 4-5 cm. A sua função é espalhar o sêmen a volta do cérvix durante a cópula. O lúmen do processo uretral tem um diâmetro muito pequeno pelo que é um dos primeiros locais de obstrução em caso de urolitíase. (Ott and Memon 1980; Youngquist and Threlfall 2007).

Se não for possível exteriorizar o pênis, deve se considerar a ocorrência de lesões anteriores que tenham produzido aderências. (Youngquist and Threlfall 2007)

5. Doenças associadas à reprodução de ovinos

5.1. Postite Ulcerativa

A Postite Ulcerativa é uma doença multifatorial que envolve as bactérias *Corynebacterium renale*, *Corynebacterium pilosum* ou *Corynebacterium cystitidis*. Estas bactérias são comensais da flora prepucial dos carneiros e dependem de fatores ambientais como o tipo de alimentação. Dietas ricas em proteína favorecem a alcalinização da urina com níveis de ureia anormalmente elevados. *C. renale* tem a capacidade de produzir urease para degradar a ureia, com formação de amónia. A acumulação de amónia na lã e pele do prepúcio provoca uma dermatite ulcerativa. Por contiguidade de tecidos, as lesões progridem para a mucosa da cavidade prepucial. Os detritos das úlceras formam crostas que podem bloquear a abertura do prepúcio quando as lesões são severas. (Loste et al. 2005)

5.2. Epididimite Contagiosa Ovina

A Epididimite Contagiosa Ovina é uma causa importante na redução da fertilidade dos rebanhos. Os dois microrganismos mais frequentemente associados a esta patologia são *Brucella ovis* e *Actinobacillus seminis*. No entanto, também já foram identificados outros microrganismos como *Histophilus ovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

A Transmissão destes agentes é venérea ou por atividade homossexual entre carneiros. No caso de *A. seminis* importa salientar a transmissão vertical da ovelha para o borrego. (Burgess 1982)

Estes microrganismos infetam cronicamente o epidídimo dos carneiros, resultando na formação de granulomas espermáticos responsáveis pela diminuição da fertilidade dos animais. (Burgess 1982)

5.3. *Brucella ovis*

A *Brucella Ovis* (*B. ovis*) causa uma doença única em ovinos que compromete a fertilidade dos rebanhos. Esta bactéria tem tropismo para o trato genital e é a causa mais importante de infertilidade em carneiros. (Anne L. Ridler and West 2011) A Brucelose é uma doença contagiosa e progressiva causadora de epididimites e orquites responsáveis pela alteração da qualidade do sêmen. A longo prazo resulta em atrofia testicular e aspermia. (Olsen and Palmer 2014) Os efeitos de *B. ovis* são particularmente importantes nos carneiros.

A infecção é introduzida nos rebanhos pela compra de animais novos infetados ou pela existência de carneiros num rebanho que contactem ou tenham contactado com animais de outros rebanhos infetados. *B. ovis* é particularmente importante nos sistemas de produção em que há movimentação de carneiros entre explorações. (Anne L. Ridler and West 2011)

Raramente se deteta a fase aguda da doença pelo que normalmente a primeira manifestação clínica da brucelose é a deterioração da qualidade do sêmen com presença de células inflamatórias e bactérias no ejaculado. As lesões primárias da brucelose são epididimites uni ou bilaterais, sendo os carneiros bilateralmente afetados normalmente estéreis. As lesões de brucelose podem não ser óbvias, levando a que animais aparentemente normais sejam apenas identificados quando começam a existir problemas de fertilidade no rebanho. *B. ovis* pode estar presente no sêmen de carneiros infetados mesmo sem sinais de epididimite. (Olsen and Palmer 2014) Apenas 35% dos carneiros infetados desenvolvem sinais clínicos facilmente detetáveis. (Anne L. Ridler and West 2011)

A transmissão ocorre entre macho e fêmea pelo contacto sexual. Ocorre ainda entre machos que sirvam a mesma fêmea durante o mesmo ciclo éstrico ou época reprodutiva se o primeiro macho estiver infetado. Pode também ser transmitida entre machos por comportamento homossexual. (Olsen and Palmer 2014) Quando infetados, a maioria dos carneiros produz sêmen contaminado por longos períodos de tempo (em média, 2 a 4 anos). (Anne L. Ridler and West 2011) Durante este período a *B. ovis* é libertada no sêmen de modo intermitente. (Aiello and Moses 2016)

As fêmeas têm um papel importante na transmissão de *B. ovis* entre carneiros que sirvam a mesma ovelha. No entanto, são consideradas pouco importantes na epidemiologia da doença. (Anne L. Ridler and West 2011) Os efeitos de *B. ovis* sobre as fêmeas são pouco importantes quando comparado com os machos. *B. ovis* causa ocasionalmente placentite severa, abortos e aumento da mortalidade perinatal. (Olsen and Palmer 2014; Picard-Hagen et al. 2015; Anne L. Ridler and West 2011)

A progressão da doença é lenta. O microrganismo pode persistir na membrana mucosa do prepúcio por longos períodos de tempo (1 a 2 meses). (Olsen and Palmer 2014) A fase aguda da doença dura em média 2 a 5 semanas e é normalmente tão suave que não chega a ser detetada especialmente se ocorrer durante a época reprodutiva. Durante a fase aguda, o/os testículo(s) afetado(s), especialmente o epidídimo, torna-se edematoso, hipertérmico e com consistência mole. Existe acumulação de exsudado serofibrinoso entre as túnicas parietal e visceral do testículo. Estas alterações podem ser detetadas à palpação testicular, mas nem todos os animais demonstram alterações palpáveis. A infeção crónica manifesta-se normalmente na cauda do epidídimo que toma uma consistência firme e um tamanho aumentado relativamente ao epidídimo normal. (Olsen and Palmer 2014)

Microscopicamente, as lesões primárias de *B. ovis* localizam-se na cauda do epidídimo e caracterizam-se por hiperplasia do epitélio do epidídimo com degeneração hidrópica e formação de quistos intra-epiteliais luminiais. A hiperplasia do epitélio e a fibrose resultantes, obstruem o ducto epididimário resultando em estase espermática. (Olsen and Palmer 2014)

Estão também descritas lesões na ampola do ducto deferente, vesículas seminais e testículos, embora estas sejam secundárias à epididimite causada por *B. ovis*. Contrariamente à Brucelose bovina, a Brucelose ovina não causa orquite primária. (Olsen and Palmer 2014; Picard-Hagen et al. 2015)

5.4. *Actinobacillus seminis*

Actinobacillus seminis é um bacilo gram- que afeta principalmente o trato reprodutivo dos machos e fêmeas. A infecção causa postite, orquite e epididimite nos machos. Nas fêmeas, causa metrite, abortos e redução do índice de fertilidade. (Negrete-Abascal et al. 2018; Pugh and Baird 2012)

O resultado clínico da infecção por *A. seminis* é variável. Desde infecção subclínica sem mais alterações que a presença de neutrófilos no ejaculado, até orquite e epididimite severa, supurativa, com formação de abscessos intra-testiculares, vacuolização de células epiteliais, fibrose intersticial e atrofia tubular, estase espermática e formação de granulomas espermáticos. Os quadros clínicos severos são acompanhados de pirexia elevada e eventualmente sépsis e morte do animal. (Burgess 1982; Gouletsou and Fthenakis 2015)

O diagnóstico definitivo de *A. seminis* é feito por cultura bacteriana e depende da capacidade de diferenciação de *B. ovis*. (Pugh and Baird 2012)

A transmissão da bactéria é mediada pelas fêmeas portadoras, por via venérea durante a cópula ou por comportamento homossexual entre machos jovens na aproximação da puberdade. (Burgess 1982)



Figura 3 Orquite / Epididimite supurativa causada por *Actinobacillus seminis* (diagnóstico presuntivo) num Carneiro Merino Preto. Fotografia cedida pelo autor 2017

5.5. Vírus da *Border Disease*

O vírus da *Border Disease* (BDV) é um Pestivirus da família *flaviviridae* onde estão incluídos os vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), da Doença das Mucosas e da Peste Suína. Raramente causa sintomatologia clínica em animais adultos. É particularmente importante por infectar borregos e cabritos “in útero”. A *Border Disease* tem transmissão horizontal e vertical. (Aiello and Moses 2016; Pugh and Baird 2012)

A transmissão horizontal ocorre pelo contacto com secreções, fluidos corporais ou tecidos de animais infectados. O BDV tem capacidade de atravessar membranas mucosas intactas. Por este motivo dissemina-se facilmente num rebanho. (Aiello and Moses 2016)

A transmissão vertical ocorre “in útero”, onde o vírus tem capacidade de atravessar a placenta. Dependendo da fase da gestação em que o embrião ou o feto se infectem, ocorre reabsorção embrionária, aborto, mumificação ou o nascimento de um neonato prematuro pouco viável. (Aiello and Moses 2016)

Os abortos são normalmente consequentes da placentite que o BDV provoca e podem ocorrer em qualquer fase da gestação. Se a gestação for mantida até ao final os neonatos nascem com pouca viabilidade e com grande parte dos seus tecidos infectados. As alterações patológicas são mais evidentes na pele, esqueleto e sistema nervoso central. (Pugh and Baird 2012)

Os animais sobreviventes, prematuros, morrem geralmente antes de serem desmamados ou pouco tempo depois. Aqueles que conseguem sobreviver têm uma diminuição gradual na sintomatologia clínica até que aos 3 a 4 meses de idade se tornam aparentemente saudáveis. Estes animais são persistentemente infectados (PI) e excretam o vírus durante toda a vida, mantendo a doença em circulação no rebanho. Os carneiros que atinjam a maturidade excretam o vírus no Sêmen. (Pugh and Baird 2012)

O reservatório principal do BDV nas explorações são os animais PI residentes ou os de substituição adquiridos. A infeção ocorre pelo contacto com secreções ou fluidos orgânicos de animais PI. A transmissão entre ovinos e bovinos é possível se forem mantidos na mesma exploração ou pastarem em conjunto. Por motivos práticos, deve assumir-se que ovinos, bovinos e caprinos são igualmente suscetíveis a BDV e BVDV uma vez que pelo menos 4 grupos filogenéticos de pestivirus foram identificados em ruminantes domésticos. (Aiello and Moses 2016; Pugh and Baird 2012)

6. Processamento do sémen

6.1. Colheita de sémen

As amostras de sémen podem ser obtidas recorrendo a uma vagina artificial (VA) ou por Electro-Ejaculação (EE). A qualidade do sémen é semelhante entre os dois métodos, no que diz respeito à motilidade, vitalidade e morfologia espermática. Há uma variação significativa na qualidade dos ejaculados de um mesmo animal se forem feitas múltiplas colheitas. (Moore 1985)

A Electro-Ejaculação tem a desvantagem de induzir stress no animal e de a libido não poder ser avaliada devido ao facto de a ejaculação ser forçada. Alguns carneiros respondem mal ao estímulo elétrico, especialmente se forem necessárias várias colheitas. As amostras obtidas por Electro-Ejaculação são mais ricas em frutose, tem um pH ligeiramente superior, tendem a ser mais volumosas e menos concentradas do que as obtidas por vagina artificial. (Moore 1985) A utilização de voltagem inadequada poderá levar a que o carneiro urine e contamine o sémen ou perca a ereção. (Youngquist and Threlfall 2007)

Importa relembrar que a qualidade do ejaculado varia com a idade, raça, época do ano, efeito da temperatura, e que existem variações individuais entre carneiros.

6.2. Avaliação laboratorial da qualidade do sémen

A avaliação do sémen só deve ser feita após se determinar que o carneiro é indemne relativamente a *B. ovis*, e não tenha sido excluído por outro motivo no exame andrológico. (Youngquist and Threlfall 2007)

Todos os procedimentos de manipulação de sémen vivo devem garantir a manutenção de uma temperatura de 37°C. A avaliação laboratorial do sémen deve ter por base seis componentes principais. A cor, o cheiro, o volume, a concentração do ejaculado (spz/ml), a motilidade dos espermatozoides (massal e individual) e a morfologia.

A cor, o cheiro e o volume de ejaculado são imediatamente avaliados após a colheita se forem utilizados materiais transparentes e graduados. Assume-se uma densidade do sémen de 1g/ml pelo que a pesagem do sémen colhido permite determinar rapidamente o volume. O ejaculado dos carneiros tem uma coloração marfim, espessa, e um volume muito pequeno (0,7 a 2 ml). A coloração amarelada, avermelhada ou acastanhada sugere contaminação com urina, sangue ou exsudado inflamatório respetivamente e por isso, estes ejaculados devem ser rejeitados.

A cor/consistência do ejaculado é indicativa da concentração (Anexo II, Tabela 20), no entanto, deve determinar-se a concentração por contagem em hemocitómetro ou por espectrofotometria, uma vez que a avaliação da cor/consistência são falíveis e dependentes da subjetividade de cada operador. Por outro lado, a preparação de doses para inseminação artificial ou criopreservação requer valores de concentração fiáveis, próximos do real.

A concentração pode ser determinada através da contagem de espermatozoides utilizando um hemocitómetro. Este é método de eleição, pois permite a contagem real do número de espermatozoides. No entanto, é um método demorado que se torna incompatível com o processamento de várias amostras de sémen em simultâneo.

Por outro lado, a espectrofotometria é um método muito rápido e preciso na determinação da concentração de sémen de ovinos, e pode se utilizada como método alternativo. (Gourley and Riese 1990).

6.2.1. Motilidade espermática

A motilidade espermática deve ser avaliada em microscópio com platina aquecida a 37°C. A avaliação da motilidade em amostras de sémen fresco não diluído compreende a avaliação da motilidade massal, individual e progressiva. Por outro lado, a avaliação da Motilidade em amostras de sémen diluídas ou descongeladas apenas compreende a avaliação da motilidade individual e progressiva.

A motilidade massal reflete o movimento dos espermatozoides em massa numa gota de sémen. Está relacionada com a concentração e vitalidade dos espermatozoides nos ejaculados. Avalia se na periferia de uma gota grosseira de sémen com uma ampliação de 40 a 200X (Hopper 2015).

A motilidade individual determina a percentagem total de espermatozoides móveis. Tem pouco interesse uma vez que considera os espermatozoides com movimento não progressivo.

A motilidade progressiva, é o parâmetro de avaliação do movimento espermático mais importante. Este, considera apenas os espermatozoides com movimento progressivo. Avalia-se entre lamina e lamela com uma ampliação de 200 a 400X (Hopper 2015) e um meio de montagem aquecido. Pode ser utilizada uma gota de Soro Fisiológico 0,9%, Lactato de Ringer, Solução Tamponada de Citrato de Sódio 2,9% ou um extensor de sémen. (Youngquist and Threlfall 2007)

A motilidade dos espermatozoides diminui drasticamente após insulto térmico ou osmótico. As alterações ocorrem facilmente, se o sémen sofrer oscilações de

temperatura em alguma das fases de processamento/manipulação ou se houver contaminação do sémen com urina, água de limpeza dos materiais mal secos ou quaisquer outros contaminantes químicos.

A avaliação da motilidade espermática deve basear-se conjuntamente na motilidade massal e individual. (Hopper 2015)

6.2.2. Motilidade progressiva

A avaliação da motilidade progressiva consiste na determinação da percentagem de espermatozoides que se movem em trajetória aproximadamente retilínea. A avaliação deste parâmetro, permite fazer uma previsão forte sobre a capacidade fertilizante de determinada amostra. (O'Connell, McClure, and Lewis 2002) Não é possível fazer esta avaliação se houverem muitos espermatozoides por campo microscópico. Assim sendo, é importante que a quantidade de sémen transferida para a gota de diluidor seja muito pequena para que se possa fazer uma estimativa precisa.

Deve esperar-se alguns segundos após a montagem da lâmina e lamela para que os espermatozoides estabilizem na preparação microscópica. Por este motivo, avalia-se primeiro a motilidade massal (Youngquist and Threlfall 2007). A percentagem estimada de espermatozoides com trajetória progressiva deve ser a média de pelo menos 5 campos microscópicos observados. Um ejaculado aceitável deverá ter pelo menos 40% de espermatozoides com motilidade progressiva. (Youngquist and Threlfall 2007)

Por vezes, ao observar a motilidade progressiva podem ser identificados leucócitos. A sua presença indica inflamação/infeção do aparelho reprodutivo. É comum encontrá-los em amostras de sémen contaminado com secreções prepuciais. Contagens elevadas de células inflamatórias sugerem infeção por *Brucella ovis* em carneiros velhos e infeção por *Actinobacillus spp.* ou *Histophilus spp.* em carneiros jovens e/ou virgens. Um carneiro com mais de 20 leucócitos por campo microscópico e sem lesões palpáveis deve ser tratado e reavaliado, exceto se for positivo a *B. ovis*. Nesse caso, deve ser refugado. (Youngquist and Threlfall 2007)

6.2.3. Motilidade massal

Comparativamente com as outras espécies pecuárias, o sémen de carneiro é muito concentrado. A observação microscópica de uma gota de sémen a uma ampliação baixa (40X) permite observar um movimento de onda vigoroso em turbilhão característico provocado pelo elevado número de espermatozoides que se movem em massa na gota de sémen. A qualidade do movimento massal depende da concentração do ejaculado. Assim sendo, é espectável que amostras pouco concentradas apresentem movimento de onda fraco. No entanto, um movimento de onda fraco não significa necessariamente que o sémen seja pouco concentrado. Se por algum motivo houver uma percentagem elevada de espermatozoides mortos, o movimento de onda será necessariamente fraco independentemente da concentração do ejaculado. (Youngquist and Threlfall 2007)

A intensidade do movimento massal é pontuada de 0 a 5, de acordo com a escala descrita no Anexo II, Tabela 19. (Maxwell and Evans 1987)

6.2.4. Morfologia e Vitalidade

A avaliação da morfologia e da vitalidade dependem da preparação de um bom esfregaço com qualidade diagnóstica. A quantidade de sémen utilizado para fazer o esfregaço deve ser muito pequena para permitir a observação de poucos espermatozoides por campo microscópico. É boa prática aproveitar a ocasião para fazer dois esfregaços da mesma amostra para o caso de um se partir, extraviar ou não ter qualidade diagnóstica. (Hopper 2015) A cauda do esfregaço é zona do esfregaço onde as células estão menos concentradas e onde se consegue fazer a melhor avaliação.

Durante anos a tinta-da-china foi o corante de eleição para análise de sémen por fornecer um fundo escuro onde as células contrastam não coradas e com aspecto translúcido. Este corante permite ver a morfologia, mas não permite diferenciar espermatozoides vivos e mortos. O corante Diff Quik cora células inflamatórias e é adequado à avaliação da morfologia espermática, mas também não permite diferenciar células vivas e mortas. Hoje em dia, a Eosina-Nigrosina é o corante recomendado em situação de campo devido à facilidade de utilização e qualidade dos resultados obtidos. A Eosina penetra apenas células mortas corando-as de rosa. As células vivas permanecem brancas, descoloradas. (Figura 4) A Nigrosina cora o fundo do esfregaço com um tom escuro que permite fazer contraste facilitando a observação das células. Nas células coradas, ou mortas, o acrossoma aparece como uma região apical da cabeça dos espermatozoides ligeiramente mais clara que o resto da cabeça. Além de

corar diferencialmente espermatozoides vivos e mortos, a Eosina-Nigrosina também permite avaliar a morfologia. No entanto, não permite corar células inflamatórias. (Hopper 2015)

A proporção de espermatozoides vivos e mortos deve ser determinada imediatamente após o esfregaço secar e devem ser observados no mínimo 100 a 200 espermatozoides por lâmina. (Hopper 2015) Inicialmente o corante penetra apenas células mortas que tenham a membrana celular lesada. No entanto, com o passar do tempo, os espermatozoides vivos vão perdendo a integridade da membrana citoplasmática e o corante gradualmente acaba por penetrar todas as células. Por este motivo, a determinação da vitalidade deve ser feita o mais rapidamente possível após a colheita de sêmen sob pena de se determinar uma % de mortalidade superior à real.

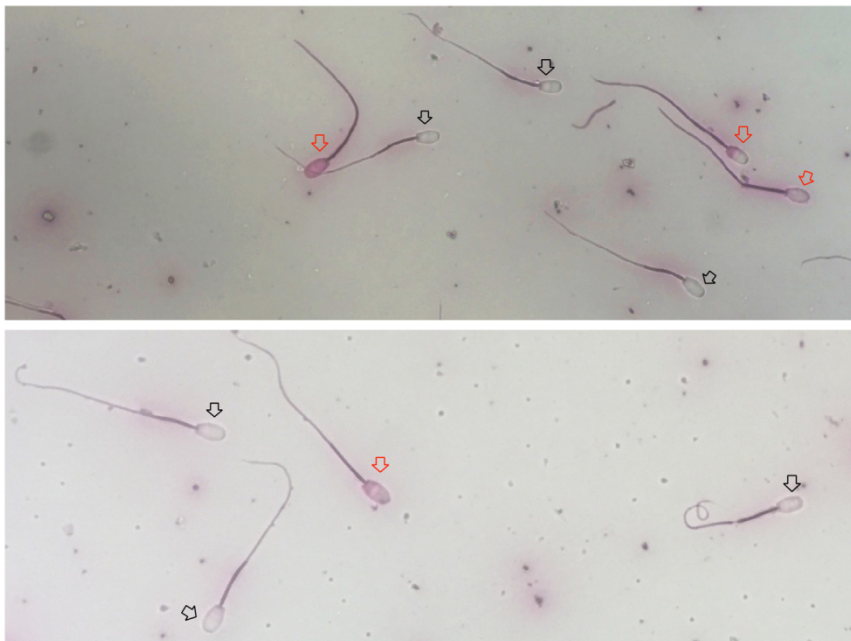


Figura 4 Avaliação da vitalidade.

Os espermatozoides vivos estão identificados com setas pretas e os espermatozoides mortos com setas vermelhas.

Microscopia do campo claro, ampliação 400X, coloração Eosina-Nigrosina.

Fotografia cedida pelo Autor 2017

6.2.5. Morfologia espermática

A avaliação da morfologia do ejaculado, consiste na determinação da percentagem de espermatozóides com alterações morfológicas. Todos os ejaculados têm alguns espermatozóides morfollogicamente anormais independentemente da espécie e raça. Quanto aos carneiros, não se considera que a fertilidade esteja comprometida até um total de 20% de formas anormais. O tipo de anomalias pode ser determinado fazendo a contagem diferencial dos espermatozóides anormais por anomalia. (Ott and Memon 1980) A avaliação da morfologia deve incluir a determinação da percentagem de espermatozoides mortos no ejaculado.

Contrariamente à avaliação da vitalidade, a morfologia não tem de ser determinada imediatamente após a realização do esfregaço. Depois do esfregaço secar os espermatozóides já não alteram a sua forma. No entanto, é vantajoso determinar rapidamente a morfologia após a colheita para que se possa ajustar a diluição do sémen e obter uma concentração de espermatozoides adequada ao objetivo pretendido.

A Determinação da morfologia é um processo demorado que exige a observação individual e atenta de pelo menos 100 a 200 espermatozóides com uma ampliação de 1000X. Numa situação em que se façam várias colheitas de sémen, não é possível incluir a avaliação da morfologia de todos os ejaculados uma vez que o sémen deve ser processado sem demoras.

6.2.5.1. Espermatozóides normais

Por vezes há alguma confusão na categorização dos espermatozóides morfollogicamente anormais. A determinação da proporção de espermatozóides normais é o objetivo mais importante do espermograma. Em ejaculados de má qualidade, o conhecimento da proporção de cada tipo de anomalia ajuda a estabelecer uma relação causal e a prever um prognóstico de recuperação do animal. (Hopper 2015; Youngquist and Threlfall 2007) Por outro lado, também permite autoavaliar o procedimento laboratorial e de colheita de sémen se forem encontradas demasiadas formas anormais consequentes do protocolo laboratorial. Por exemplo:

- Contagens elevadas de caudas enroladas poderão estar relacionada com choque osmótico,
- Contagens elevadas de caudas destacadas poderão estar relacionadas com a técnica de realização do esfregaço.

O espermatozoide normal tem um comprimento total de aproximadamente 60 μm e pode ser dividido em 2 partes principais: cabeça e cauda. A cabeça com 8-10 μm de comprimento, 4-4,5 μm de largura e 1,1,5 μm de espessura, é composta por material nuclear e pelo acrossoma (Maxwell and Evans 1987; Youngquist and Threlfall 2007). A cauda tem aproximadamente 40-45 μm de comprimento e pode ser subdividida em peça intermédia, peça principal e peça final.

As anomalias espermáticas são categorizadas de acordo com a sua localização em anomalias de cabeça, anomalias de peça intermédia ou anomalias de cauda.

6.2.5.2. Categorização de anomalias espermáticas

Para quantificar as anomalias espermáticas, foram desenvolvidos 3 sistemas de classificação:

- Primárias ou Secundárias
- Major ou Minor
- Compensáveis ou Não Compensáveis

Adicionalmente as anomalias podem ser quantificadas por defeito específico. Por vezes esta classificação não é fácil, uma vez que, existem pelos menos 15 defeitos espermáticos reconhecidos.

A classificação “Primária ou Secundária” categoriza as anomalias consoante a origem do defeito. As “Primárias” com origem testicular associadas à espermatogénese, envolvem normalmente a cabeça e a peça intermédia e as “Secundárias” com origem no epidídimo, estão associadas à maturação espermática e envolvem normalmente a cauda do espermatozoide. (Edmondson, Roberts, and Bychawski 2012) Algumas anomalias podem ser originadas em ambas as fases tornando a classificação equívoca. (Hopper 2015)

A classificação “Major ou Minor” categoriza as anomalias espermáticas de acordo com o efeito sobre a fertilidade. Os defeitos “Major” são aqueles que diminuem obviamente a fertilidade. Os “Minor” não têm efeito significativo sobre a fertilidade. São apenas importantes quando as contagens são elevadas.

O terceiro sistema de classificação, “Compensáveis ou Não Compensáveis”, está associado à preparação de doses de sémen. Categoriza as anomalias de acordo com a possibilidade de serem compensadas ou não pelo ajuste da diluição do sémen visando a introdução de mais espermatozoides viáveis por dose de inseminação. São exemplos de defeitos compensáveis, aqueles que alterem a motilidade espermática e,

consequentemente, a capacidade dos espermatozóides atravessarem as barreiras do trato genital feminino e chegarem ao oócito.

Espermatozóides com motilidade normal e com defeitos de cabeça, conseguem chegar ao óvulo. No entanto, resultam em embriões com fraca viabilidade ou não conseguem iniciar os processos de fertilização. Estes espermatozóides competem com os normais e muitas vezes impedem a formação de um embrião viável. A existência de defeitos não compensáveis diminui a fertilidade numa taxa semelhante à percentagem da sua presença no ejaculado ou dose para inseminação. (Hopper 2015)

Cerca de 50 a 70% dos espermatozóides devem ser morfologicamente normais para que o carneiro possa ser considerado satisfatório para reprodução. Carneiros com contagens de espermatozóides normais superiores a 90% são considerados excepcionais (Edmondson, Roberts, and Bychawski 2012)

6.2.5.3. Defeitos de cabeça

6.2.5.3.1. Cabeças destacadas

As cabeças destacadas são uma anomalia Secundária, Minor, Compensável devido à inexistência óbvia de motilidade. Esta anomalia aparece frequentemente em baixo número em todos os ejaculados. Podem aparecer contagens elevadas no ejaculado de animais que tiveram um intervalo longo de descanso ou paragem reprodutiva, que tenham sido expostos a um período de stress com ou sem pirexia, em animais pré-púberes e com hipoplasia (Hopper 2015) ou degenerescência testicular. (Youngquist and Threlfall 2007)

O espermograma de animais com uma contagem elevada de cabeças destacadas tende a melhorar com a repetição das colheitas e a recuperar a fertilidade rapidamente. Esta anomalia tem origem secundária. O trânsito espermático no epidídimo demora cerca de 11 dias. Os Animais que apresentem contagens elevadas de cabeças destacadas, (Figura 15, G) devem ser novamente testados após esse período. (Hopper 2015) Até se fazer um novo teste, devem ser feitas várias colheitas para renovar os espermatozóides acumulados no epidídimo.

6.2.5.3.2. Cabeças piriformes

São cabeças em forma de pêra ou cone. É uma anomalia Primária, Major. A classificação Compensável/Não Compensável é controversa. Na medicina humana a cabeça piriforme não é considerada anormal. Geralmente os espermatozóides com anomalias de cabeça não têm capacidade para atravessar o trato reprodutivo, no entanto, os espermatozóides com cabeça piriforme aparentemente conseguem. O grau de deformação da cabeça tem influência na fertilidade por poder alterar a penetração normal da zona pelúcida.

Esta anomalia pode ser encontrada quando há um aumento da temperatura testicular em situações de golpes de calor, estados de pirécia ou quando há uma deposição de gordura escrotal superior ao normal em animais com score de condição corporal elevado. (Hopper 2015)

6.2.5.3.3. Macrocefalia e Microcefalia

Cabeças Microcefálicas ou Macrocefálicas são anomalias Secundárias, Minor. São normalmente encontradas em muito pequena quantidade em ejaculados de animais férteis. Estas anomalias podem ser observadas em conjunto com uma grande variedade de outros defeitos após episódios que causem alteração da espermatogénese. Raramente excedem os 5-7%. A maioria dos espermatozóides com anomalias de cabeça não consegue atravessar as barreiras do trato genital feminino sendo naturalmente excluídos. Por este motivo, consideram-se as anomalias de cabeça Compensáveis. (Hopper 2015)

6.2.5.3.4. Defeitos de acrossoma

Os defeitos de acrossoma podem ser identificados como uma dilatação apical que sobressai ou dobra sobre a cabeça dos espermatozóides. Aparecem frequentemente como uma área achatada ou um recorte anormal no ápex do espermatozoide. Estes defeitos podem ter etiologia genética com carácter autossómico recessivo. Deve-se considerar:

- Etiologia genética, se o defeito continuar presente ao longo do tempo,

- Alteração da espermatogénese, quando está associado a contagem elevada de outros defeitos,

- Etiologia ambiental relacionada com temperatura (mais frequentemente)

Os defeitos de acrossoma são considerados Primários, Major, Não Compensáveis. No entanto, a classificação não compensável é controversa uma vez que estes espermatozoides não são capazes de atravessar o trato genital feminino efetivamente e a maioria daqueles que o atravessam não penetram a zona pelúcida. No entanto, alguns defeitos ligeiros de acrossoma passam despercebidos e os espermatozoides apesar de comprometidos, podem parecer morfológicamente normais e manter a capacidade de penetração da zona pelúcida. Estes casos estão associados a fraca viabilidade embrionária devido ao baixo ritmo de clivagem do zigoto. Por questões práticas os defeitos de acrossoma devem ser considerados Não Compensáveis.

Quando são encontrados defeitos de acrossoma em números elevados em conjunto com outros defeitos de cabeça, deve-se avaliar o animal 60 a 90 dias mais tarde. O mesmo se aplica, se se encontrarem defeitos de acrossoma numa percentagem superior a 20%. Neste caso deve-se considerar a etiologia genética. (Hopper 2015)

Os defeitos de acrossoma devem ser considerados especialmente importantes por comprometerem severamente a fertilidade. (Ott and Memon 1980; Youngquist and Threlfall 2007)

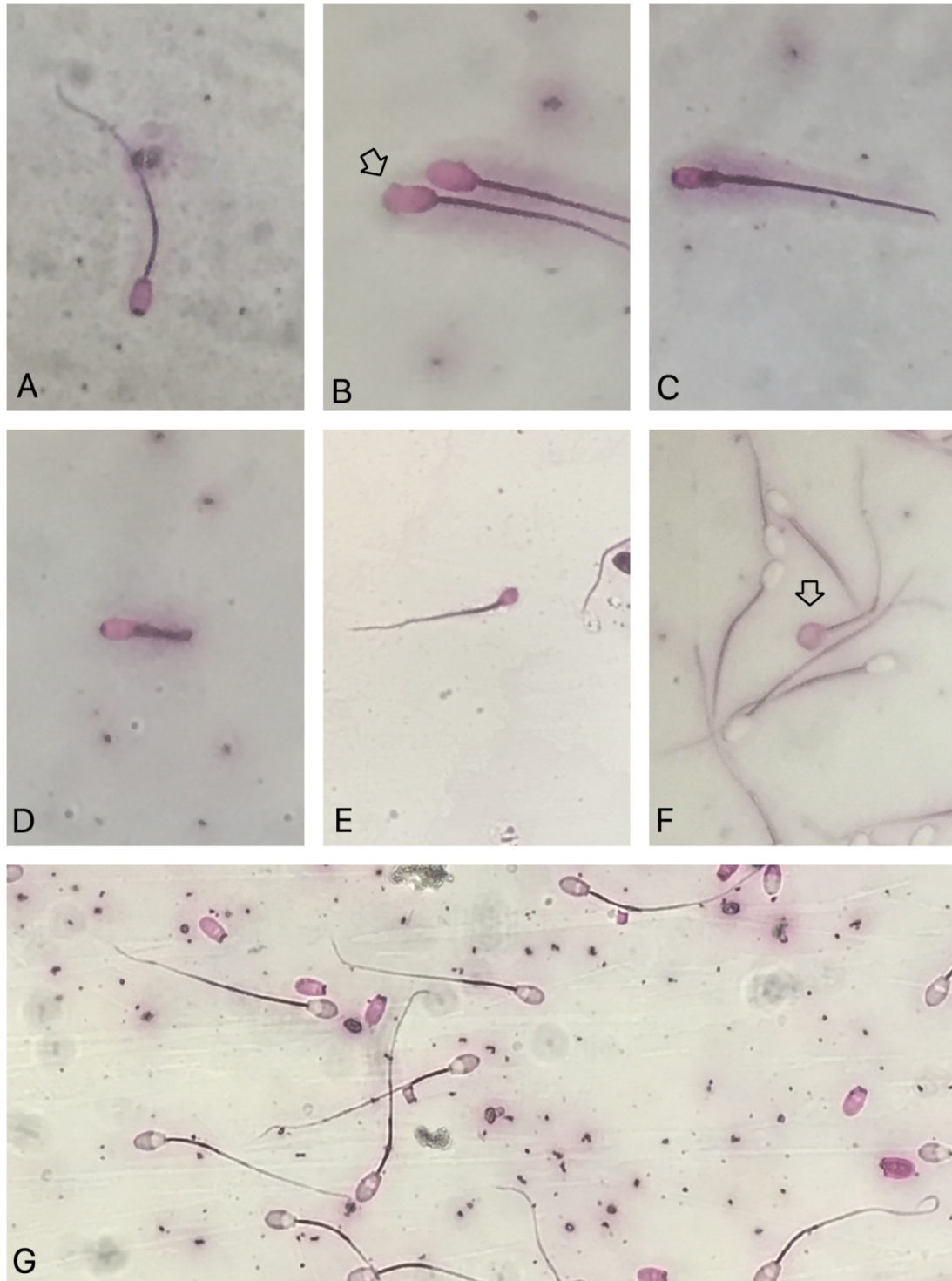


Figura 5. Avaliação da morfologia espermática. Defeitos de cabeça. A – Alteração do acrossoma; B – Alteração do acrossoma (seta preta) rebordo acrossômico irregular; C – Espermatozóide morto com alteração do acrossoma, espessamento da peça intermédia e uma gota citoplasmática proximal; D – Espermatozóide morto com defeito no acrossoma e defeito DAG; E – Espermatozóide morto com cabeça piriforme e microcefálica; F – Espermatozóide morto entre vários vivos, cabeça globosa macrocefalia/teratóide (seta preta); G – Cabeças destacadas. Microscopia do campo claro, ampliação 400X, coloração Eosina-Nigrosina, fotografia cedida pelo autor 2017.

6.2.5.4. *Defeitos de cauda*

6.2.5.4.1. Ventroflexão distal

É a anomalia mais comum na cauda dos espermatozóides (Figura 6F, G). Considera-se um defeito Secundário, Minor. É Compensável, uma vez que os espermatozoides com este defeito não têm motilidade progressiva. Esta anomalia aparece frequentemente associada à presença de gotas citoplasmáticas distais dentro da dobra após episódios de insulto térmico. Pode também aparecer sem associação com gotas citoplasmáticas, quando ocorre um insulto osmótico por contacto com soluções hipotónicas.

Animais normalmente férteis podem ter contagens elevadas deste defeito.

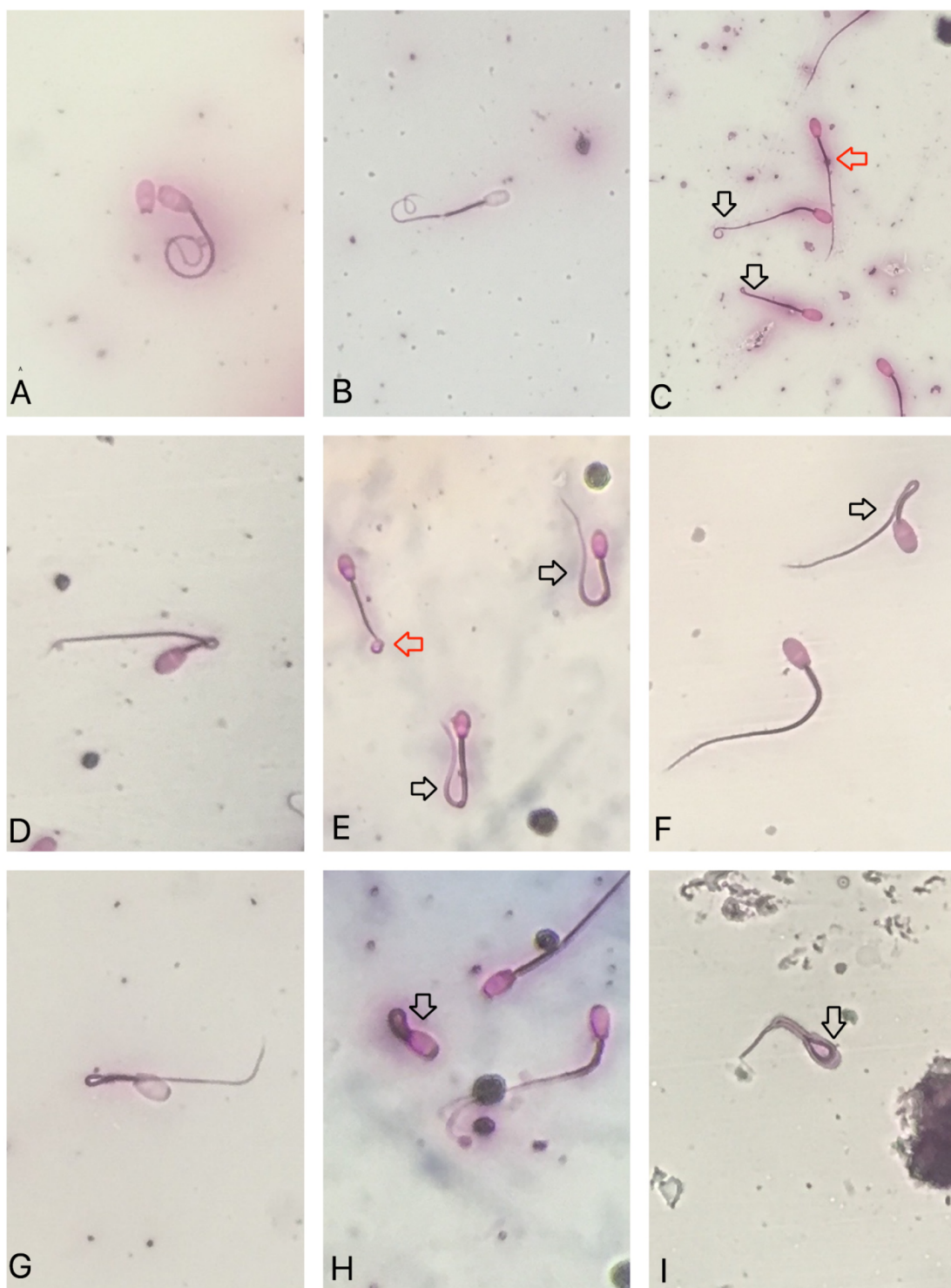
Quando existem contagens elevadas (20-25%) e o espermograma cumpre com a morfologia aceitável, (> 70% espermatozoides normais), deve-se considerar que este defeito pode aumentar drasticamente em períodos de stress e comprometer a fertilidade. (Hopper 2015)

6.2.5.4.2. Cauda enrolada

Este defeito também chamado de peça principal enrolada (Figura 6A, B, C) é uma anomalia Secundária Minor, Compensável devido à fraca motilidade. Não é frequente, mas pode ser encontrado conjuntamente com outros defeitos após exposição do sémen a fatores de stress térmico, osmótico ou por contaminação do sémen com produtos tóxicos. (Hopper 2015)

6.2.5.4.3. Cauda dobrada

As caudas dobradas (Figura 6D, E) são defeitos Secundários, Minor, Compensáveis. É importante determinar se o defeito é real ou se foi induzido pelo corante. A utilização de um corante velho que se tenha tornado hipertónico causa frequentemente um arqueamento da cauda dos espermatozóides. (Hopper 2015)



Created by Paint X

Figura 6. Avaliação da morfologia espermática. Defeitos de cauda. A - Espermatozói­de morto com cauda enrolada e uma cabeça isolada; B - Espermatozói­de vivo com cauda enrolada; C – Espermatozói­des mortos com cauda terminalmente enrolada (setas pretas), gota citoplasmática distal (seta vermelha); D – Espermatozói­de morto com cauda dobrada; E - Espermatozói­des mortos, caudas dobradas (setas pretas) e cauda terminalmente enrolada (seta vermelha); F - Espermatozói­des mortos, ventroflexão distal da cauda (seta preta), G - Espermatozói­de vivo com ventroflexão distal da cauda; H - Espermatozói­des mortos, defeito DAG (seta preta); I – Espermatozói­de morto, defeito DAG (seta preta). Microscopia do campo claro, ampliação 400X, coloração Eosina-Nigrosina. Fotografias cedidas pelo autor 2018

6.2.5.5. Defeitos de peça intermédia

6.2.5.5.1. Defeito DAG

É uma anomalia da peça intermédia primária com origem específica na cauda do epidídimo. Aparece em pequeno número no ejaculado de animais normalmente férteis (Figura 6H, I e Figura 7A). Os espermatozóides com este defeito não têm motilidade. Assim sendo, é um defeito Minor, Compensável. Em bovinos, o defeito DAG pode estar relacionado com fatores genéticos, se estiver presente em contagens elevadas. (Hopper 2015) Não foram encontradas evidências de que possa estar relacionada com fatores genéticos em carneiros.

6.2.5.5.2. Gotas citoplasmáticas

Podem ser encontradas em pequeno número no ejaculado de carneiros normalmente férteis, especialmente em animais peri-púberes ainda imaturos ou que estejam a ter uma utilização reprodutiva excessiva (Figura 7B). As gotas citoplasmáticas devem desaparecer durante o trânsito no epidídimo. (Hopper 2015) As gotas migram ao longo da peça intermédia dos espermatozóides e desaparecem durante a maturação destes no epidídimo. (Edmondson, Roberts, and Bychawski 2012) As gotas citoplasmáticas proximais são defeitos Primários, Major, Não Compensáveis. Indicam alterações na espermatogénese e incompetência espermática.(Hopper 2015)

A presença de gotas citoplasmáticas está associada a um maior número de caudas dobradas e enroladas. (Hopper 2015)

As gotas citoplasmáticas distais são defeitos Secundários, Minor, Compensáveis com pouco significado clínico. Têm origem no epidídimo e estão associadas a períodos de fraca atividade hormonal, excesso de utilização do animal na reprodução e a imaturidade sexual.

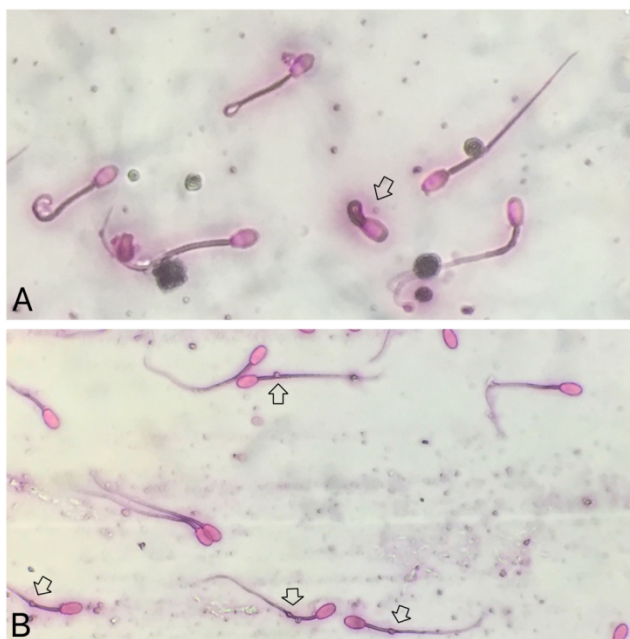


Figura 7 Avaliação da morfologia Espermática. Defeitos de peça intermédia A – Espermatozoides mortos, defeito DAG (seta preta) B – Espermatozoides mortos, Gotas citoplasmáticas distais (setas pretas). Microscopia do campo claro, ampliação 400X, coloração Eosina-Nigrosina. Fotografia cedida pelo autor 2017

6.2.5.6. Artefactos

A técnica de coloração e de execução do esfregaço pode produzir artefactos relacionados com a exposição dos espermatozoides a stress osmótico, térmico e mecânico. Um corante velho ou mal diluído poderá causar stress osmótico nos espermatozoides e aumentar o número de defeitos de cauda, assim como o excesso de força mecânica ao executar o esfregaço poderá produzir uma contagem de cabeças destacadas e fraturas de peça intermédia e cauda superior ao real. (Youngquist and Threlfall 2007)

7. Sémen destinado à inseminação artificial

Numa situação de monta natural um carneiro fértil deposita vários milhares de milhões de espermatozóides na vagina das fêmeas, mas apenas 100-140 milhões penetram o cérvix. Deste modo, o ejaculado de carneiros pode ser diluído com um extensor adequado para ser aplicado por inseminação artificial.

O limite normal de espermatozóides para que se obtenham taxas de concepção aceitáveis por inseminação artificial cervical com sémen refrigerado é de 100×10^6 espermatozóides viáveis por dose. A inseminação intrauterina por laparoscopia com sémen descongelado requer 20 a 40×10^6 espermatozóides viáveis por dose (Tabela 3).

Um só ejaculado diluído origina várias doses de inseminação artificial e pode ser utilizado para inseminar várias fêmeas, (Salamon and Maxwell 2000; Youngquist and Threlfall 2007) como se pode verificar no Anexo IV, Tabela 23.

7.1. Conservação do sémen para inseminação artificial

A conservação do sémen é conseguida através da redução ou paragem completa do metabolismo dos espermatozóides e do aumento do seu tempo de vida fértil. O tipo de preservação de sémen depende do objetivo pretendido e do fim a que se destina a sua utilização. O sémen pode ser criopreservado por longos períodos de tempo em azoto líquido (-196°C), ou pode ser refrigerado ($0-5^{\circ}\text{C}$) para utilização em fresco poucas horas após a colheita. Ambos os métodos expõem os espermatozóides a temperaturas reduzidas podendo provocar choque térmico. Este choque, provoca alterações irreversíveis na estrutura celular comprometendo definitivamente a viabilidade dos gâmetas. O choque térmico pode ser evitado através da refrigeração lenta do sémen e adição de lípidos aos extensores de sémen. (Salamon and Maxwell 2000)

Os extensores de sémen fornecem nutrientes e energia aos espermatozóides, um ambiente tamponado para evitar alterações de pH, Isotonicidade se for destinado a aplicação em fresco e uma ligeira hipertonicidade se for destinado a criopreservação. Estão descritas várias formulações com princípios comuns, mas com algumas diferenças nos seus constituintes. O extensor sintético geralmente aceite para diluição de sémen de carneiro é composto por Glucose, Citrato e Gema de ovo nas proporções indicadas na Tabela 5. (Salamon and Maxwell 2000) Aos extensores de sémen para congelação, acresce a adição de agentes crioprotetores como o Glicerol.

A gema de ovo, contém lipoproteína de baixa densidade (LDL) que protege as membranas celulares contra o choque térmico, durante a congelação e a descongelação. Por outro lado, reduz a perda de enzimas acrossomais e previne alterações degenerativas no acrossoma durante a refrigeração. (Salamon and Maxwell 2000)

A frutose é o único hidrato de carbono simples presente no sémen de carneiro. Para além da frutose, os espermatozóides tem capacidade de metabolizar a glucose e manose quando estes açúcares estão incluídos no extensor do sémen. Nenhum outro açúcar é fonte de energia. No entanto a Sacarose e/ou Lactose por vezes estão presentes pela capacidade de manutenção da pressão osmótica e integridade das membranas durante o armazenamento. (Salamon and Maxwell 2000)

O tris(hidroximetil)-Aminometano, (TRIS) e o ácido cítrico ou citrato são rotineiramente utilizados nos extensores de sémen por terem capacidade tampão. O TRIS tem maior poder tampão que o citrato. Tem também capacidade de atravessar a membrana plasmática e minimizar as variações intracelulares de pH. (Sammataro, Gerson, and Needham 2000)

A adição de antibióticos aos extensores previne o crescimento bacteriano. Por norma são utilizadas combinações de Penicilina sódica e o sulfato de Estreptomicina. (Salamon and Maxwell 2000). Segundo Moustacas et al., a combinação destes dois antibióticos permite eliminar *Actinobacillus seminis* e *Brucella ovis*. (Moustacas et al. 2010)

Os crioprotetores mais utilizados são o Dimetil-sulfoxido (DMSO) e o Glicerol. Estes agentes, são pequenas moléculas não iónicas com capacidade de atravessar a membrana celular. São moléculas osmoticamente inativas por serem igualmente distribuídas no espaço intracelular e extracelular. No entanto, no momento da adição destes agentes ao sémen, podem causar insulto osmótico pelo facto de a água se movimentar mais rapidamente através da membrana do que os crioprotetores. Numa fase inicial, há um desequilíbrio osmótico que resulta na saída rápida de água para o espaço extracelular, seguida de um influxo de água e de crioprotetores para o interior das células até que a distribuição se iguale no meio intra e extracelular. (Sieme, Oldenhof, and Wolkers 2016)

O Glicerol é o crioprotector mais utilizado para congelar sémen de carneiro pelo método convencional. A quantidade ideal de glicerol nos extensores de sémen é de 3-5%. Em concentrações superiores a 6% afeta a sobrevivência dos espermatozoides após a descongelação. A utilização do glicerol está condicionada pela sua toxicidade que depende do ritmo de arrefecimento, congelação e composição do extensor. A concentração de glicerol é influenciada pela quantidade de gema de ovo no extensor.

Quantidades superiores de gema de ovo reduzem a necessidade glicerol. (Salamon and Maxwell 2000)

7.2. Diluição do sémen

A diluição do sémen deve ser feita sem demoras, imediatamente após a análise rotineira do ejaculado (avaliação da motilidade massal e individual, determinação do volume e concentração do ejaculado e execução de 2 esfregaços). Esta análise não deve tomar mais do que 5 minutos e o sémen deve ser mantido a uma temperatura de 37°C. Logo que possível, deve-se diluir o sémen numa proporção de 1:1 (sémen/ Extensor). O sémen e o extensor devem estar à mesma temperatura no momento da diluição.

A adição de extensor ao ejaculado é um ponto crítico no processamento do sémen e requer algum cuidado devido ao risco de causar insulto térmico e osmótico. O extensor deve ser adicionado lentamente ao sémen e nunca o contrário. Os danos causados por insulto térmico ou osmótico prejudicam a motilidade espermática com penalização irreversível na fertilidade. (Sieme, Oldenhof, and Wolkers 2016)

A quantidade de extensor a utilizar depende da concentração inicial do ejaculado e da quantidade pretendida de espermatozoides por doses de inseminação. A determinação do volume de extensor necessário é feita com base no número de espermatozoides viáveis.

Após a adição do volume total de extensor deve se homogeneizar a mistura gentilmente e verificar ao microscópio se a motilidade individual dos espermatozoides se mantém.

A quantidade de espermatozoides por dose inseminante difere de acordo com a finalidade a que o sémen se destina. A Tabela 3, representa a quantidade recomendada de espermatozoides com motilidade progressiva necessários para sucesso dos programas de inseminação artificial. É recomendado que as doses de sémen destinadas à criopreservação contenham no mínimo 80 a 500 x10⁶ espermatozoides viáveis /ml. (Ritar, Ball, and O'May 1990)

Tipo de Inseminação	Tipo de sémen	Volume (ml)	Spz viáveis / dose inseminante	Spz viáveis/ml
Cervical	Fresco	0.2	200 x10 ⁶	1000 x10 ⁶
Vaginal	Fresco	0,2	400 x10 ⁶	2000 x10 ⁶
Laparoscópica Intrauterina	Descongelado	0,05	20-40 x10 ⁶	400-800 x10 ⁶

Tabela 3 Concentração e volume de sémen requeridos para os diferentes tipos de inseminação artificial. Adaptado de (Youngquist and Threlfall 2007)

8. Sémen refrigerado (0-5°C)

A manutenção de sémen refrigerado provoca alterações irreversíveis na membrana citoplasmática dos espermatozóides com penalização da motilidade espermática. As perdas na integridade celular são agravadas pela acumulação de produtos tóxicos do metabolismo, principalmente radicais livres de oxigénio formados através da peroxidação dos lípidos da membrana celular.

A refrigeração reduz o metabolismo celular, mas não o pára por completo. A viabilidade dos espermatozóides reduz rapidamente com o aumento do tempo de refrigeração. Os índices de fertilidade em ovelhas inseminadas com sémen refrigerado são 45-50%, 25-30% e 15-20% para sémen refrigerado por 24, 48 e 72 horas respetivamente (Tabela 4). Vários estudos demonstram que a fertilidade diminui rapidamente quando o sémen destinado a inseminação cervical é mantido refrigerado por mais de 24h. A diminuição da fertilidade ocorre a uma taxa de 10-35% por dia. A redução do índice de fertilidade deve-se se à perda de motilidade e de capacidade fecundante dos espermatozóides no trato genital das fêmeas. (Salamon and Maxwell 2000) Os espermatozóides com fraca motilidade dificilmente conseguem atravessar o cérvix ovino.

Tempo decorrido entre colheita de sémen e a inseminação cervical com sémen refrigerado	Índice de Fertilidade (%)
< 24 horas	45-50
24 – 48 horas	25-30
48 – 72 horas	15-20
>72 horas	<15

Tabela 4 Relação entre o Índice de Fertilidade e o tempo de corrido entre a aplicação cervical de sémen refrigerado e a colheita. Adaptado de (Salamon and Maxwell 2000)

9. Sémen criopreservado (-196°C)

A criopreservação expõe as células a stress induzido pela temperatura baixa e pelo balanço osmótico dos extensores. A diminuição da temperatura poderá provocar insulto térmico e alterações irreversíveis nos espermatozóides. O stress osmótico é causado predominantemente pela formação de cristais de gelo extracelular. Estes cristais diminuem a fração de água disponível para os solutos extracelulares, aumentando a sua concentração na fração não congelada. Esta dinâmica leva à desidratação celular pela movimentação de água para o meio extracelular a fim de atingir um equilíbrio osmótico dentro e fora das células. (Kopeika, Thornhill, and Khalaf 2015; Meryman 2007)

A desidratação celular ocorre especialmente com o arrefecimento lento. Pelo contrário, quando o arrefecimento é rápido não há tempo para a movimento de água para o meio extracelular. A acumulação excessiva de água no interior das células leva à formação de cristais de gelo intracelulares. (Sieme, Oldenhof, and Wolkers 2016)

A formação e dissolução de gelo durante a congelação e descongelação afeta a integridade e funcionalidade do acrossoma, núcleo, mitocôndrias, axonema e membrana plasmática. (Alcay, Berk Toker, et al. 2015)

As células possuem uma taxa de arrefecimento ótima em que a desidratação e formação de cristais de gelo são mínimas e a sobrevivência após descongelação é máxima. A capacidade dos espermatozóides alterarem o seu volume em resposta ao stress induzido pela congelação é definida pela permeabilidade da membrana citoplasmática e pela quantidade de água que a atravessa. Numa situação normal, a permeabilidade da membrana diminui com a redução da temperatura. No entanto, a formação de gelo altera este equilíbrio. (Akhoondi et al. 2011; Sieme, Oldenhof, and Wolkers 2016)

Os crioprotetores alteram a taxa de arrefecimento celular ótima para temperaturas mais baixas, alargam a margem de temperaturas de arrefecimento e aumentam a permeabilidade da membrana à água facilitando a desidratação celular durante a congelação mesmo com temperaturas negativas. Deste modo, favorecem a sobrevivência das células após a descongelação. (Sieme, Oldenhof, and Wolkers 2016)

Nem todos os carneiros conseguem resultados satisfatórios na congelação de sémen. Esta variação entre carneiros depende de fatores genéticos individuais e do próprio protocolo de congelação utilizado. Em média, 5-10% dos carneiros não têm resultados satisfatórios na congelação de sémen. (Youngquist and Threlfall 2007)

10. Descongelção de sémen

A descongelção de sémen é um procedimento crítico que necessita de uma temperatura adequada para evitar mais danos por insulto térmico aos espermatozóides. (Gourley and Riese 1990) O sémen armazenado em palhinhas deve ser descongelado em banho de água a 37°C durante 30 segundos

Após a descongelção deve-se avaliar o sémen para garantir que existem espermatozóides viáveis. Esta avaliação é feita com base na motilidade individual. Pelo menos 40% dos espermatozoides devem ter motilidade progressiva imediatamente após a descongelção, e pelo menos 30%, 4 a 6 horas após, se o sémen for mantido em banho de água aquecido a 35-37°C. (Gourley and Riese 1990) Segundo a Sociedade de Teriogenologia, o sémen descongelado deverá ter no mínimo 70% de morfologia normal, 50% dos acrossomas íntegros e uma motilidade de 25% imediatamente após a descongelção e de 15% passadas 2 horas da descongelção. (Pugh and Baird 2012)

11. Efeito da criopreservação e descongelação na viabilidade dos espermatozoides

O sucesso da inseminação artificial com sémen descongelado não depende apenas da capacidade de fertilização dos espermatozóides, mas também da qualidade do armazenamento, transporte e da sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo das fêmeas. Os espermatozóides de carneiro são extremamente sensíveis à criopreservação. Esta técnica, provoca danos estruturais e bioquímicos responsáveis pela redução da motilidade, integridade morfológica e do potencial mitocondrial. Provoca também danos na cromatina que levam à libertação de radicais livres. (Fang et al. 2018; Jimenez-Rabadan et al. 2016)

A capacidade de fertilização depende da locomoção dos espermatozóides, da capacidade de interação com o oócito e de penetrar a zona pelúcida. Por este motivo, os espermatozóides necessitam preservar a motilidade e manter as membranas celulares intactas até encontrarem o oócito no seu trajeto pelo trato genital da fêmea. A integridade da membrana citoplasmática é fundamental na regulação da função dos espermatozóides.

11.1. Capacitação espermática

A membrana citoplasmática sofre algumas alterações no trato genital da fêmea, que conferem aos espermatozóides a capacidade de fertilizar os oócitos. A estas alterações dá-se o nome de capacitação espermática. Esta reação altera a composição das membranas plasmática e acrossômica de modo a que as enzimas do acrossoma possam ser libertadas e ativadas na fase de contacto com o oócito. A capacitação espermática requer a exposição dos espermatozóides a secreções uterinas. (Cunningham and Klein n.d.) A capacitação espermática é fundamental para que o espermatozoide consiga interagir com os recetores da zona pelúcida e induzir a reação acrossômica (Grasa et al. 2003)

A congelação e descongelação induzem alterações membranares semelhantes à capacitação espermática. A capacitação prematura reduz a longevidade e capacidade fertilizante dos espermatozóides criopreservados. (Grasa et al. 2003) Os espermatozoides capacitados e envelhecidos têm viabilidade reduzida e um tempo de vida fértil curto. Este facto é agravado pela perda de funcionalidade rápida e envelhecimento dos espermatozóides no trato genital das fêmeas quando a inseminação é cervical. Por outro lado, a morte embrionária precoce é considerada uma

das principais causas de fertilidade reduzida. A condição dos gametas no momento da fertilização afeta a sobrevivência embrionária. As perdas embrionárias aumentam com o envelhecimento dos gametas no trato genital das fêmeas. (Salamon and Maxwell 2000)

A resistência dos espermatozoides à congelação é influenciada por fatores genéticos individuais, pelo que a congelação de espermatozoides de carneiros diferentes pode ter taxas de sucesso diferentes para o mesmo protocolo de congelação. (Barbas and Mascarenhas 2009)

III. Componente prática

1. Objetivos do estudo

Este trabalho pretendeu:

- I. Relacionar os parâmetros do exame andrológico (circunferência escrotal, Motilidade progressiva, Morfologia, concentração e volume do ejaculado) com a qualidade do sémen.
- II. Estudar o efeito da criopreservação e descongelação na viabilidade do sémen à descongelação
- III. Estudar o perfil de alterações induzidas pela criopreservação e descongelação nas doses de sémen diluídas com Glucose-Citrato-Gema de ovo e OVIXCell®. Determinar qual dos dois diluidores permite melhor qualidade do sémen á descongelação.
- IV. Determinar o Índice de Fertilidade, Índice de Natalidade e número médio de borregos por parto resultantes da IA cervical com sémen refrigerado e da IA intrauterina por laparoscopia com sémen descongelado.

2. Materiais e Métodos

Este estudo foi realizado no Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada (CRAHA) em Vila Nova de São Bento, Serpa, entre Setembro e Dezembro de 2017, durante a época reprodutiva dos ovinos. O estudo foi integrado num programa de conservação e melhoramento genético de raças autóctones portuguesas de ovinos, com o objetivo de Criopreservar 200 doses de sêmen de cada carneiro selecionado para dar sêmen para integrar o BPGA.

Durante este período, estiveram presentes no CRAHA vários carneiros das raças Merino Branco, Merino Preto, Churros do Minho, Bordaleiros entre o Douro e Minho e Campaniços, somando um total de 43 animais selecionados pelas associações ANCORME, AMIBA e ACOS. Apenas foram selecionados animais em raça pura, inscritos no livro genealógico de cada da raça.

A todos os carneiros foram feitas 2 análises serológicas de *Brucella ovis*, *Brucella melitensis* e *Border Disease*. A primeira análise nas explorações de origem, antes de serem movimentados para o CRAHA e a segunda já no CRAHA antes de terminar o período de quarentena de 30 dias a que foram sujeitos. Durante este período, os animais ficaram agrupados por exploração e isolados dos restantes animais da herdade em instalações próprias isoladas dentro de num perímetro vedado. Durante a quarentena, foi feito um exame físico e de estado geral detalhado a cada animal. Todos foram vacinados contra *Clostridium perfringens* tipo A, B, C e D com Multivac 9® e desparasitados com Doramectina, Dectomax®. Qualquer animal serologicamente positivo a algum dos agentes analisados, *Brucella ovis*, *Brucella melitensis* ou vírus da *Border Disease*, foi excluído.

Ao fim dos 30 dias de quarentena e depois do segundo resultado da serologia negativa, os animais foram movimentados para o interior das instalações do CRAHA onde foram agrupados em parques de 2 a 5 animais por raça. Em todos os parques foi colocada cama de palha nova. Os parques foram montados dentro de um pavilhão onde os animais estiveram abrigados das condições meteorológicas desfavoráveis. Alguns parques permitiram o acesso a um perímetro exterior vedado. Os animais presentes no centro foram alimentados uma vez por dia com feno complementado com ração. A água foi fornecida à descrição em bebedouros com sistema de boia que garantiram a renovação constante da água.

Todos os carneiros foram sujeitos a exame andrológico quando entraram no CRAHA e treinados ao circuito de movimentação desde o parque de alojamento até à sala de colheitas e regresso. Após a adaptação ao circuito de movimentação, foram treinados a servir uma ovelha manequim presa num tronco de contenção (Figura 9).

Este treino permitiu facilitar as colheitas de sémen, manter o bem-estar animal e garantir melhor qualidade dos ejaculados. A libido foi avaliada durante o período de treino de todos os animais e durante as sessões de colheita de sémen.

O trabalho desenvolvido no CRAHA teve como principal objetivo a salvaguarda de recursos genéticos nacionais ameaçados. Por este motivo os animais sem libido ou que não foram responsivos ao treino de serviço à ovelha manequim foram submetidos a Electro-Ejaculação.

Apenas foram selecionados para o estudo os carneiros que no período entre 1 de Setembro e 31 de Dezembro de 2017 tiveram um exame andrológico completo, e pelo menos 1 colheita de sémen que tenha sido avaliada antes da criopreservação e após a descongelação.

Foram incluídos 16 carneiros no estudo do efeito da criopreservação e descongelação na viabilidade do sémen à descongelação e da eficácia dos dois extensores de sémen, Glucose-Citrato-Gema de ovo e OVIXCell®:

- 3 carneiros de raça Merina Branca (MB),
- 3 carneiros de raça Merina Preta (MP),
- 6 carneiros de raça Bordeleira entre o Douro e Minho (BEDM) e
- 4 carneiros de raça Churra do Minho (CM).

Com o objetivo de estudar os índices de Fertilidade, Natalidade e número médio de borregos por parto resultante da inseminação artificial intrauterina por Laparoscopia, foram incluídos no estudo mais 3 carneiros para além dos 16 mencionados anteriormente:

- 1 carneiro de raça Merina Branca (MB)
- 2 Carneiros de raça Merina Preta (MP)

Neste segundo estudo, apenas foram incluídos 4 carneiros, os 3 mencionados anteriormente e um dos carneiros incluído no estudo anterior

2.1. Colheita de sémen

As colheitas foram realizadas com uma periodicidade de aproximada de 1 a 2 vezes por semana. Todos os carneiros que demonstraram libido positiva e foram responsivos ao treino, tiveram as suas colheitas feitas pelo método da vagina artificial. Os restantes que não foram responsivos ao treino foram submetidos a Electro-Ejaculação.

O modelo de vagina artificial utilizado (Figura 8) é constituído por um tubo cilíndrico (2) com uma válvula acoplada (3) que permite a passagem de ar e água. No interior do tubo cilíndrico é colocada uma bacia com as extremidades dobradas sobre os bordos exteriores do tubo (6) formando uma bolsa vazia no interior da vagina. Dentro desta bolsa, coloca-se água aquecida e pressão por insuflação na válvula (3). A utilização de bandas elásticas fortes (7) impede a perda de pressão e de água quente do interior da vagina. Na extremidade distal da vagina é acoplado um cone de silicone (1) e um tubo falcon (5) revestido com espuma isoladora (4) para evitar o arrefecimento rápido do tubo falcon após a retirada da estufa. Este isolamento permitiu evitar choque térmico. Na Figura 8, podem ver-se os vários componentes deste modelo de vagina artificial, e o aspeto final de uma vagina pronta a ser utilizada.



Figura 8 Modelo de vagina artificial utilizada nas colheitas de sêmen no Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada. Em cima, os vários componentes de uma vagina Artificial desmontada. Em baixo, uma vagina pronta a ser utilizada e um tupo falcon rolhado. 1- Cone de silicone, 2- corpo da vagina, tubo cilíndrico, 3- válvula ar/água, 4- protetor em espuma isoladora, 5-tubo falcon graduado, 7- Bandas elásticas, Fotografia cedida pelo autor 2017

Para se fazerem as colheitas pelo método da vagina artificial colocou-se uma ovelha presa num tronco de contenção (Figura 9) e fez-se saltar cada carneiro. Foi preparada uma vagina artificial para cada animal. Todas as vaginas necessárias foram devidamente montadas antes de se iniciarem as colheitas e colocadas em estufa aquecida a 37°C. Este procedimento permitiu tornar o processo de colheitas mais célere e garantir ausência de humidade e a temperatura adequada no momento da colheita. A água aquecida e a pressão por insuflação foram colocadas antes dos animais entrarem na sala de colheitas para evitar perdas. A combinação de temperatura e pressão permite simular uma vagina real.

Todas as vaginas utilizadas foram colocadas numa solução desinfetante durante cerca de uma hora e depois devidamente lavadas com água corrente antes de serem novamente usadas.

As colheitas com vagina artificial foram feitas por um operador que se colocou de joelhos no lado direito do carneiro (Figura 9). Na primeira tentativa de serviço, o operador empurrou o carneiro impossibilitando a intromissão, de forma a estimular a libido do animal. No momento da intromissão o pênis foi desviado para a VA. Este processo foi repetido tantas vezes quantas as necessárias até que o carneiro desse o golpe de rins característico da ejaculação.



Figura 9 Colheita de sémen, Centro de Reprodução Animal Da Herdade da Abóbada. À direita uma ovelha manequim presa a um tronco de contenção. À Esquerda, colheita de sémen de um carneiro Merino Preto através do método da vagina artificial. Fotografia cedida pelo autor 2017

Os carneiros submetidos à Electro-Ejaculação foram preparados para as colheitas fazendo-se tricotomia da lã da zona do prepúcio. As colheitas foram feitas com os animais em decúbito lateral após higienização do prepúcio com compressas humedecidas e papel. A sonda do electro ejaculador previamente lubrificada foi introduzida no reto dos animais até uma profundidade aproximada de 15 cm e foi utilizado o ciclo de estimulação automático do electro ejaculador com subida gradual da voltagem até haver exteriorização do pênis e ejaculação. O ciclo foi interrompido imediatamente após a ejaculação.

Nos animais sujeitos a Electro-Ejaculação, as colheitas foram feitas com um cone de silicone e um tubo falcon revestido com espuma acoplado no cone de modo semelhante à montagem da vagina artificial. O cone foi colocado perto do prepúcio do carneiro para que o pênis fosse exteriorizado dentro do mesmo.

Independentemente do método de colheita, todos os tubos falcon utilizados foram lavados, esterilizados e colocados em estufa aquecida para garantir a ausência de humidade no interior do tubo e os 37°C no momento da colheita do sémen.

Após cada colheita, o sémen foi imediatamente analisado em laboratório e processado sem demoras.

2.2. Avaliação do ejaculado

Imediatamente após a colheita do sémen, avaliou-se a cor do ejaculado, mediu-se o volume, determinou-se a concentração e avaliou-se a motilidade massal e individual dos espermatozóides. Este foi o painel de análises feito sistematicamente em todas as colheitas de sémen antes da diluição, refrigeração e congelação.

A cor do ejaculado foi o primeiro parâmetro a ser avaliado diretamente no tubo falcon e imediatamente após a colheita. Os ejaculados amarelos, avermelhados, acastanhados sugestivos de contaminação com urina, sangue ou exsudado inflamatório, respetivamente, foram rejeitados.

O volume dos ejaculados foi medido em ml diretamente nos tubos falcon graduados onde foram colhidos. Além disso, pesou-se o sémen colhido assumindo uma densidade de 1g/ml sémen. Considerou-se o volume de sémen igual ao valor obtido na pesagem.

A concentração foi determinada por espectrofotometria em cuvetes plásticas descartáveis contendo 3990 µl de uma solução tamponada de formol a 10% e 10 µl de sémen (diluição 1:400).

Foi utilizado um espectrofotómetro calibrado para manipulação de sémen de carneiro.

Todos os materiais de laboratório utilizados para contactar com o sémen foram lavados, esterilizados, aquecidos em estufa, ou banho de água a 37°C e mantidos a essa temperatura até serem utilizados (tubos falcon, lâminas e lamelas, pontas de micropipeta, corante, extensor de sémen, etc). A manutenção do material dentro da estufa garantiu a ausência de humidade e a temperatura adequada para evitar o choque térmico. As lâminas de microscópio foram lavadas, colocadas numa mistura de álcool/Éter (1:1) e passadas por água destilada para eliminar detritos de detergentes e sujidade antes de serem colocadas na estufa.

Toda a avaliação microscópica do sémen foi feita em microscópios com platina aquecida a 35 °C. A motilidade massal e progressiva foi avaliada na mesma lâmina de microscópio.

Com uma micropipeta colocou-se uma gota de extensor numa das extremidades da lâmina e uma gota grosseira de sémen na extremidade oposta. Tocou-se com a mesma ponta da micropipeta utilizada para fazer a gota de sémen na gota de extensor para que fosse transferida uma quantidade de sémen muito pequena para a gota. Montou-se uma lamela na gota de sémen diluído e deixou-se estabilizar enquanto se avaliou a motilidade massal.

A motilidade massal foi avaliada na periferia da gota com uma ampliação de 40X e foi-lhe atribuída uma pontuação de 1 a 5 de acordo com a descrição constante no Anexo II, Tabela 19.

A motilidade individual ou progressiva foi avaliada com uma ampliação de 400X e pontuada percentualmente pela quantidade de espermatozóides móveis com trajetória progressiva, ou seja, aproximadamente retilínea. A pontuação atribuída à motilidade progressiva considerou a média de observação de pelo menos 5 campos microscópicos.

Ao mesmo tempo que se fez a avaliação laboratorial prepararam-se dois esfregaços de cada ejaculado. Utilizou-se Eosina-Nigrosina para avaliação da vitalidade e a morfologia. Para preparar os esfregaços, colocou-se se uma gota de sémen na extremidade de uma lâmina, ao lado uma gota de Eosina-Nigrosina. Com o canto de uma lamela transportou-se uma pequena quantidade de sémen e misturou-se na gota de corante. Com uma aresta limpa da mesma lamela tocou-se na gota da mistura e ligeiramente mais à frente na lâmina, fez-se o esfregaço por arrasto de modo semelhante a um esfregaço sanguíneo. Deixou-se secar ao ar sobre a platina aquecida do microscópio.

Todos os esfregaços foram feitos em duplicado como segurança, para o caso de que algum não tivesse qualidade diagnóstica ou se extrviasse.

A avaliação do ejaculado descrita anteriormente e a preparação dos esfregaços não demorou mais do que 5-10 minutos por colheita. O sémen foi sempre mantido em banho de água a 37°C.

A avaliação da vitalidade não foi feita imediatamente após a preparação dos esfregaços uma vez que viria atrasar o processamento do sémen. No entanto, foi feita por um operador ao mesmo tempo que o resto da equipa encheu e selou as palhinhas. Dentro de um período máximo de uma a duas horas após a colheita do primeiro ejaculado.

A morfologia foi determinada mais tarde com uma margem de tempo variável, de horas até vários dias após as colheitas.

A avaliação laboratorial da vitalidade e morfologia foi feita sempre pelo mesmo operador que contabilizou 200 espermatozóides por cada análise e colheita.

2.3. Diluição do sémen

As colheitas feitas até ao dia 18 de Outubro de 2017 foram diluídas com OVIXCell®, um extensor de sémen comercial. A partir do dia 19 de Outubro de 2017, passou a utilizar-se o extensor sintético Glucose-Citrato-Gema de ovo, preparado diariamente nos dias de colheitas. Este extensor vem descrito na bibliografia como sendo o diluidor geralmente aceite para manipulação de sémen de ovino. (Maxwell and Evans 1987) A sua composição está descrita na Tabela 5.

Composição do Extensor Glucose-Citrato-Gema de ovo		Composição do extensor OVIXCell®
Componente	Quantidade	Sais
Tris (g)	3,6	Eletrólitos
Glucose anidra (g)	0,5	Açúcares
Ácido Cítrico monidratado (g)	2	Eletrólitos
Gema de ovo Fresco (ml)	15	Proteína de origem Vegetal
Glicerol (ml)	5	Glicerol
Penicilina (U.I.)	100.000	Antibióticos
Estreptomicina (mg)	100	
Água destilada	Q.b. p/ 100ml	Água

Tabela 5 Composição dos extensores de sémen utilizados no CRAHA. À esquerda Glucose-Citrato-Gema de ovo preparado diariamente e à direita OVIXCell®.

Após a avaliação dos ejaculados e preparação dos esfregaços, todos as colheitas foram diluídas numa proporção de 1:1 (sémen/extensor). Esta mistura foi submetida a um período de estabilização de 10 minutos, ao fim do qual foi adicionado o restante volume calculado de extensor. O extensor foi adicionado lentamente para evitar o choque osmótico.

A diluição do sémen foi feita visando a colocação de 50 milhões ($5,0 \times 10^7$) de espermatozóides viáveis por palhinha. Consideraram-se viáveis a percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva.

O cálculo do número total de espermatozóides por dose, do número teórico de doses a preparar por ejaculado e do volume de extensor a adicionar foram feitos em folha de Excel aplicando as seguintes formulas.

$$\#Spz \text{ viáveis} \times 10^9 = \frac{Conc. ejaculado \times Vol. ejaculado \times Mot. individual (\%)}{100}$$

$$\# Doses = \frac{\#spz \text{ viáveis} \times 10^9}{50 \times 10^6} \approx \frac{\#spz \text{ viáveis} \times 10^9}{5,0 \times 10^7}$$

$$Vol \text{ Extensor} = \# Doses \times 0,22ml - Vol. ejaculado$$

Após adição do volume total de extensor o sémen ficou em estabilização à temperatura ambiente durante cerca de 20-30 minutos até ao momento de enchimento das palhinhas. Estas foram cheias aplicando sucção na extremidade com tampão. Após enchimento fez-se uma câmara-de-ar de 0,3ml em cada palhinha com a ajuda de um dispositivo próprio e aplicou-se um selo de policloreto de vinilo (PVC) em pó que polimeriza instantaneamente em contacto com a água selando a palhinha e impedindo o contacto direto entre o sémen e o azoto líquido até ao momento da sua utilização.

2.4. Refrigeração e criopreservação

O sémen de carneiro é criopreservado em palhinhas plásticas com um volume total de 0,25 ml em que 0,22 ml são ocupados pelo sémen e os restantes 0,3 ml pela câmara-de-ar e o selo. A forma destas palhinhas faz com que a área de superfície seja muito grande relativamente ao volume e que a descida da temperatura durante a fase de refrigeração seja homogénea em toda a palhinha. O facto de a área de superfície ser muito grande faz com que a curva de arrefecimento seja facilmente alterada se a temperatura não for rigorosamente controlada durante todo o processo de refrigeração.

Após o enchimento, as palhinhas foram colocadas num reco/jangada (Figura 10) onde foram submetidas as duas fases iniciais de refrigeração e congelação lenta. Todas as palhinhas foram identificadas de maneira diferente: pela cor da palhinha, cor do selo e pela inscrição na palhinha. A inscrição inclui a marca de exploração, número de identificação S.I.A., número de inscrição em livro genealógico (LG) e data da colheita.

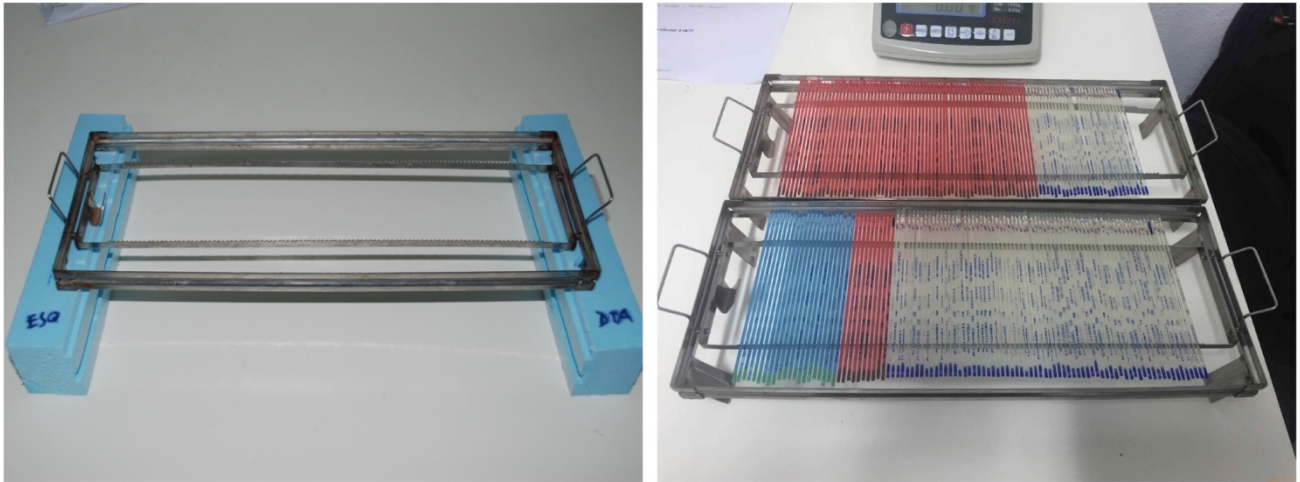


Figura 10 Reco / Jangada utilizado para disposição das doses de inseminação artificial durante as fases da congelação de arrefecimento lento, arrefecimento rápido e pré congelação. É possível diferenciar os carneiros pela cor da palhinha, cor do selo de PVC e pelas inscrições na palhinha. Fotografia cedida pelo Autor 2017.

A congelação é feita em 3 fases com velocidades de arrefecimento diferentes em regimes de temperatura diferentes. A primeira fase de arrefecimento lento, a segunda de arrefecimento rápido e pré-congelação e a terceira de congelação imediata por imersão em azoto líquido a -196°C .

Na primeira fase, o sémen que estará à temperatura ambiente, é lentamente arrefecido até aos 5°C num ritmo de aproximadamente $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Sieme, Oldenhof, and Wolkers 2016) durante um período de 4 horas. Esta curva de arrefecimento, é feita numa arca frigorífica programada para fazer a descida gradual da temperatura.

A segunda fase, de arrefecimento rápido e início de congelação, foi conseguida colocando o reco/jangada numa caixa térmica com cerca de 10 cm de altura de azoto líquido. (Figura 11) A jangada permite manter as palhinhas a uma altura de aproximadamente 5 cm do azoto, deixando-as expostas aos vapores do azoto durante 20 minutos. Nesta fase há um decréscimo de temperatura na ordem dos 10 a $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$, até atingir uma temperatura de cerca de -80°C . (Sieme, Oldenhof, and Wolkers 2016)



Figura 11 Esquerda: Disposição das doses de inseminação artificial nos recos/jangadas em que são arrefecidas nas duas primeiras fases da criopreservação. Direita: Colocação de um Reco/ jangada numa caixa térmica com 10 cm de azoto líquido, fase de arrefecimento rápido e início da congelação. É visível o vapor de azoto a que as palhinhas são sujeitas dentro da caixa térmica. Fotografia cedida pelo autor 2017

Na terceira e última fase, as doses foram rapidamente mergulhadas em azoto líquido atingindo imediatamente uma temperatura de -196°C . (Sieme, Oldenhof, and Wolkers 2016) A esta temperatura as reações metabólicas dos espermatozóides estão completamente paradas e por este motivo é possível preservar sêmen por longos períodos de tempo. As doses de IA preparadas no CRAHA foram agrupadas por animal, data, e sessão de colheita em visotubos individuais. Todo este processo de separação e organização das palhinhas foi feito mantendo as palhinhas mergulhadas em azoto líquido. Nesta fase, a diferenciação das palhinhas foi conseguida pela combinação de cor da palhinha e do selo. A cada carneiro foi atribuída uma combinação de cores que se manteve até ao final da congelação das 200 doses. Nunca foram feitas colheitas a dois carneiros com a mesma combinação de cores no mesmo dia. As colheitas de cada dia foram agrupadas em globelets e armazenadas dentro dos contentores de azoto líquido por dia de colheita.

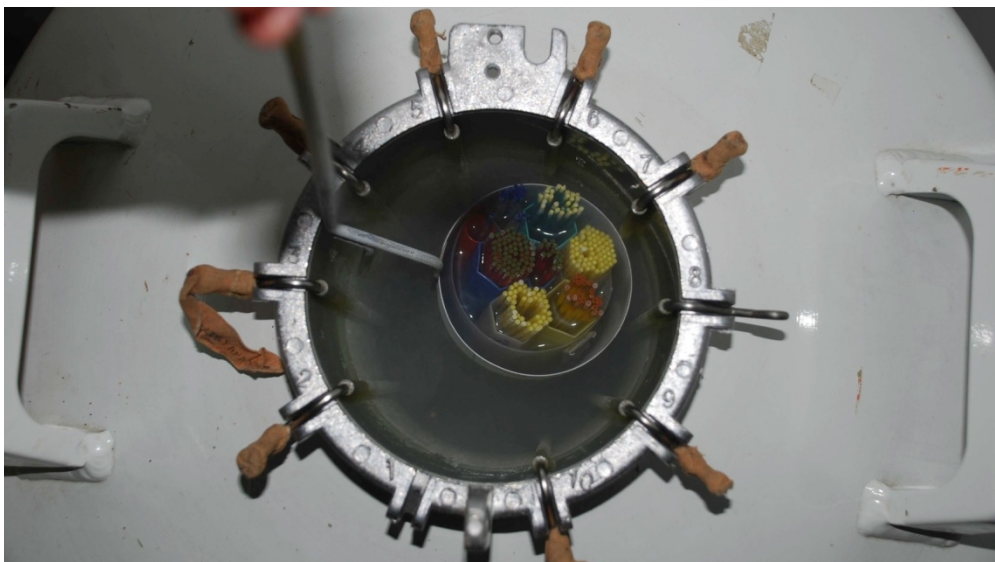


Figura 12 Contentor de armazenamento de sémen. Organização das doses de inseminação artificial por animal em visotubos de cores diferentes. As doses permanecem imersas em azoto líquido ate serem retiradas para utilização.

2.5. Relação entre os parâmetros do exame andrológico e a qualidade do sémen

A relação do exame andrológico com a qualidade do sémen foi estudada pela comparação dos parâmetros Tabelados pela Sociedade internacional de Teriogenologia (Circunferência escrotal, Motilidade, Morfologia, (ANEXOII, Tabela21)), concentração e volume do ejaculado com o número médio de doses de IA preparadas por colheita e por carneiro. Fez se o teste estatístico de Pearson para estudar a correlação entre os parâmetros. Assumiu-se uma correlação:

- Nula se $r < 0,03$
- Fraca se r entre 0,03 e 0,35
- Media de r entre 0,35 e 0,65
- Forte se r entre 0,65 e 0,95
- Muito forte se $r > 0,95$

2.6. Viabilidade do sémen à descongelação

A avaliação do sémen à descongelação foi feita num período médio de 8 meses após a criopreservação das doses de IA. Todas as amostras foram descongeladas em banho de água a 37°C durante 30 segundos, diluídas em 1 ml de OVIXCell® a 37°C e mantidas em banho de água à mesma temperatura.

Em todas as amostras descongeladas foi avaliada a motilidade progressiva, vitalidade e morfologia. O Procedimento laboratorial de preparação dos esfregaços foi semelhante ao procedimento efetuado antes da criopreservação. As amostras foram descongeladas uma de cada vez para que a avaliação da motilidade e vitalidade fossem feitas sem demoras e em condições semelhantes. A avaliação da morfologia foi feita mais tarde.

Todas as colheitas foram registadas numa base de dados em folha de Excel.

Para cada colheita foi registada a data, a identificação e raça do carneiro, o método de colheita (VA ou EE), o volume e concentração do ejaculado, a motilidade massal e individual, vitalidade, número teórico de doses a preparar e número de doses criopreservadas, o extensor de sémen utilizado (Anexo IV, Tabela 23) e morfologia por tipo de anomalia (Anexo VI, Tabela 25),

Os carneiros foram provenientes de várias explorações. Por não ter sido autorizada a divulgação dos números S.I.A. e L.G., a cada um foi atribuído um número de identificação romano para facilitar o tratamento dos dados.

Além dos carneiros que deram sémen para refrigeração e criopreservação, entraram no estudo mais 3 carneiros Merinos cuja identificação atribuída foi A, B e C. Estes carneiros tinham doses de sémen integradas no BPGA, que foram utilizadas para inseminar um grupo de fêmeas do CEBA por laparoscopia e estudar os Índices de Fertilidade, Natalidade e número médio de borregos por parto

Todas as colheitas que não originaram doses de sémen congeladas; cujos registos estejam incompletos ou cujos esfregaços antes ou pós congelação se tenham extraviado, foram rejeitadas. No anexo IV, Tabela 23, estão registados os dados relativos a todas as colheitas de sémen durante o período do estudo e o motivo de rejeição de algumas.

2.7. Perfil de alterações induzidas pela criopreservação e descongelação no sémen diluído com Glucose-Citrato-Gema de ovo e OVIXCell®.

O estudo da eficácia dos extensores de sémen foi feito com base na determinação da variação da Motilidade individual, Vitalidade e morfologia antes da criopreservação e depois da congelação.

Foram calculadas as médias destes parâmetros de todas as colheitas diluídas com Glucose-Citrato-Gema de ovo e com OVIXCell®. De seguida, determinou se a variação dos parâmetros através da seguinte fórmula:

Variação (Δ) = media após descongelação – media antes da criopreservação

Considerou-se vantajosa a utilização do diluidor que apresentou um perfil de alterações induzidas pela criopreservação e descongelação menos significativa. Ou seja, aquele que registou menor % de variação de motilidade, vitalidade e morfologia.

2.8. Índice de Fertilidade, Índice de Natalidade e número medio de borregos por parto.

Em Março de 2018 foi selecionado um núcleo de 127 ovelhas Merinas Brancas e Pretas da Herdade da Abóbada para integrar um programa de inseminação artificial e melhoramento genético. Estes animais foram divididos em 3 Grupos (1, 2 e 3), cuja constituição se encontra esquematizada na Tabela 6, e submetidos a um protocolo de sincronização de cios e inseminação artificial a tempo fixo.

O protocolo aplicado foi o seguinte:

- Dia 0: aplicação de esponjas vaginais de libertação de progesterona (Chronogest CR20®).
- Dia 12 a 14: remoção das esponjas e administração de 500 UI (1,7ml) de PMSG.
- +50 a 55 horas: (média 53h) inseminação cervical com sémen refrigerado (Grupos 1, 2A e 3A)
- +55 a 60 horas: (média 55h) inseminação laparoscópica com sémen descongelado (Grupos 2B e 3B)

As esponjas foram aplicadas a todos os animais no dia 12 de Março de 2018 e removidas nos dias 23, 24 e 25 de Março para os grupos 1, 2 e 3, respetivamente. As esponjas permaneceram na vagina dos animais por um período de 12 a 14 dias. No momento da remoção das esponjas foi aplicada uma dose de 500 UI de PMSG.

Todos os animais inseminados com sémen refrigerado, foram inseminados num intervalo entre 51 a 56 horas após a remoção das esponjas, registando uma média de 53 horas.

Todos os animais inseminados por laparoscopia intrauterina com sémen descongelado, foram inseminados num intervalo de 52 a 56 horas após a remoção das esponjas, registando uma média de 55 horas.

Animais (total)	Grupos		Data Inseminação	Total inseminações		Tipo Inseminação Artificial
127 OVELHAS	1	1	25 MARÇO	13		Cervical com sémen fresco
	2	2A	26 MARÇO	41	27	Cervical com sémen fresco
		2B			13	Intrauterina por laparoscopia com sémen descongelado
	3	3A	27 MARÇO	70	48	Cervical sémen com fresco
		3B			20	Intrauterina por laparoscopia com sémen descongelado

Tabela 6 Constituição dos grupos de inseminação dos dias 25, 26 e 27 de Março. Tipos de inseminação e de sémen aplicados.

As inseminações cervicais foram feitas com sémen colhido durante a manhã do próprio dia no CRAHA e aplicadas num intervalo de 3 a 4 horas após a colheita. As Inseminações intrauterinas por laparoscopia utilizaram doses de sémen criopreservado constituinte do BPGA, descongeladas em banho de água a 37°C por um período de 30 segundos imediatamente antes da inseminação.

Foram utilizadas doses de sémen criopreservadas de quatro carneiros Merinos integrados no BPGA. Um deles, o III, esteve presente no centro durante o período de estágio. Por este motivo, conhece-se detalhadamente o efeito da criopreservação e descongelação na qualidade do seu sémen utilizado. O carneiro III e os três carneiros, identificados como A, B e C, foram incluídos no estudo para cálculo dos Índices de Fertilidade, Natalidade e número médio de borregos por parto. As características dos ejaculados dos carneiros A, B e C não são conhecidas em detalhe relativamente á morfologia e vitalidade. No entanto, os três apresentaram valores de motilidade individual superiores a 30% após á descongelação.

Aos 45 dias após as inseminações fez se o diagnóstico de gestação por ecografia a todos os animais inseminados.

As fêmeas inseminadas foram juntas com um carneiro 14 dias após as inseminações, para que as que não tenham ficado gestantes da inseminação pudessem ser cobertas pelo carneiro. Assumindo uma gestação de 147 dias, (media descrita na bibliografia), foi espectável que os borregos fruto da inseminação nascessem entre os dias dos dias 17 e 19 de Agosto.

2.9. Programa de inseminação artificial

Todas as inseminações foram registradas em folha de Excel. Para cada animal foi registrada a data e hora de aplicação e remoção das esponjas, e de administração de PMSG, do tipo de inseminação (cervical ou laparoscópica), o operador que inseminou, o resultado do diagnóstico de gestação, data do parto e tipo de gestação (simples ou gemelar).

Para cada tipo de inseminação, cervical ou intrauterina por Laparoscopia, foi calculado o Índice de Fertilidade (IF), Índice de Natalidade (IN) e número médio de borregos por parto. Estes índices foram calculados da seguinte maneira:

$$\text{Índice de Fertilidade (IF)} = \frac{\text{Nº ovelhas com diagnóstico de gestação positivo}}{\text{Nº de ovelhas inseminadas}}$$

$$\text{Índice Natalidade (IN)} = \frac{\text{Nº de ovelhas Paridas}}{\text{Nº de ovelhas com diagnóstico de gestação positivo}}$$

$$\text{Média de borregos por parto} = \frac{\text{Nº de borregos nascidos}}{\text{Nº de ovelhas paridas}}$$

3. Resultados

3.1. Serologia e exame andrológico

Nenhum animal teve serologia positiva para os agentes pesquisados durante o período de quarentena (*Brucella ovis*, *Brucella melitensis*, e Vírus da *Border Disease*), pelo que nenhum foi excluído por questões sanitárias. Foram selecionados 3 carneiros Merino Branco, 3 carneiros Merino Preto, 4 carneiros Churros do Minho e 6 Carneiros Bordaleiros entre o Douro e Minho para o estudar o efeito da criopreservação e descongelação na viabilidade do sêmen após a descongelação e a eficácia dos extensores Glucose-Citrato-Gema de ovo e OVIXCell®.

A classificação dos seus exames andrológico está representada de um modo simplificado na Tabela 7, e de modo detalhado no Anexo III, Tabela 22. Importa lembrar que este estudo foi incluído num projeto de conservação de raças autóctones. As raças Bordeleira Entre o Douro e Minho e Churra do Minho são raças ameaçadas, perto de se extinguirem. Por este motivo não foram excluídas, independentemente da classificação obtida no exame andrológico.

Identificação do animal / raça		Classificação do exame andrológico
I	Merino Preto	Apto para Reprodução
II	Merino Branco	Apto para Reprodução
III	Merino Branco	Apto para Reprodução
IV	Merino Branco	Apto para Reprodução
V	Merino Preto	Apto para Reprodução
VI	Merino Preto	Apto para Reprodução
VII	Churro do Minho	Questionável
VIII	Churro do Minho	Não apto para Reprodução
X	Bordaleiro entre Douro e Minho	Não apto para Reprodução
XI	Bordaleiro entre Douro e Minho	Não apto para Reprodução
XIII	Bordaleiro entre Douro e Minho	Apto para reprodução
XIV	Bordaleiro entre Douro e Minho	Questionável
XV	Bordaleiro entre Douro e Minho	Questionável
XVI	Bordaleiro entre Douro e Minho	Questionável
XXVII	Churro do Minho	Questionável
XXVIII	Churro do Minho	Questionável

Tabela 7 Classificação do exame andrológico dos carneiros selecionados para o estudo.

O Carneiro VIII, Churro do Minho, obteve a classificação “Não apto para Reprodução” devido à fraca vitalidade dos espermatozóides (40%) e concentração do ejaculado $0,5 \times 10^9$ spz/ml (Anexo III, Tabela 22).

O Carneiro X, Bordaleiro Entre Douro e Minho, obteve a classificação “Não apto para Reprodução” devido à medida da circunferência escrotal (24cm) e morfologia em que obteve uma contagem de 30,4% de formas espermáticas anormais (Anexo III, Tabela 22).

O Carneiro XI, Bordaleiro Entre Douro e Minho, obteve a classificação “Não apto para Reprodução” devido à medida da circunferência escrotal (22cm) e morfologia em que obteve uma contagem de 33% de formas espermáticas anormais (Anexo III, Tabela 22).

3.2. Relação entre os parâmetros do exame andrológico e a qualidade do sémen

Relativamente aos carneiros selecionados para este estudo, verifica-se que a concentração do sémen tem uma correlação forte ($r=0,80$) com o número médio de doses IA preparadas por colheita, tal como seria espectável (Tabela 9).

A Circunferência escrotal, a motilidade espermática, o volume do ejaculado e a morfologia têm correlação média ($r=0,59$, $r=0,59$, $r=0,58$ e $r=0,46$ respetivamente) com o número médio de doses IA preparadas por colheita (Tabela 9).

ID.	Raça	C. Escrotal (cm)	Motilidade (%)	Morfologia (%normal)	Concentração ($\times 10^9$ spz/ml)	Vol. (ml)	média doses/colheita
I	MP	32	89	91,3	4,5	0,64	51
II	MB	35	79	95,6	2,9	1,23	53
III	MB	32	85	93	2,2	0,98	39
IV	MB	34	72	88,7	2,8	0,43	17
V	MP	34	84	89,9	3,5	1,17	66
VI	MP	35	85	82,2	2,2	0,89	35
VII	CM	25	80	79,5	2,6	0,55	17
VIII	CM	30	70	89,2	0,5	0,88	7
X	BEDM	24	65	69,6	1,6	0,67	24
XI	BEDM	22	80	67	2,1	0,40	13
XIII	BEDM	30	80	80,2	1,1	0,65	9
XIV	BEDM	23,5	75	83,5	1,4	0,60	7
XV	BEDM	27	46	93,2	2,1	1,55	30
XVI	BEDM	30	70	87,7	1,1	0,48	7
XXVII	CM	27,5	60	84,5	0,7	0,45	4
XXVIII	CM	31,5	90	95,5	3,8	0,55	38

Tabela 8 Parâmetros utilizadas para relacionar o exame andrológico com a qualidade do sémen.

Parâmetro	Média de doses IA preparadas por colheita	
	r	Tipo Correlação
Concentração (spz/ml)	0,8	Forte
Circunferência Escrotal (cm)	0,59	Média
Motilidade (%)	0,59	Média
Volume (ml)	0,58	Média
Morfologia normal (%)	0,46	Média

Tabela 9 Estatística de Pearson. Cálculo do valor r para determinar a força da correlação entre os parâmetros do exame andrológico e a qualidade do sémen

3.3. Viabilidade do sémen à descongelação

As Tabelas apresentadas representam valores médios de motilidade individual, vitalidade e morfologia antes da criopreservação e depois da descongelação. As colunas designadas “variação” representam a percentagem média das alterações resultantes dos danos causados pela congelação. Um sinal positivo significa um aumento da percentagem e um sinal negativo, diminuição. Nos Anexo VI, Tabela 25 e Anexo VII, Tabela 26, pode observar-se pormenorizadamente o resultado da avaliação de todas as colheitas.

A avaliação após a descongelação revelou um decréscimo acentuado na viabilidade do sémen (Tabela 10). Em média, registou-se um decréscimo de 53,2% na motilidade progressiva, de 43,8% na vitalidade dos espermatozoides e um aumento de 18,1% na contagem de espermatozoides com morfologia anormal comparativamente aos resultados obtidos para os mesmos parâmetros antes da criopreservação.

Relativamente à avaliação detalhada da morfologia, a criopreservação provocou um aumento marcado no total de defeitos de cabeça (+14,8%) e um ligeiro aumento dos defeitos de cauda (+3,8%) A variação dos defeitos de peça intermédia, (-0,4%) não foi relevante.

A avaliação detalhada da morfologia (Tabela 11), revela alterações com especial importância na cabeça dos espermatozoides, tais como, o aumento do número de cabeças isoladas (+4,8%), de cabeças microcefálicas (+8,3%), de espermatozoides teratóides/amorfos (+2,2%) e de alterações de Acrossoma (+7,7%). Nos defeitos de cauda destacam-se apenas a ventroflexão distal (+2,4%).

Sémen	Mot. Progressiva (%)	Vitalidade (%)	Defeitos morfológicos por segmento espermático			
			Cabeça (%)	P. Intermédia (%)	Cauda (%)	Total (%)
Fresco	76,0	72,8	3,6	2,9	7,3	13,9
Descongelado	22,8	29,0	18,4	2,5	11,1	32,0
Variação (%)	-53,2	-43,8	14,8	-0,4	3,8	18,1

Tabela 10, Variação dos parâmetros motilidade individual, vitalidade e morfologia antes da congelação e após a descongelação. Valores médios de todas as colheitas

Morfologia geral por defeito, média de todas as colheitas			
Defeito espermático	Sémen fresco	Sémen descongelado	Varição
Cabeça isolada	2,7	7,5	4,8
Microcefalia	0,7	9,0	8,3
Macrocefalia	0,9	1,3	0,4
Teratóides/amorfos	0,7	2,8	2,2
C. Piriformes	1,1	1,2	0,1
Alterações acrossoma	0,7	8,0	7,3
Fratura peça intermédia	0,8	1,3	0,5
Outros defeitos de peça intermédia	0,8	0,8	0,1
Gota c proximal	0,9	1,0	0,1
Gota citoplasmática distal	3,8	3,1	-0,7
Cauda enrolada	2,4	2,5	0,1
Defeito DAG	1,3	1,2	-0,2
Dobrada	4,9	4,7	-0,2
Ventroflexão	2,2	4,6	2,4

Tabela 11 Avaliação detalhada da morfologia do sémen fresco e descongelado por defeito espermático. Valores médios de todas as colheitas

3.4. Perfil de alterações induzidas pela criopreservação e descongelação no sémen diluído com Glucose-Citrato-Gema de ovo e OVIXCell®.

Os ejaculados diluídos com OVIXCell® apresentam um perfil de alterações induzidas pela criopreservação superior aos ejaculados diluídos com Glucose-Citrato-Gema de ovo em todos os parâmetros analisados: Motilidade, Vitalidade e Morfologia (Tabela 12).

A criopreservação com OVIXCell® representou em média:

- Perda de 61,6% de motilidade dos espermatozóides,
- Perda de 50,6% de vitalidade,
- Aumento de 37,8% de espermatozóides com morfologia anormal.

Já a criopreservação com Glucose-Citrato-Gema de ovo representou em média:

- Perda de 52,1% de motilidade dos espermatozoides,
- Perda de 43,3% de vitalidade,
- Aumento de 14,1% de espermatozoides com morfologia anormal.

Quando comparado com Glucose-Citrato-Gema de ovo, o perfil de alterações no sémen diluído com OVIXCell® foi:

- 9,5% superior relativamente à perda de motilidade progressiva,
- 7,3% superior relativamente à diminuição da vitalidade espermática
- 23,7% superior em relação á contagem de espermatozóides com morfologia anormal

				MORFOLOGIA GERAL			
EXTENSOR	SÉMEN	MOT IND.	VITALIDADE	CABEÇA	P. INTERMÉDIA	CAUDA	TOTAL
OVIXCell®	FRESCO	82,5	73,4	3,6	1,1	2,2	6,9
	DESCONGELADO	20,9	22,8	31,9	2,0	10,8	44,7
	VARIAÇÃO	-61,6	-50,6	28,3	1,0	8,6	37,8
Glucose-Citrato-Gema de ovo	FRESCO	75,3	73,8	3,2	3,3	8,3	14,8
	DESCONGELADO	23,2	30,6	15,1	2,6	11,2	28,9
	VARIAÇÃO	-52,1	-43,3	11,9	-0,7	2,9	14,1
OVIXCell® x Glucose-Citrato-Gema de ovo	DIFERENÇA	9,5	7,3	16,4	0,3	5,7	23,7

Tabela 12 Variação dos parâmetros motilidade individual, vitalidade e morfologia antes da congelação e após a descongelação para sémen diluído com OVIXCell® e Glucose-Citrato-Gema de ovo.

Relativamente à avaliação detalhada da morfologia, antes da criopreservação e após a descongelação, (Tabela 11). Registou se um aumento significativo na contagem de defeitos de cabeça e cauda independentemente do extensor utilizado.

A utilização de OVIXCell® (Tabela 13) representou um aumento superior de formas anormais, quando comparado com Glucose-Citrato-Gema de ovo. Destacam-se as cabeças isoladas (+14,8 %), cabeças microcefálicas (+20,4%), cabeças macrocefálicas (+1,3%) espermatozóides teratóides/amorfos (+6,3%), defeitos de acrossoma de (+8,7%), caudas dobradas (+4,6%) e caudas ventroflexidas de (+4,1%). A utilização de OVIXCell® representa à descongelação um amento de 28% e 8,6% na contagem de defeitos de cabeça e cauda respetivamente.

Na utilização de Glucose-Citrato-Gema de ovo, destacam-se apenas os defeitos de acrossoma (+5,2%) e caudas ventroflexidas (+2,5%) à descongelação.

MORFOLOGIA GERAL DAS COLHEITAS POR EXTENSOR						
Defeito Espermático	OVIXCell®			Glucose-Citrato-Gema de ovo		
	Sémen fresco	Sémen descongelado	Variação	Sémen fresco	Sémen descongelado	Variação
Cabeça isolada	3,0	17,8	14,8	2,6	3,0	0,4
Microcefalia	0,8	21,2	20,4	0,7	0,5	-0,2
Macrocefalia	0,0	1,3	1,3	0,9	0,5	-0,4
Teratóides/Amorfos	0,5	6,8	6,3	0,8	0,8	0,0
Cabeças Piriformes	0,9	0,6	-0,3	1,1	1,6	0,5
Alterações Acrossoma	0,5	9,2	8,7	0,7	5,9	5,2
Fratura P. Intermedia	0,6	1,3	0,7	0,9	1,5	0,6
Outros defeitos P. int.	1,5	0,0	-1,5	0,6	0,0	-0,6
Gota cit. proximal	0,5	0,5	0,0	1,0	1,2	0,2
Gota cit. distal	1,8	1,9	0,2	4,4	4	-0,4
Cauda enrolada	0,7	1,6	0,9	2,6	3,3	0,7
Defeito DAG	1,1	1,4	0,3	1,4	0,9	-0,5
Cauda Dobrada	0,7	5,3	4,6	5,2	5,1	-0,1
Ventroflexão	1,2	5,3	4,1	2,5	5,0	2,5

Tabela 13 Avaliação detalhada da morfologia por defeito espermático. Comparação da média dos valores obtidos nas diluições feitas com OVIXCell® e extensor Glucose-Citrato-Gema de ovo.

3.5. Índice de Fertilidade, Índice de Natalidade e número medio de borregos por parto.

A Tabela 14 representa o resultado das inseminações artificiais no grupo de 120 ovelhas, das quais 82 foram inseminadas com sémen refrigerado e 38 com sémen descongelado.

No grupo de ovelhas inseminadas com sémen fresco conseguiu-se um Índice de Fertilidade de 52,4% e de Natalidade 57,3%, com 47 borregos nascidos e uma média de 1,4 borregos por parto.

No grupo de ovelhas inseminadas com sémen descongelado por laparoscopia conseguiu-se um Índice de Fertilidade de 34,2%, Índice de Natalidade de 42,1% e uma média de 1,6 borregos por parto.

A Tabela 15 caracteriza o sémen descongelado do carneiro III. Os valores apresentados são valores médios da avaliação de todas as colheitas deste carneiro no período de Setembro a 31 de Dezembro de 2017, período em que deu sémen para o BPGA. Com uma motilidade progressiva de 11,3%, vitalidade de 18,4% e morfologia anormal de 22% obteve um Índice de Fertilidade de 44,4%, Índice de Natalidade de 33,3% e uma média de 1 borrego por parto. A Tabela 16, caracteriza as doses de sémen descongeladas do carneiro III aplicadas nas 9 fêmeas inseminadas com sémen deste carneiro.

A avaliação do sémen dos restantes carneiros utilizados na inseminação artificial por laparoscopia é desconhecida. No entanto, os seus Índices de Fertilidade, Natalidade e média de borregos por parto estão representados na Tabela 17.

I.A. Cervical com sémen Fresco / I.A. Intrauterina por Laparoscopia com Sémen Criopreservado							
Sémen	# Fêmeas inseminações	Diagnóstico de gestação +	# Partos	# Nascimento	Índice Fertilidade	Índice Natalidade	Borregos / Parto
Fresco	82	43	33	47	52,4	57,3	1,4
Descongelado	38	13	10	16	34,2	42,1	1,6

Tabela 14 Representação dos dados relativos às inseminações artificiais de Março de 2018. Valor dos Índices de Fertilidade, Natalidade e número médio de borregos por parto para inseminação cervical com sémen refrigerado e inseminação intrauterina por laparoscopia com sémen descongelado

ID	Raça	SÉMEN FRESCO			SEMEN DESCONGELADO		
		Motilidade Progressiva (%)	Vitalidade (%)	Morfologia (% spz. Anormais)	Motilidade progressiva (%)	Vitalidade (%)	Morfologia (% spz. anormais)
III	Merino Branco	85,6	78,3	9,3	11,3	18,4	22

Tabela 15 Caracterização do sémen descongelado do carneiro III dador de sémen para BPGA, cujas doses foram utilizadas para inseminação intrauterina por Laparoscopia. Média de todas as colheitas entre Setembro e Dezembro de 2017.

MERINO BRANCO				III			
Volume do ejaculado (ml)				1,65			
Concentração do ejaculado x10 ⁹ spz/ml				2,3			
Avaliação		Sémen fresco		Sémen descongelado		Variação (%)	
Motilidade Progressiva (%)		90		10		-80	
Vitalidade (%)		87		12		-75	
Morfologia anormal (%)	Defeitos de cabeça (%)	1,5	17,5	9	21,5	7,5	4
	Defeitos de peça intermédia (%)	1		0		-1	
	Defeitos de cauda (%)	15		12,5		-2,5	

Tabela 16 Avaliação da qualidade do sémen do carneiro III aplicado nas inseminações intrauterinas por laparoscopia. Dados relativos às doses de sémen utilizadas.

Inseminação intrauterina por laparoscopia e por carneiro							
ID	# fêmeas inseminadas	Diagnóstico de gestação +	# partos	# Nascimento	Índice Fertilidade	Índice Natalidade	Borregos / Parto
III	9	4	3	3	44,4	33,3	1,0
A	9	4	3	6	44,4	66,7	2,0
B	11	3	3	6	27,3	54,5	2,0
C	9	3	1	1	33,3	11,1	1,0
TOTAIS	38	14	10	16			

Tabela 17 Representação dos dados relativos às inseminações artificiais intrauterinas com sémen descongelado. Índices de Fertilidade, Natalidade e número médio de borregos nascidos por parto. Dados detalhados por carneiro

4. Discussão

4.1. Relação entre os parâmetros do exame andrológico e a qualidade do sémen

O exame andrológico determina se um animal macho é capaz de satisfazer os objetivos reprodutivos em situação de rebanho. Há uma correlação positiva entre os parâmetros do exame andrológico que permitem afirmar com alguma segurança que um animal “apto para reprodução”, produza sémen de boa qualidade. No entanto, este exame não é uma garantia da qualidade do sémen. Um bom ejaculado produza necessariamente uma quantidade grande de doses para IA. O carneiro XIII, BEDM, com uma circunferência escrotal de 30 cm, (excelente relativamente aos 24,7cm médios desta raça(Bettencourt, Romão, E., H., M., N., et al. 2018)), motilidade de 80% e 80,2% de espermatozoides com morfologia normal produziu em média, apenas 9 doses de sémen por ejaculado apesar de ter sido considerado “Apto para reprodução”. Este carneiro peca pela concentração ($1,1 \times 10^9$ spz/ ml) e volume (0,65 ml) do ejaculado. Serve este exemplo para afirmar que o exame andrológico deve ser minucioso e baseado não apenas na circunferência escrotal, motilidade e morfologia, mas sim no maior número de parâmetros possível.

4.2. Avaliação laboratorial da qualidade do sémen.

A avaliação detalhada do sémen sugere que a percentagem de espermatozoides funcionais numa amostra criopreservada e descongelada é consideravelmente reduzida. A motilidade foi um dos parâmetros mais gravemente afetados com uma redução média de 53%. Apesar da sua importância, o mecanismo através do qual a motilidade espermática diminuiu não é totalmente conhecido.

O movimento dos espermatozoides é parcialmente dependente da atividade mitocondrial. As mitocôndrias estão estrategicamente localizadas à volta da peça intermédia com a finalidade de fornecer energia aos filamentos da cauda, responsáveis pela propulsão dos espermatozoides no seu trajeto até atingirem os oócitos e penetrar a zona pelúcida. As mitocôndrias são a fonte maioritária de energia oxidativa. (O’Connell, McClure, and Lewis 2002)

A membrana mitocondrial é suscetível à congelação e descongelação tal como a membrana citoplasmática. A resistência à congelação depende da acessibilidade da mesma aos crioprotetores. (O’Connell, McClure, and Lewis 2002). Os espermatozoides

imóveis, cuja membrana citoplasmática esteja aparentemente íntegra, poderão ter sofrido lesões mitocondriais. Por este motivo perdem a capacidade de propulsão ou apresentam um movimento pouco vigoroso. As membranas citoplasmática e mitocondrial são independentes, e a ocorrência de lesão mitocondrial não significa necessariamente que tenha ocorrido lesão na membrana citoplasmática. (Vetter et al. 1998) Esta teoria poderá explicar o motivo pelo qual quase todas as amostras descongeladas apresentam uma vitalidade superior à motilidade após a descongelação. Pelo contrário, quando se considera o sémen fresco, A motilidade atribuída foi sempre superior à vitalidade.

Nas condições em que este estudo foi feito, a avaliação da motilidade individual dos espermatozoides é subjetiva e não permite avaliar a veracidade desta teoria.

As mitocôndrias são organitos indutores da morte celular por apoptose. Os danos causados pela criopreservação nas membranas mitocondriais poderão desencadear este mecanismo (Merati et al. 2018) e incrementa a fraca viabilidade do sémen após a descongelação. (O'Connell, McClure, and Lewis 2002)

A extensão das lesões na membrana citoplasmática provocadas pela congelação e descongelação foram avaliadas através da vitalidade dos espermatozoides que registou um decréscimo médio de 44,1% relativamente à vitalidade antes da congelação. É espectável que apenas 50% dos espermatozoides sobrevivam á congelação pelo que o decréscimo na vitalidade está de acordo com a bibliografia. A criopreservação e descongelação são pontos críticos na viabilidade do sémen. A formação de cristais de gelo danifica permanentemente as membranas celulares.

Relativamente à morfologia dos ejaculados, a congelação induziu um aumento significativo dos defeitos de cabeça e cauda, +14,8% e +3,8% respetivamente.

No que diz respeito aos defeitos de cabeça destacam-se o aumento da percentagem de cabeças microcefálicas (+8,3%), defeitos de acrossoma (+7,3%), cabeças isoladas (+4,8%) e de espermatozoides amorfos (+2,2%).

Relativamente aos defeitos de cauda, registou-se um aumento de 2,4% de caudas ventroreflectidas que poderá estar associado a um insulto osmótico causado pelos extensores. A avaliação microscópica das doses descongeladas foi feita em preparações microscópicas utilizando de OVIXCell® como meio de montagem. O facto de algumas amostras terem sido diluídas com Glucose-Citrato-Gema de ovo e posteriormente avaliadas com OVIXCell® favorece a possibilidade de ocorrência de insulto osmótico.

Não se registou uma variação significativa nos defeitos e peça intermédia. No entanto, nas condições em que o estudo foi feito não foi possível avaliar as lesões

mitocondriais que poderão ser parcialmente responsáveis pela perda de motilidade dos espermatozoides descongelados.

4.3. Perfil de alterações induzidas pela criopreservação e descongelação no sémen diluído com Glucose-Citrato-Gema de ovo e OVIXCell®.

Relativamente à comparação dos dois extensores, pode concluir-se que a diluição do sémen com Glucose-Citrato-Gema de ovo se mostrou vantajosa relativamente à diluição com OVIXCell®. As colheitas diluídas com OVIXCell® apresentaram um perfil de alterações induzidas pela criopreservação e descongelação superior, quando comparado com Glucose-Citrato-Gema de ovo. A utilização de OVIXCell® representou:

- Perda de motilidade espermática superior em 9,5%.
- Perda de vitalidade espermática superior em 7,3%.
- Contagem de espermatozoides com morfologia anormal superior em 23,7%.

Relativamente à morfologia do sémen descongelado, várias amostras avaliadas neste estudo obtiveram uma contagem de espermatozoides morfologicamente anormais superior a 30% não cumprindo a qualidade recomendada pela Sociedade Internacional de Teriogenologia.

A determinação da morfologia e vitalidade foram feitas separadamente em duas contagens distintas de 200 espermatozoides. Por este motivo não é possível determinar a percentagem de espermatozoides vivos com morfologia anormal. A determinação desta proporção em estudos futuros poderá fornecer informação útil acerca no número de espermatozoides móveis com morfologia anormal. Esta é a proporção que realmente interessa na determinação da qualidade do sémen, já que os espermatozoides mortos não afetam a fertilidade independentemente de serem morfologicamente normais ou anormais.

4.4. Índice de Fertilidade, Índice de Natalidade e número médio de borregos por parto.

Relativamente ao programa de melhoramento genético e inseminações artificiais (Tabela 14), a inseminação artificial com sémen refrigerado obteve um índice de

fertilidade de 52,4% de acordo com a margem de 40 a 60% descrita na bibliografia. A inseminação intrauterina por laparoscopia com sémen descongelado, obteve um índice de fertilidade de 34,2%, também de acordo com a margem de 20 a 40% descrita na bibliografia.

O intervalo curto entre a colheita de sémen e sua aplicação cervical favoreceu os resultados positivos respeitantes à inseminação cervical com sémen refrigerado.

Relativamente ao sémen descongelado, mesmo com as perdas significativas de motilidade e vitalidade associadas ao processo de criopreservação e descongelação (Tabela 8), é possível obter resultados satisfatórios, (Tabela 14).

As doses de sémen preparadas no CRAHA para integrar o BPGA foram diluídas de modo a conterem 50×10^6 spz viáveis/dose antes da congelação, em vez dos convencionados 20 a 40×10^6 spz viáveis/dose.

Assumindo as premissas definidas pela sociedade de Teriogenologia:

- O sémen descongelado necessita no mínimo de 25% de espermatozoides com motilidade progressiva.
- 20 a 40×10^6 spz viáveis por dose são suficientes para se obterem índices de fertilidade aceitáveis na inseminação intrauterina por laparoscopia.

Pode-se afirmar que as doses descongeladas devem ter no mínimo 5 a 10×10^6 espermatozóides com motilidade progressiva após a descongelação para que os índices de fertilidade sejam aceitáveis.

No CRAHA, o sémen foi diluído de modo a que a doses contenham 50×10^6 espermatozóides viáveis/dose. Assim sendo, mesmo as doses descongeladas cuja avaliação da motilidade progressiva obteve um resultado tão baixo como 10% (Anexo V, Tabela 24), garantem os 5×10^6 espermatozoides viáveis mínimos para que os índices de fertilidade sejam aceitáveis.

A colocação de maior quantidade de espermatozóides viáveis por dose de inseminação poderá compensar a fraca viabilidade dos espermatozoides em carneiros cujo sémen congele mal. Talvez por este motivo se tenham obtido resultados tão satisfatórios nas inseminações com sémen descongelado (Tabela 14).

Relativamente à média de borregos nascidos por parto, A inseminação com sémen descongelado por laparoscopia obteve uma média ligeiramente superior (1,6 borregos/parto) que a inseminação cervical (1,4 borregos/ parto) (Tabela 14). A aplicação intrauterina de sémen em ovelhas inseminadas por laparoscopia justifica a média superior. Neste caso, os espermatozoides são aplicados diretamente nos cornos uterinos e não são obrigados a ultrapassar as barreiras fisiológicas do trato genital das fêmeas. No entanto, A quantidade de inseminações intrauterinas por laparoscopia,

feitas é pequena para que se possam tirar conclusões reais relativamente à média de borregos por parto.

5. Conclusão

A criopreservação de material germinal e a inseminação artificial são técnicas extremamente úteis na conservação de espécies, especialmente quando combinadas com a conservação “in vivo”. Estas técnicas reprodutivas são uma grande valência, uma vez que permitem estabelecer bancos de material genético que preservem a variabilidade genética existente e atuar face a situações de calamidade. Os bancos de germoplasma oferecem a possibilidade de recuperar espécies perdidas ou reorientar a evolução das espécies existentes.

A facilidade do transporte do material criopreservado torna desnecessária a movimentação de animais a nível global e reduz a transmissão de doenças venéreas.

Relativamente à indústria pecuária, a inseminação artificial com sémen criopreservado é hoje em dia a tecnologia reprodutiva mais eficiente no melhoramento genético dos rebanhos. No caso específico dos ovinos, a anatomia do cérvix e a fraca viabilidade do sémen após descongelação impossibilitam a generalização da sua aplicação. Atualmente nos ovinos, a utilização de sémen congelado está limitada à aplicação intrauterina por laparoscopia.

Quanto à utilização de sémen refrigerado, o intervalo curto de tempo que o sémen se mantém viável, limita a colheita e aplicação a locais próximos onde seja possível inseminar poucas horas após a colheita de sémen.

Em Portugal, a disponibilidade geográfica de carneiros dadores de sémen com mérito genético reconhecido ou características superiores com interesse produtivo é reduzida. A disponibilidade de centros de reprodução animal em território nacional também é reduzida, o que dificulta a aplicação de sémen refrigerado em áreas distantes dos poucos centros de reprodução disponíveis.

O futuro da inseminação artificial em ovinos depende do desenvolvimento de técnicas de inseminação com sémen descongelado mais simples, menos invasivas e menos dispendiosas que permitam melhores taxas de sucesso. A modificação da composição dos extensores é fundamental para melhorar a viabilidade do sémen à descongelação e permitir melhores Índices de Fertilidade.

A execução de exames andrológicos rotineiros em pequenos ruminantes melhora significativamente a produtividade dos sistemas de produção de ovinos uma vez que permite a identificação de animais inférteis e subférteis. Esta é ainda uma prática pouco comum em Portugal exceto nos centros de reprodução de pequenos

ruminantes. Nestes centros, é prática rotineira uma vez que é essencial para avaliar os animais dadores de sémen para inseminação artificial ou banco de germoplasma.

O exame andrológico deve ser eliminatório em situação de rebanho individual ou em raças não ameaçadas em que se trabalha no sentido da melhoria genética e produtiva. A decisão de eliminar um reprodutor deve ser muito bem ponderada quando pelo contrário se trabalha com raças ameaçadas das quais importa preservar material genético do maior número de animais possível. Importa salientar que a validade do exame andrológico é limitada à data da sua execução. Qualquer processo inflamatório simples pode comprometer temporariamente a espermatogénese. Assim sendo, nenhum animal considerado “Não apto para reprodução” deve ser excluído sem lhe ser feita nova prova num período mínimo de 60 dias após a resolução da sua condição.

Pode afirmar-se com alguma segurança de que um animal apto para reprodução produz sémen de boa qualidade, no entanto o exame andrológico não pode ser entendido como uma garantia de qualidade do sémen.

Ainda relativamente ao exame andrológico, na determinação da circunferência escrotal, o intervalo de valores proposto pela Sociedade Internacional de Teriogenologia, e aceite pela comunidade veterinária internacional considera valores médios de raças de ovinos diferentes das raças autóctones portuguesas. É espectável que raças de ovinos de pequeno porte como são exemplo a raça Bordeleira de Entre Douro e Minho e Churra do Minho, utilizadas neste estudo, tenham circunferências escrotais menores quando comparadas com raças de porte médio/ grande como a Merina ou Campaniça

Os índices de fertilidade reduzidos associados ao sémen de carneiro descongelado devem-se em parte aos danos celulares, ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais que os espermatozóides sofrem quando expostos a insulto térmico e osmótico. Estas alterações resultam em mobilidade deficiente, fraca viabilidade dos espermatozóides no trato genital das fêmeas e indução de mecanismos apoptóticos em espermatozóides com lesão nas membranas mitocondrial. Grande parte dos espermatozóides viáveis antes da congelação não são funcionais após a descongelação. É espectável que apenas 50% dos espermatozóides num ejaculado sobrevivam a criopreservação. Esta percentagem é influenciada por fatores genéticos individuais.

Independentemente do extensor utilizado, a criopreservação provoca alterações significativas na viabilidade do sémen após a descongelação. Os padrões de motilidade reduzem para cerca de 50%, a vitalidade cerca de 40%. A contagem de espermatozoides com morfologia anormal aumenta em cerca de 20%. O aumento da morfologia anormal é atribuído maioritariamente aos defeitos de cabeça, em que se

destacam as cabeças isoladas, as alterações de acrossoma, as microcefalias e os espermatozóides amorfos.

Permanece a necessidade de melhorar as técnicas de criopreservação de gâmetas a fim de se poderem implementar programas de melhoramento genético mais efetivos e melhorar a acessibilidade dos produtores de ovinos a material genético de interesse.

A aplicação intrauterina de doses de sémen descongeladas com uma maior quantidade de espermatozóides viáveis antes da congelação, poderá influenciar positivamente os índices de Fertilidade e de Natalidade.

IV. Bibliografia

Abusineina, M.E. 1969. "Effect of Pregnancy on the Dimensions and Weight of the Cervix Uteri of Sheep." *British Veterinary Journal* 125(1): 21–24. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007193517491597> (May 18, 2018).

Aiello, Susan E., and Michael A. Moses. 2016. *The Merck Veterinary Manual*. 11th ed. eds. Allen G. DANA, Peter D. Constable, Andrew Dart, and Peter R. Davis. MERCK & cO., INC.

Akhoondi, Maryam et al. 2011. "Membrane Hydraulic Permeability Changes during Cooling of Mammalian Cells." *Biochimica et biophysica acta* 1808(3): 642–48.

Alcay, Selim, M Berk Toker, et al. 2015. "Cryobiology Successful Ram Semen Cryopreservation with Lyophilized Egg Yolk-Based Extender."

Alcay, Selim, M Berk Toker, et al. 2015. "Successful Ram Semen Cryopreservation with Lyophilized Egg Yolk-Based Extender." *Cryobiology* 71(2): 329–33.

Amstislavskii, S Ia, and I S Trukshin. 2010. "[Cryobanking mammalian embryos: priorities and the optimal choice of reproductive technologies]." *Ontogenez* 41(1): 19–31.

Andrabi, S M H, and W M C Maxwell. 2007. "A Review on Reproductive Biotechnologies for Conservation of Endangered Mammalian Species." *Animal reproduction science* 99(3–4): 223–43.

Anel, L. et al. 2006. "Improvement Strategies in Ovine Artificial Insemination." *In Reproduction in Domestic Animals*,.

Anel, L et al. 2005. "Factors Influencing the Success of Vaginal and Laparoscopic Artificial Insemination in Churra Ewes: A Field Assay." *Theriogenology* 63(4): 1235–47.

Barbas, J P, and R D Mascarenhas. 2009. "Cryopreservation of Domestic Animal Sperm Cells." *Cell and tissue banking* 10(1): 49–62.

Bettencourt, C., R. Romão, Bettencourt E., Lalandá H., Vítor M., Monteiro N., et al. 2018. "CARACTERIZAÇÃO DE EJACULADOS DE CARNEIROS DE RAÇA BORDALEIRA DE ENTRE DOURO E MINHO UTILIZADOS EM PROGRAMA DE CONSERVAÇÃO GENÉTICA EM PORTUGAL." : 90.

Bettencourt, C., R. Romão, Bettencourt E., Lalandá H., Vítor M., and D. Silva. 2018. "CARACTERIZAÇÃO DE EJACULADOS DE CARNEIROS DE RAÇA CHURRA DO MINHO UTILIZADOS EM PROGRAMA DE CONSERVAÇÃO GENÉTICA EM PORTUGAL."

Burgess, G. W. 1982. "Ovine Contagious Epididymitis: A Review." *Veterinary Microbiology* 7(6): 551–75.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378113582900499> (November 28, 2017).

Cunningham, James G., and Bradley G. Klein. Textbook of Veterinary Physiology. 4th ed. Elsevier.

Edmondson, Misty A., John F. Roberts, and Stan Bychawski. 2012. "Chapter 8 – Theriogenology of Sheep and Goats." In *Sheep and Goat Medicine*, 150–230.

Eppleston, J., S. Salamon, N.W. Moore, and G. Evans. 1994. "The Depth of Cervical Insemination and Site of Intrauterine Insemination and Their Relationship to the Fertility of Frozen-Thawed Ram Semen." *Animal Reproduction Science* 36(3–4): 211–25. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432094900698> (May 18, 2018).

Falchi, L., M. Taema, S. La Clanche, and R. J. Scaramuzzi. 2012. "The Pattern of Cervical Penetration and the Effect of Topical Treatment with Prostaglandin and/or FSH and Oxytocin on the Depth of Cervical Penetration in the Ewe during the Peri-Ovulatory Period." *Theriogenology* 78(2): 376–84.

Fang, Yi et al. 2018. "Boar Seminal Plasma Inhibits Cryo-Capacitation of Frozen-Thawed Ram Sperm and Improves Fertility Following Intracervical Insemination." *Theriogenology* 105: 84–89.

Gouletsou, P. G., and G. C. Fthenakis. 2015. "Microbial Diseases of the Genital System of Rams or Bucks." *Veterinary Microbiology* 181(1–2): 130–35.

Gourley, D.D., and R.L. Riese. 1990. "Laparoscopic Artificial Insemination in Sheep." *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 6(3): 615–33.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072015308367?via%3Dihub> (May 16, 2018).

Grasa, P, J I Marti, T Muino-Blanco, and J A Cebrian-Perez. 2003. "Different Functional States of Ram Spermatozoa Analysed by Partition in an Aqueous Two-Phase System." *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 795(1): 83–91.

Halbert, G W, H Dobson, J S Walton, and B C Buckrell. 1990. "The Structure of the Cervical Canal of the Ewe." *Theriogenology* 33(5): 977–92.

Holt, W V, and A R Pickard. 1999. "Role of Reproductive Technologies and Genetic Resource Banks in Animal Conservation." *Reviews of reproduction* 4(3): 143–50.

Hopper, Richard M. 2015. *Bovine Reproduction*.

Jimenez-Rabadan, P et al. 2016. "Influence of Semen Collection Method on Sperm Cryoresistance in Small Ruminants." *Animal reproduction science* 167: 103–8.

Kaabi, M et al. 2006. "Influence of Breed and Age on Morphometry and Depth of Inseminating Catheter Penetration in the Ewe Cervix: A Postmortem Study." *Theriogenology* 66(8): 1876–83.

Kershaw, Claire M. et al. 2005. "The Anatomy of the Sheep Cervix and Its Influence on the Transcervical Passage of an Inseminating Pipette into the Uterine Lumen." *Theriogenology* 64(5): 1225–35. [https://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(05\)00064-6/abstract#.Wv1Hi1rdXP.s.mendeley](https://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(05)00064-6/abstract#.Wv1Hi1rdXP.s.mendeley) (May 17, 2018).

King, M E et al. 2004. "Lambing Rates and Litter Sizes Following Intrauterine or Cervical Insemination of Frozen/Thawed Semen with or without Oxytocin Administration." *Theriogenology* 62(7): 1236–44.

Kopeika, Julia, Alan Thornhill, and Yacoub Khalaf. 2015. "The Effect of Cryopreservation on the Genome of Gametes and Embryos: Principles of Cryobiology and Critical Appraisal of the Evidence." *Human reproduction update* 21(2): 209–27.

Ley, W. B., D. J. Sprecher, C. D. Thatcher, et al. 1990. "Use of the Point-Score System for Breeding Soundness Examination in Yearling Dorset, Hampshire and Suffolk Rams." *Theriogenology*.

Ley, W B, D J Sprecher, P Lessard, et al. 1990. "Scrotal Circumference Measurements in Purebred Dorset, Hampshire and Suffolk Lamb and Yearling Rams." *Theriogenology* 34(5): 913–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16726892> (November 13, 2017).

Loste, A et al. 2005. "High Prevalence of Ulcerative Posthitis in Rasa Aragonesa Rams Associated with a Legume-Rich Diet." *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* 52(4): 176–79.

Mara, L., Sara Casu, A. Carta, and M. Dattena. 2013. "Cryobanking of Farm Animal Gametes and Embryos as a Means of Conserving Livestock Genetics." *Animal Reproduction Science* 138(1–2): 25–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.006>.

Masoudi, Reza et al. 2016. "Fertility Response Evaluation of Artificial Insemination Methods in Sheep with Fresh and Frozen-Thawed Semen."

Maxwell, WMC, and G. Evans. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths.

Merati, Zahra et al. 2018. "Anti-Apoptotic Effects of Minocycline on Ram Epididymal Spermatozoa Exposed to Oxidative Stress." *Theriogenology* 114: 266–72.

Meryman, Harold T. 2007. "Cryopreservation of Living Cells: Principles and Practice." *Transfusion* 47(5): 935–45.

Moore, R W. 1985. "A Comparison of Electro-Ejaculation with the Artificial Vagina for Ram Semen Collection." *New Zealand veterinary journal* 33(3): 22–23.

Moustacas, V S et al. 2010. "Effect of Extender Supplementation with Various Antimicrobial Agents on Viability of *Brucella Ovis* and *Actinobacillus Seminis* in Cryopreserved Ovine Semen." *Theriogenology* 74(8): 1476–81.

Mozo, René et al. 2015. "Evaluating the Reproductive Ability of Breeding Rams in North-Eastern Spain Using Clinical Examination of the Body and External Genitalia." *BMC Veterinary Research* 11(1): 289. <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/289>.

Myers, Norman et al. 2000. "Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities." *Nature* 403: 853. <http://dx.doi.org/10.1038/35002501>.

Naqvi, S M K et al. 2005. "Evaluation of Gross Anatomical Features of Cervix of Tropical Sheep Using Cervical Silicone Moulds." *Animal reproduction science* 85(3–4): 337–44.

Negrete-Abascal, Erasmo et al. 2018. "Genome Sequence of *Actinobacillus Seminis* Strain ATCC 15768, a Reference Strain of Ovine Pathogens That Causes Infections in Reproductive Organs." *Genome announcements* 6(2).

O'Connell, M., N. McClure, and S. E.M. Lewis. 2002. "The Effects of Cryopreservation on Sperm Morphology, Motility and Mitochondrial Function." *Human Reproduction* 17(3): 704–9.

Olsen, S. C., and M. V. Palmer. 2014. "Advancement of Knowledge of *Brucella* Over the Past 50 Years." *Veterinary Pathology* 51(6): 1076–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24981716> (March 5, 2018).

Ott, R. S., and M. A. Memon. 1980. "Breeding Soundness Examinations of Rams and Bucks, a Review." *Theriogenology* 13(2): 155–64. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X80901247> (November 13, 2017).

Paulenz, Heiko et al. 2004. "Fertility Results after Different Thawing Procedures for Ram Semen Frozen in Minitubes and Mini Straws." *Theriogenology* 61(9): 1719–27.

Paulenz, Heiko, Tormod Adnøy, and Lennart Soderquist. 2007. "Comparison of Fertility Results after Vaginal Insemination Using Different Thawing Procedures and Packages for Frozen Ram Semen." *Acta veterinaria Scandinavica* 49: 26.

Picard-Hagen, Nicole et al. 2015. "Contagious Epididymitis Due to *Brucella Ovis*: Relationship between Sexual Function, Serology and Bacterial Shedding in Semen." *BMC veterinary research* 11: 125. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26025374> (March 4, 2018).

Pugh, D. G. (David G.), and A. N. (Aubrey Nickie) Baird. 2012. *Sheep and Goat Medicine*. Elsevier/Saunders.

Ridler, A L, S L Smith, and D M West. 2012. "Ram and Buck Management." *Animal reproduction science* 130(3–4): 180–83.

Ridler, Anne L., and David M. West. 2011. "Control of *Brucella Ovis* Infection in Sheep." *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27(1): 61–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215890> (March 5, 2018).

Ritar, A J, P D Ball, and P J O'May. 1990. "Artificial Insemination of Cashmere Goats: Effects on Fertility and Fecundity of Intravaginal Treatment, Method and Time of Insemination, Semen Freezing Process, Number of Motile Spermatozoa and Age of Females." *Reproduction, fertility, and development* 2(4): 377–84.

Salamon, S, and W M Maxwell. 2000. "Storage of Ram Semen." *Animal reproduction science* 62(1–3): 77–111.

Sammataro, Diana, Uri Gerson, and Glen Needham. 2000. "PARASITIC MITES OF HONEY BEES: Life History, Implications, and Impact." 3: 519–48.

Sayre, B L, and G S Lewis. 1997. "Fertility and Ovum Fertilization Rate after Laparoscopic or Transcervical Intrauterine Artificial Insemination of Oxytocin-Treated Ewes." *Theriogenology* 48(2): 267–75.

Schrag, Nora, and Robert L Larson. 2016. "Yearling Bull Breeding Soundness Examination: Special Considerations." *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 32(2): 465–78.

Sieme, Harald, Harriette Oldenhof, and Willem F Wolkers. 2016. "Mode of Action of Cryoprotectants for Sperm Preservation." *Animal reproduction science* 169: 2–5.

Skuterud, Lavrans et al. 2005. "Chernobyl Radioactivity Persists in Reindeer." *Journal of environmental radioactivity* 83(2): 231–52.

Smith, Michael F, Rodney D Geisert, and John J Parrish. 2018. "Reproduction in Domestic Ruminants during the Past 50 Yr: Discovery to Application." *Journal of animal science* 96(7): 2952–70.

Vetter, C M et al. 1998. "Comparison of Motility and Membrane Integrity to Assess Rat Sperm Viability." *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 12(2): 105–14.

Wulster-Radcliffe, M C, B A Costine, and G S Lewis. 1999. "Estradiol-17 Beta-Oxytocin-Induced Cervical Dilation in Sheep: Application to Transcervical Embryo Transfer." *Journal of animal science* 77(10): 2587–93.

Youngquist, Robert S., and Walter R. Threlfall. 2007. "Current Therapy in Large Animal Theriogenology, Chapter 86 - Breeding Soundness Evaluation and Surgical Sterilization of the Ram." In *Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Second*

Edition), Saunders Elsevier, 620–28.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978072169323150060X>.

Anexo I

Avaliação da Condição Corporal em Ovinos

SCORE	AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO CORPORAL EM OVINOS	
1	Animal muito magro. Caquexia severa, olho afundado. O esqueleto é facilmente palpável com os bordos ósseos finos cortantes. Processos espinhosos das vertebrae bastante proeminentes, separam a lã na região dorsal. É possível palpar a face ventral dos processos transversos com 4 dedos e levantar o animal agarrando o desse modo. Animal fraco, não consegue acompanhar o rebanho.	
2	Animal magro, mas forte. O Esqueleto é facilmente palpável. Os processos espinhosos e transversos são palpáveis e apresentam os bordos arredondados. Olho não afundado, a lã poderá mascarar a condição de magreza. O animal acompanha o rebanho, mas não aguenta períodos de escassez alimentar.	
3	Animal com algum musculo e alguma cobertura de gordura, pélvis ainda proeminentes, mas suave. Proeminências ósseas podem ser palpadas ao aplicar alguma pressão manual, são suaves ao toque. O animal tosquiado tem uma especto saudável. As ovelhas devem ter este score antes de se cobrirem e do parto.	
4	Animal tosquiado parece volumoso, particularmente na zona do peito. As proeminências ósseas não são facilmente palpáveis, exceto quando aplicada pressão manual pronunciada. Zona perineal e da cauda arredondadas. Os carneiros podem atingir este score antes de iniciarem a cobrição. É um score elevado para uma ovelha produtiva.	
5	É difícil um animal produtivo atingir este score. Ovelhas que não se cobriam durante um ano e foram mantidas com ovelhas produtivas podem atingir este score. Não são palpáveis proeminências ósseas a linha dorsal a apófise espinhosa afunda no centro. Animal não tolerante ao exercício.	

Tabela 18 Score de condição corporal, geralmente utilizado na avaliação de ovinos. Adaptado de (Youngquist and Threlfall 2007)

Anexo II

Avaliação do Sêmen de Carneiro, Motilidade Massal.

SCORE	CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
5	Muito Bom	Ondas densas em turbilhão com movimento muito rápido. Não é possível observar espermatozoides individualmente. Mais de 90% dos espermatozoides estão ativos.
4	Bom	Ondas com movimento vigoroso. É visível o movimento de turbilhão rápido. Cerca de 70 a 80% dos espermatozoides estão ativos.
3	Satisfatório	Ondas pequenas com movimento Lento. Podem ser observados espermatozoides individualmente. 40 a 65% dos espermatozoides estão ativos.
2	Fraco	É possível observar espermatozoides individualmente com movimento lento. Não é visível movimento de onda. Apenas 20 a 40% dos espermatozoides estão vivos e com movimento lento
1	Muito Fraco	Aproximadamente 10% dos espermatozoides são móveis. Motilidade muito fraca
0	Morto	100% dos espermatozoides estão parados.

Tabela 19 Classificação da motilidade espermática massal. adaptado de (Gourley and Riese 1990; Maxwell and Evans 1987; Youngquist and Threlfall 2007)

Relação entre a consistência do sêmen e a concentração. Análise subjetiva.

Score	Consistência	Número de espermatozoides x10 ⁹	
		Concentração média	Intervalo
5	Cremoso espesso	5	4,5 – 6,0
4	Cremoso	4	3,5 – 4,5
3	Leitoso	3	2,5 – 3,5
2	Leitoso aquoso	2	1,0 - 2,5
1	Aquoso	>1	0,3 – 1
0	transparente	insignificante	0,1 – 1

Tabela 20 Relação entre a consistência do ejaculado e a concentração. Os ejaculados que obtenham o score entre 0 e 2 não devem ser utilizados para inseminação artificial adaptado de (Youngquist and Threlfall 2007)

Classificação de carneiros candidatos a Reprodutores. Exame andrológico

Recomendações de classificação de reprodutores em exame andrológico				
Idade / classificação	Excelente	Satisfatório	Questionável	Não satisfatório
Carneiros Jovens (6-12 meses)	C.E > 33cm	C.E > 30cm	C.E < 30cm	C.E < 30cm
	Motilidade > 50%	Motilidade > 30%	Motilidade < 30%	Motilidade < 30%
	> 90% spz normais	> 70% spz normais	< 70% spz normais	< 50% spz normais
Carneiros >12 Meses	C.E > 35 cm	C.E > 33cm	C.E < 33cm	C.E < 33cm
	Motilidade > 50%	Motilidade > 30%	Motilidade < 30%	Motilidade < 30%
	> 90% spz normais	> 70% spz normais	< 70% spz normais	< 50% spz normais

Tabela 21 Recomendações para classificação de Carneiros submetidos a exame andrológico, Classificação de Reprodutores, adaptado de (Youngquist and Threlfall 2007)

Anexo III

Exames andrológicos detalhados dos carneiros selecionados para o estudo.

ID	Raça	Idade	Circ. Escrotal (cm)	Classificação relativamente à Circ. Escrotal	Motilidade Massal	Motilidade Progressiva	Volume (ml)	Concentração (x10 ⁹ spz/ml)	Vitalidade (%)	Morfologia (%spz anormais)	Tipo de colheita	Classificação relativamente à reprodução
I	MP	>14m	32	Questionável	5	89,2	0,64	4,5	82,7	8,7	VA	Apto
II	MB	>14m	35	Satisfatório	5	79,0	1,23	2,9	71,3	4,4	VA	Apto
III	MB	>14m	32	Questionável	5	85,6	0,98	2,2	78,3	7,0	EE	Apto
IV	MB	>14m	34	Satisfatório	5	72,1	0,43	2,8	64,5	11,3	VA	Apto
V	MP	>14m	34	Satisfatório	5	84,0	1,17	3,5	70,7	10,1	VA	Apto
VI	MP	>14m	35	Satisfatório	5	85,0	0,89	2,2	77,1	17,8	VA	Apto
VII	CM	>14m	25	Não Satisfatório	5	80,0	0,55	2,6	80,7	20,5	EE	Questionável
VIII	CM	>14m	30	Questionável	2	70,0	0,88	0,5	41,8	10,8	EE	Não apto
X	BEDM	>14m	24	Não Satisfatório	4	65,8	0,67	1,6	70,1	30,4	EE	Não apto
XI	BEDM	>14m	22	Não Satisfatório	5	80,0	0,40	2,1	87,0	33,0	EE	Não apto
XIII	BEDM	>14m	30	Questionável	3	80,0	0,65	1,1	79,8	19,8	EE	Apto
XIV	BEDM	6-14m	23,5	Questionável	4	75,0	0,60	1,4	74,0	16,5	EE	Questionável
XV	BEDM	>14m	27	Não Satisfatório	3	46,7	1,55	2,1	74,5	6,8	EE	Questionável
XVI	BEDM	>14m	30	Questionável	4	70,0	0,48	1,1	80,0	12,3	EE	Questionável
XXVII	CM	>14m	27,5	Não Satisfatório	3	60,0	0,45	0,7	74,0	15,5	EE	Questionável
XXVIII	CM	>14m	31,5	Questionável	5	90,0	0,55	3,8	90,0	4,5	EE	Questionável

Tabela 22 Exame andrológico detalhado dos carneiros selecionados.

Anexo IV

Registo de colheitas de sémen, e seu aproveitamento relativo á criopreservação. Número teórico de doses preparadas por ejaculado.

Data	Raça	ID	# Colheita	Volume (ml)	Concentração (x10 ⁹ spz/ml)	Extensor	Aproveitamento		Nº doses I.A.
10/10/17	MPC	I	1	0,7	5,5	OVIXCell®	CONGELADO		70
10/10/17	MPC	I	2	0,3	4,1	OVIXCell®	CONGELADO		20
19/10/17	MPC	I	1	1,1	4,6	G.-C.-G.o.	CONGELADO		46
19/10/17	MPC	I	2	0,55	5,2	G.-C.-G.o.	CONGELADO		52
24/10/17	MPC	I	1	0,45	3	G.-C.-G.o.	CONGELADO		24
15/11/17	MPC	I	1	0,75	-	-	REJEITADO	Dados incompletos, não tem esfregaço	0
10/10/17	MB	II	1	1,4	2,9	OVIXCell®	CONGELADO		64
10/10/17	MB	II	2	1,45	1,9	OVIXCell®	CONGELADO	Dados incompletos, não tem esfregaço	44
18/10/17	MB	II	1	1,25	3,76	OVIXCell®	CONGELADO		66
18/10/17	MB	II	2	1,4	2,5	OVIXCell®	CONGELADO		52
19/10/17	MB	II	1	0,65	3,4	G.-C.-G.o.	CONGELADO		40
25/10/17	MBC	III	1	1	1,8	G.-C.-G.o.	CONGELADO		28
25/10/17	MBC	III	2	0,5	1,3	G.-C.-G.o.	CONGELADO		10
15/11/17	MBC	III	1	0,9	0,73	G.-C.-G.o.	CONGELADO		10
15/11/17	MBC	III	2	1	3,9	G.-C.-G.o.	CONGELADO		70
28/11/17	MBC	III	1	1,3	1,6	G.-C.-G.o.	CONGELADO		48
29/11/17	MBC	III	1	0,35	3,1	G.-C.-G.o.	CONGELADO		20
07/12/17	MBC	III	1	1,15	3,1	G.-C.-G.o.	CONGELADO		64

Data	Raça	ID	# Colheita	Volume (ml)	Concentração (x10 ⁹ spz/ml)	Extensor	Aproveitamento		Nº doses I.A.
12/12/17	MBC	III	1	1,65	2,3	G.-C.-G.o.	CONGELADO		68
10/10/17	MB	IV	1	0,55	2,9	OVIXCell®	CONGELADO		28
10/10/17	MB	IV	2	0,2	2,4	OVIXCell®	CONGELADO		8
18/10/17	MB	IV	1	0,55	2,9	OVIXCell®	CONGELADO		26
18/10/17	MB	IV	2	0,2	1,99	OVIXCell®	CONGELADO		6
19/10/17	MB	IV	1	0,5	2,8	G.-C.-G.o.	CONGELADO		20
19/10/17	MB	IV	2	0,65	3	G.-C.-G.o.	CONGELADO		30
24/10/17	MB	IV	1	0,2	3,33	G.-C.-G.o.	CONGELADO		10
24/10/17	MB	IV	2	0,55	3	G.-C.-G.o.	CONGELADO		24
25/10/17	MB	IV	1	0,25	4,4	G.-C.-G.o.	CONGELADO		16
25/10/17	MB	IV	2	0,35	3,3	G.-C.-G.o.	CONGELADO		18
15/11/17	MB	IV	1	0,2	1,49	-	REJEITADO	80% dos espermatozoides não tem motilidade	0
15/11/17	MB	IV	2	0,8	-	-	REJEITADO	Dados incompletos, esfregaços sem qualidade diagnostica	0
15/11/17	MB	IV	3	0,55	2,57	G.-C.-G.o.	CONGELADO		22
22/12/17	BEDM	IX	1	0,65	1	G.-C.-G.o.	CONGELADO	Rejeitar por não ter sido descongelado	12
18/10/17	MPC	V	1	1,45	2,88	OVIXCell®	CONGELADO		76
18/10/17	MPC	V	2	1,15	2,2	OVIXCell®	CONGELADO		46
24/10/17	MPC	V	1	0,95	5,7	G.-C.-G.o.	CONGELADO		86
24/10/17	MPC	V	2	1,05	1,8	G.-C.-G.o.	CONGELADO	Rejeitado, esfregaço extraviado	30
15/11/17	MPC	V	1	1,25	4,7	G.-C.-G.o.	CONGELADO		94
25/10/17	MBC	VI	1	1,9	2,6	G.-C.-G.o.	CONGELADO		88
25/10/17	MBC	VI	2	0,75	1,2	G.-C.-G.o.	CONGELADO		16
15/11/17	MBC	VI	1	0,75	2,9	G.-C.-G.o.	CONGELADO		34

Data	Raça	ID	# Colheita	Volume (ml)	Concentração (x10 ⁹ spz/ml)	Extensor	Aproveitamento		Nº doses I.A.
15/11/17	MBC	VI	2	0,7	2,3	G.-C.-G.o.	CONGELADO		26
28/11/17	MBC	VI	1	0,7	2,7	G.-C.-G.o.	CONGELADO		30
29/11/17	MBC	VI	1	0,55	1,5	G.-C.-G.o.	CONGELADO		14
12/12/17	CM	VII	1	0,5	3,7	G.-C.-G.o.	CONGELADO		30
13/12/17	CM	VII	1	0,4	2,4	G.-C.-G.o.	REJEITADO	Choque térmico	0
22/12/17	CM	VII	1	0,75	1,6	G.-C.-G.o.	CONGELADO		20
07/12/17	CM	VIII	1	1	-	G.-C.-G.o.	REJEITADO	Dados incompletos, não tem esfregaço	0
12/12/17	CM	VIII	1	0,75	0,7	G.-C.-G.o.	CONGELADO		8
13/12/17	BEDM	VIII	1	-	0,2	-	REJEITADO	Volume insignificante, não foi congelado	0
22/12/17	CM	VIII	1	5	0,2	-	REJEITADO	Contaminação com urina	0
12/12/17	BEDM	X	1	1,7	1,7	G.-C.-G.o.	CONGELADO		46
13/12/17	BEDM	X	1	0,3	3	G.-C.-G.o.	CONGELADO	Rejeitado por não ter sido descongelado	0
22/12/17	BEDM	X	1	0,55	1,1	G.-C.-G.o.	CONGELADO		8
22/12/17	BEDM	X	1	0,55	1,1	G.-C.-G.o.	CONGELADO		8
13/12/17	BEDM	XI	1	0,4	-	G.-C.-G.o.	REJEITADO	Contaminação com urina	0
22/12/17	BEDM	XI	1	0,4	2,1	G.-C.-G.o.	CONGELADO		14
13/12/17	BEDM	XII	1	0,8	0,3	G.-C.-G.o.	REJEITADO	Contaminação com urina	0
07/12/17	BEDM	XIII	1	1	-	G.-C.-G.o.	CONGELADO	Dados incompletos	0
12/12/17	BEDM	XIII	1	0,4	-	G.-C.-G.o.	REJEITADO	Volume insignificante não foi congelado	0
13/12/17	BEDM	XIII	1	0,3	1,1	G.-C.-G.o.	REJEITADO	Volume e concentração insignificantes não foi congelado	0
22/12/17	BEDM	XIII	1	0,9	1	G.-C.-G.o.	CONGELADO		12
07/12/17	BEDM	XIV	1	1	-	G.-C.-G.o.	CONGELADO	Dados incompletos	0
12/12/17	BEDM	XIV	1	0,5	0,9	G.-C.-G.o.	CONGELADO		6

Data	Raça	ID	# Colheita	Volume (ml)	Concentração (x10 ⁹ spz/ml)	Extensor	Aproveitamento		Nº doses I.A.
22/12/17	BEDM	XIV	1	0,3	1,8	G.-C.-G.o.	CONGELADO		8
22/10/17	BEDM	XV	1	0,9	1,6	G.-C.-G.o.	CONGELADO		18
12/12/17	BEDM	XV	1	1,8	2,9	G.-C.-G.o.	CONGELADO		52
13/12/17	BEDM	XV	1	1,95	1,7	G.-C.-G.o.	CONGELADO		20
22/10/17	BEDM	XVI	1	0,7	0,8	G.-C.-G.o.	CONGELADO		6
07/12/17	BEDM	XVI	1	0,5	-	G.-C.-G.o.	CONGELADO	Volume insignificante não foi congelado	0
12/12/17	BEDM	XVI	1	0,35	1	G.-C.-G.o.	CONGELADO		4
13/12/17	BEDM	XVI	1	0,35	1,5	G.-C.-G.o.	CONGELADO	Rejeitado por não ter sido descongelado	8
22/12/17	CM	XXVII	1	0,45	0,7	G.-C.-G.o.	CONGELADO		4
22/12/17	CM	XXVIII	1	0,55	3,8	G.-C.-G.o.	CONGELADO		38

Tabela 23 Registo de colheitas de sémen, e seu aproveitamento relativo á criopreservação. Número teórico de doses preparadas por ejaculado

Anexo V

Registo das colheitas de sémen seleccionadas para os estudos.

					Sémen Fresco							Sémen Descongelado						
Data	Raça	ID	Colheita	Extensor	Motilidade Massal (0-5)	Motilidade Progressiva (%)	Vitalidade (%)	Morfologia				Motilidade Progressiva (%)	Vitalidade (%)	Morfologia				
								Defeitos Cabeça	Defeitos P. Int.	Defeitos Cauda	Total			Defeitos Cabeça	Defeitos P. Int.	Defeitos Cauda	Total	
10/10/17	MPC	I	1	OVIXCell®	5	90	81,5	6	1	2,5	9,5	40	41	17	2,5	13,5	33	
10/10/17	MPC	I	2	OVIXCell®	5	85	78	5,5	0	4,5	10	35	33	15,5	1	18	34,5	
19/10/17	MPC	I	1	G.C.G.o.	5	90	85	7,5	0	1	8,5	10	12	9	1	19	29	
19/10/17	MPC	I	2	G.C.G.o.	5	90	88	1,5	2,5	2	6	10	18	12	4,5	21,5	38	
24/10/17	MPC	I	1	G.C.G.o.	5	90	80	3,5	0,5	5,5	9,5	25	47	9	5,5	4	18,5	
10/10/17	MB	II	1	OVIXCell®	5	80	76	1,5	0	3	4,5	5	10	11,5	1,5	10,5	23,5	
18/10/17	MB	II	1	OVIXCell®	5	70	62	0,5	1	0,5	2	5	10	98	0	0	98	
18/10/17	MB	II	2	OVIXCell®	5	75	60	4	0,5	2	6,5	5	10	55	3	6	64	
19/10/17	MB	II	1	G.C.G.o.	5	90	87	1,5	2	1	4,5	15	32	21,5	2,5	6,5	30,5	
25/10/17	MBC	III	1	G.C.G.o.	5	80	71,5	3	1	5	9	5	10	11	0	7,5	18,5	
25/10/17	MBC	III	2	G.C.G.o.	5	80	74	3	0	1	4	5	10	11	0	5,5	16,5	
15/11/17	MBC	III	1	G.C.G.o.	4	75	62	5	1,5	2	8,5	5	10	18,5	0,5	10	29	
15/11/17	MBC	III	2	G.C.G.o.	4	90	81	0,5	0,5	2	3	5	10	10,5	2,5	8,5	21,5	
28/11/17	MBC	III	1	G.C.G.o.	5	90	85,5	1,5	2	3	6,5	40	51	13,5	0	11,5	25	
29/11/17	MBC	III	1	G.C.G.o.	5	90	85	1,5	1	2,5	5	10	14	6	5,5	6	17,5	
07/12/17	MBC	III	1	G.C.G.o.	5	90	80	1	0,5	1	2,5	10	22	5,5	4	24,5	34	

					Sémen Fresco							Sémen Descongelado						
Data	Raça	ID	Colheita	Extensor	Motilidade Massal (0-5)	Motilidade Progressiva (%)	Vitalidade (%)	Morfologia				Motilidade Progressiva (%)	Vitalidade (%)	Morfologia				
								Defeitos Cabeça	Defeitos P. Int.	Defeitos Cauda	Total			Defeitos Cabeça	Defeitos P. Int.	Defeitos Cauda	Total	
12/12/17	MBC	III	1	G.C.G.o.	5	90	87	1,5	1	33	35,5	10	12	9	0	1	10	
10/10/17	MB	IV	1	OVIXCell®	5	90	79	1	1,5	2	4,5	50	44	8	2,5	27	37,5	
10/10/17	MB	IV	2	OVIXCell®	4	80	73	3	1,5	2	6,5	40	33	16,5	3,5	19	39	
18/10/17	MB	IV	1	OVIXCell®	5	80	75	1,5	1,5	1,5	4,5	20	23	13,5	3	6	22,5	
18/10/17	MB	IV	2	OVIXCell®	5	80	78	4,5	4	3	11,5	20	27	91,5	0	3	94,5	
19/10/17	MB	IV	1	G.C.G.o.	5	70	60	2,5	4,5	2	9	35	35	8	7	12	27	
19/10/17	MB	IV	2	G.C.G.o.	5	75	62,5	2,5	3	3	8,5	30	32	14	3,5	10	27,5	
24/10/17	MB	IV	1	G.C.G.o.	5	70	60	31	5	5	41	70	73	15,5	1	5,5	22	
24/10/17	MB	IV	2	G.C.G.o.	5	70	61	4	1,5	2,5	8	60	63	6	1	17,5	24,5	
25/10/17	MB	IV	1	G.C.G.o.	5	70	56,5	3	3	3	9	60	48	5	5,5	12,5	23	
25/10/17	MB	IV	2	G.C.G.o.	5	80	76	1,5	7,5	1,5	10,5	50	53	3	4,5	14,5	22	
15/11/17	MB	IV	3	G.C.G.o.	5	80	73	4	4,5	3	11,5	5	10	7	2	19	28	
18/10/17	MPC	V	1	OVIXCell®	4	90	75	4,5	0,5	2,5	7,5	5	10	6,5	5	12	23,5	
18/10/17	MPC	V	2	OVIXCell®	5	90	79	7,5	0,5	1	9	5	10	17,5	0,5	4	22	
24/10/17	MPC	V	1	G.C.G.o.	5	80	74	1	12,5	0,5	14	45	51	10,5	2,5	8,5	21,5	
24/10/17	MPC	V	2	G.C.G.o.	5	80	68	4,5	10	1	15,5	45	50	13,5	0	11,5	25	
15/11/17	MPC	V	1	G.C.G.o.	4	80	70	2,5	0	2	4,5	50	23	91,5	0	3	94,5	
25/10/17	MBC	VI	1	G.C.G.o.	5	90	80,5	2	1,5	20,5	24	25	24	5	11	10	26	
25/10/17	MBC	VI	2	G.C.G.o.	4	90	82,5	4,5	6	15,5	26	20	33	13,5	7	8	28,5	
15/11/17	MBC	VI	1	G.C.G.o.	5	80	69	1	0	9,5	10,5	10	49	25	3	6,5	34,5	
15/11/17	MBC	VI	2	G.C.G.o.	4	80	75	2	0	12,5	14,5	10	26	14,5	3,5	8	26	

					Sémen Fresco							Sémen Descongelado						
Data	Raça	ID	Colheita	Extensor	Motilidade Massal (0-5)	Motilidade Progressiva (%)	Vitalidade (%)	Morfologia				Motilidade Progressiva (%)	Vitalidade (%)	Morfologia				
								Defeitos Cabeça	Defeitos P. Int.	Defeitos Cauda	Total			Defeitos Cabeça	Defeitos P. Int.	Defeitos Cauda	Total	
28/11/17	MBC	VI	1	G.C.G.o.	5	80	73,5	3	3,5	16	22,5	10	31	19	3	7,5	29,5	
29/11/17	MBC	VI	1	G.C.G.o.	4	90	82	2	2,5	5	9,5	45	57	11	4,5	6	21,5	
12/12/17	CM	VII	1	G.C.G.o.	4	80	79	3	0	3	6	15	16	11,5	1,5	25	38	
22/12/17	CM	VII	1	G.C.G.o.	5	80	89,5	6,5	1	11,5	19	60	65	6	1	4,5	11,5	
12/12/17	CM	VIII	1	G.C.G.o.	2	70	3,5	1,5	1	7	9,5	5	10	7	0	14,5	21,5	
12/12/17	BEDM	X	1	G.C.G.o.	5	80	69,5	1,5	7	14,5	23	5	27	17	0,5	10	27,5	
22/12/17	BEDM	X	1	G.C.G.o.	5	70	65	1	11,5	12	24,5	10	13	10	0,5	3,5	14	
22/12/17	BEDM	X	1	G.C.G.o.	5	70	72	4	8,5	11	23,5	20	25	20,5	0	3	23,5	
22/12/17	BEDM	XI	1	G.C.G.o.	5	80	87	0	0	33	33	20	49	17,5	0,5	4	22	
22/12/17	BEDM	XIII	1	G.C.G.o.	3	70	83,5	5	0	1	6	15	39	6,5	5	12	23,5	
12/12/17	BEDM	XIV	1	G.C.G.o.	3	70	74	1,5	0	11	12,5	40	27	14,5	5,5	13	33	
22/12/17	BEDM	XIV	1	G.C.G.o.	4	80	74	4	2	4,5	10,5	20	30	81	0	5,5	86,5	
22/10/17	BEDM	XV	1	G.C.G.o.	3	60	73	0	1,5	4	5,5	10	17	8,5	7,5	23,5	39,5	
12/12/17	BEDM	XV	1	G.C.G.o.	5	50	84,5	0,5	3	4	7,5	5	10	14,5	0	8,5	23	
13/12/17	BEDM	XV	1	G.C.G.o.	0	30	66	2,5	3	2	7,5	5	18	12,5	6	14,5	33	
22/10/17	BEDM	XVI	1	G.C.G.o.	3	60	84	6	0	1,5	7,5	30	39	6,5	1	27,5	35	
12/12/17	BEDM	XVI	1	G.C.G.o.	4	70	87	3,5	3,5	10,5	17,5	5	10	6,5	2	27	35,5	
22/12/17	CM	XXVII	1	G.C.G.o.	3	60	74	4,5	10	1	15,5	30	39	10,5	0,5	19,5	30,5	
22/12/17	CM	XXVIII	1	G.C.G.o.	5	90	90	2,5	0	2	4,5	30	15	29,5	0,5	4	34	

Tabela 24 Registo das colheitas de sémen selecionadas para o estudo. Resultado da análise dos padrões de Motilidade Massal, Progressiva, Vitalidade e Morfologia espermática do sémen fresco e descongelado. Contagem total de defeitos morfológicos, e Diferencial dos defeitos de Cabeça, Peça Intermédia e Cauda.

Anexo VI

Avaliação detalhada da morfologia dos ejaculados em fresco seleccionados para o estudo. Valores médios por defeitos morfológicos considerado

Data	ID	Extensor	Defeitos de Cabeça						Defeitos de Peça Intermédia				Defeitos de Cauda				Total
			Cabeça Isolada	Microcef.	Macrocef.	Cabeça Piriforme	Defeito de Acrossoma	Teratóide	Fratura	Gota Cit. Proximal	Gota Cit. Distal	Outros defeitos	Cauda Enrolada	DAG	Cauda Dobrada	Ventroflexão distal	
10/10/17	I	OVIXCell®	6								1			1,5		1	9,5
10/10/17	I	OVIXCell®	5	0,5										1,5		3	10
19/10/17	I	OVIXCell®	6	1			0,5							1			8,5
19/10/17	I	OVIXCell®	1					0,5	0,5		0,5	1,5		2			6
24/10/17	I	G.C.G.o.	3,5				0,5		1,5		0,5		1,5	2		1	10,5
10/10/17	II	OVIXCell®	1,5										0,5			2,5	4,5
18/10/17	II	OVIXCell®	0,5								1					0,5	2
18/10/17	II	OVIXCell®	3	0,5				0,5	0,5				1	0,5		0,5	6,5
19/10/17	II	OVIXCell®	1				0,5		0,5		1,5					1	4,5
25/10/17	III	G.C.G.o.	1	1		1,5			0,5				0,5		0,5	4,5	9,5
25/10/17	III	G.C.G.o.		1,5		1,5						1	0,5	1,5	1,5	1,5	9
15/11/17	III	G.C.G.o.	0,5			2,5								0,5		0,5	4
15/11/17	III	G.C.G.o.	1,5	0,5		2,5	0,5		0,5		0,5	0,5	0,5			1,5	8,5
28/11/17	III	G.C.G.o.			0,5						0,5		0,5	0,5		1	3
29/11/17	III	G.C.G.o.	0,5		0,5			0,5	1		1		0,5		0,5	2	6,5
07/12/17	III	G.C.G.o.	1	0,5							1		0,5		1,5	0,5	5

Data	ID	Extensor	Defeitos de Cabeça						Defeitos de Peça Intermédia				Defeitos de Cauda				Total
			Cabeça Isolada	Microcef.	Macrocef.	Cabeça Piriforme	Defeito de Acrossoma	Teratóide	Fratura	Gota Cit. Proximal	Gota Cit. Distal	Outros defeitos	Cauda Enrolada	DAG	Cauda Dobrada	Ventroflexão distal	
12/12/17	III	G.C.G.o.	0,5			0,5			0,5				0,5		0,5		2,5
10/10/17	IV	OVIXCell®	1								1,5					2	4,5
10/10/17	IV	OVIXCell®	1,5	0,5		1			1		0,5		0,5	0,5		1	6,5
18/10/17	IV	OVIXCell®				1,5			1		0,5			0,5	0,5	0,5	4,5
18/10/17	IV	OVIXCell®	4,5								4			2		1	11,5
19/10/17	IV	OVIXCell®	2			0,5					3		1	0,5	1	0,5	8,5
19/10/17	IV	OVIXCell®	2,5							0,5	4			0,5		1,5	9
24/10/17	IV	G.C.G.o.							0,5		1		0,5		0,5	3	5,5
24/10/17	IV	G.C.G.o.				0,5				0,5	2,5		1		0,5	2,5	7,5
25/10/17	IV	G.C.G.o.	1,5			1			1		1,5	0,5	1,5			0,5	7,5
25/10/17	IV	G.C.G.o.				1			2	0,5			2,5	0,5	1,5	2	10
15/11/17	IV	G.C.G.o.	5,5					0,5					0,5		1		7,5
12/12/17	IX	G.C.G.o.	0,5		1				1				4,5		25,5	3	35,5
22/12/17	IX	G.C.G.o.	31								5		2	0,5	1	1,5	41
18/10/17	V	OVIXCell®	6	1,5					0,5				0,5			0,5	9
18/10/17	V	OVIXCell®	4			0,5			0,5					2	0,5		7,5
24/10/17	V	G.C.G.o.	1						0,5		12		0,5				14
24/10/17	V	G.C.G.o.	2,5	0,5		1	0,5				10				0,5	0,5	15,5
15/11/17	V	G.C.G.o.	1	0,5		0,5	0,5						1		1		4,5
25/10/17	VI	G.C.G.o.			1	2,5	0,5				1	0,5		1,5	0,5	0,5	8
25/10/17	VI	G.C.G.o.	0,5	0,5	0,5	0,5	1		0,5		2,5			1		2	9

Data	ID	Extensor	Defeitos de Cabeça						Defeitos de Peça Intermédia				Defeitos de Cauda				Total
			Cabeça Isolada	Microcef.	Macrocef.	Cabeça Piriforme	Defeito de Acrossoma	Teratóide	Fratura	Gota Cit. Proximal	Gota Cit. Distal	Outros defeitos	Cauda Enrolada	DAG	Cauda Dobrada	Ventroflexão distal	
15/11/17	VI	G.C.G.o.	1,5								7,5			0,5		1	10,5
15/11/17	VI	G.C.G.o.	3,5			0,5					4,5				0,5	2,5	11,5
28/11/17	VI	G.C.G.o.	2	1										0,5	1	1,5	6
29/11/17	VI	G.C.G.o.						0,5	1,5				1	0,5		3	6,5
22/12/17	VII	G.C.G.o.	1	0,5					0,5		7,5		2,5	1,5	1,5	1	16,0
07/12/17	VIII	G.C.G.o.	1,5	1,5	0,5			1,5						0,5			5,5
12/12/17	VIII	G.C.G.o.	1,5				0,5		0,5		1		3	2	11,5	4	24
22/12/17	VIII	G.C.G.o.	0,5						1,5		9,5		15,5	1,5	12	5,5	46
12/12/17	X	G.C.G.o.	3,5	0,5	0,5				0,5		5,5		4,5	3,5	2,5	5	26
22/12/17	X	G.C.G.o.	1												9	0,5	10,5
22/12/17	XI	G.C.G.o.	2										0,5	1	9,5	1,5	14,5
12/12/17	XII	G.C.G.o.	0,5						1				1,5	3,5	2	4	12,5
13/12/17	XII	G.C.G.o.	3						1	1	1,5		2	4	8	2	22,5
13/12/17	XII	G.C.G.o.	2						1		1,5		0,5	0,5	2,5	1,5	9,5
22/12/17	XII	G.C.G.o.	6,5						0,5		0,5		2	1	5,5	3	19
07/12/17	XIII	G.C.G.o.	0,5		0,5						7,5		0,5	0,5		1	10,5
13/12/17	XIII	G.C.G.o.	1	0,5							1		0,5		4,5	2	9,5
22/12/17	XIII	G.C.G.o.	1	0,5					0,5	0,5	6		1	0,5	9,5	3,5	23
07/12/17	XIV	G.C.G.o.	0,5		0,5						11,5		4	2		6	24,5
12/12/17	XIV	G.C.G.o.											5,5	2,5	19	6	33
22/12/17	XIV	G.C.G.o.	8,5	0,5							4		18	3	11,5	10,5	56

Data	ID	Extensor	Defeitos de Cabeça						Defeitos de Peça Intermédia				Defeitos de Cauda				Total
			Cabeça Isolada	Microcef.	Macrocef.	Cabeça Piriforme	Defeito de Acrossoma	Teratóide	Fratura	Gota Cit. Proximal	Gota Cit. Distal	Outros defeitos	Cauda Enrolada	DAG	Cauda Dobrada	Ventroflexão distal	
22/10/17	XV	G.C.G.o.	3			0,5	1		0,5	2	14,5		7	1,5	2,5	4	36,5
12/12/17	XV	G.C.G.o.	1		0,5	1	1,5		0,5		8		5,5	2	2	1,5	23,5
13/12/17	XV	G.C.G.o.	2,5			0,5	0,5				3	0,5	2,5	2,5	1,5	4	17,5
22/10/17	XVI	G.C.G.o.	1,5										5,5	1	9	1,5	18,5
07/12/17	XVI	G.C.G.o.	0,5		3,5	1							0,5			0,5	6
13/12/17	XVI	G.C.G.o.	1,5										1,5	1	15	2,5	21,5
22/12/17	XXVII	G.C.G.o.	5,5				1		1,5	1,5	3		1	0,5	11,5	1	26,5
22/12/17	XXVIII	G.C.G.o.	1	0,5									1,5		5,5	4	12,5
MÉDIAS %			2,7	0,7	0,9	1,1	0,7	0,7	0,8	0,9	3,8	0,8	2,4	1,3	4,9	2,2	13,6

Tabela 25 Avaliação detalhada da morfologia dos ejaculados em fresco selecionados para o estudo. Valores médios por defeitos morfológicos considerado

Anexo VII

Avaliação detalhada da morfologia dos ejaculados descongelados selecionados para o estudo. Valores médios por defeitos morfológicos considerado.

Data	ID	Extensor	Defeitos de Cabeça						Defeitos de Peça Intermédia				Defeitos de Cauda				Total
			Cabeça Isolada	Microcef.	Macrocef.	Cabeça Piriforme	Defeito de Acrossoma	Teratóide Amorfos	Fratura	Gota Cit. Proximal	Gota Cit. Distal	Outros Defeitos	Cauda Enrolada	DAG	Cauda Dobrada	Ventroflexão distal	
10/10/17	I	OVIXCell®				0,5	15		0,5	0,5			1	3,5	9	4,5	34,5
10/10/17	I	OVIXCell®		0,5		0,5	16		1		1,5		1	1,5	7	4	33
19/10/17	I	G.C.G.o.	2				10		3,5	1			1	1,5	10	9	38
19/10/17	I	G.C.G.o.	5				4					1	2		14	3	29
24/10/17	I	G.C.G.o.	6			1	2		0,5	2	3			1	3		18,5
10/10/17	II	OVIXCell®	0,5			1	10				1,5			1	7	2,5	23,5
18/10/17	II	OVIXCell®	33	56,5				8,5									98
18/10/17	II	OVIXCell®	6,5	38,5	2		4	4	1		2				2	4	64
19/10/17	II	G.C.G.o.	4,5				17		0,5	0,5	1,5		0,5	0,5	3	2,5	30,5
25/10/17	III	G.C.G.o.	3				2,5		1,5					0,5	6	5,5	19
25/10/17	III	G.C.G.o.	3				2		1,5					1	5,5	4,5	17,5
15/11/17	III	G.C.G.o.	6	2,5			10		0,5				3	0,5	3	3,5	29
15/11/17	III	G.C.G.o.	38	5	4		7	6	4			1	1	1	6,5		73,5
28/11/17	III	G.C.G.o.	2,5	0,5		2,5	5	0,5					2,5	0,5	2	0,5	16,5
29/11/17	III	G.C.G.o.	2,5	0,5		2,5	5	0,5					2,5	0,5	2	2,5	18,5

Data	ID	Extensor	Defeitos de Cabeça						Defeitos de Peça Intermédia				Defeitos de Cauda				Total
			Cabeça Isolada	Microcef.	Macrocef.	Cabeça Piriforme	Defeito de Acrossoma	Teratóide Amorfos	Fratura	Gota Cit. Proximal	Gota Cit. Distal	Outros Defeitos	Cauda Enrolada	DAG	Cauda Dobrada	Ventroflexão distal	
07/12/17	III	G.C.G.o.	1,5	0,5		1,5	6	1	2			0,5	2,5	1	2	3	21,5
12/12/17	III	G.C.G.o.	2	0,5	0,5		7,5	3					3	0,5	3	5	25
10/10/17	IV	OVIXCell®	2,5		0,5	0,5	13		2		1,5		3	1	4	11	39
10/10/17	IV	OVIXCell®	0,5				7,5		2,5				3,5	1	8,5	14	37,5
18/10/17	IV	OVIXCell®	40	48				3,5					1,5		0,5	1	94,5
18/10/17	IV	OVIXCell®	6	0,5			7				3		1	0,5	3,5	1	22,5
19/10/17	IV	G.C.G.o.	1	0,5			23	0,5	1,5		1,5		1		3,5	2	34,5
19/10/17	IV	G.C.G.o.	1,5			0,5	17			0,5	2,5		1,5	0,5	3	2,5	29,5
24/10/17	IV	G.C.G.o.	1	0,5	0,5		9			1,5	3				4,5	1,5	21,5
24/10/17	IV	G.C.G.o.	0,5			1,5	10,5			1	5		2	2	8	2,5	33
25/10/17	IV	G.C.G.o.	2				11,5				7		1,5		3	3,5	28,5
25/10/17	IV	G.C.G.o.	1				4				11		2	1,5	2	4,5	26
15/11/17	IV	G.C.G.o.	1,5			0,5	12	0,5		0,5	3		1	0,5	2,5	4	26
12/12/17	IV	G.C.G.o.	3				3		1	2	2,5			0,5	3,5	2	17,5
12/12/17	IV	G.C.G.o.	1			0,5	7,5									1	10
22/12/17	IV	G.C.G.o.	1				4,5		2,5		1,5		3,5		6	15	34
18/10/17	V	OVIXCell®	39,5	1,5			6,5	8	1				0,5				57
18/10/17	V	OVIXCell®	32	3			4	10					1		6		56
24/10/17	V	G.C.G.o.	2	0,5			14,5			0,5			1	0,5	5	3,5	27,5
24/10/17	V	G.C.G.o.	0,5				20						0,5		2	0,5	23,5

Data	ID	Extensor	Defeitos de Cabeça						Defeitos de Peça Intermédia				Defeitos de Cauda				Total
			Cabeça Isolada	Microcef.	Macrocef.	Cabeça Piriforme	Defeito de Acrossoma	Teratóide Amorfos	Fratura	Gota Cit. Proximal	Gota Cit. Distal	Outros Defeitos	Cauda Enrolada	DAG	Cauda Dobrada	Ventroflexão distal	
15/11/17	V	G.C.G.o.	2,5				4,5						1	1	11	1,5	21,5
25/10/17	VI	G.C.G.o.	1,5		0,5		3		1		4,5		1	0,5	6	5	23
25/10/17	VI	G.C.G.o.				0,5	2,5		2		2,5			1	8	5,5	22
15/11/17	VI	G.C.G.o.	1		1		4,5	0,5	1			1	1,5		15	2,5	28
15/11/17	VI	G.C.G.o.	3,5				3	1,5	2	0,5	4,5		1		9	2	27
28/11/17	VI	G.C.G.o.					14			2	1	0,5	3		2,5	4,5	27,5
29/11/17	VI	G.C.G.o.	1	0,5		1,5	12	0,5			1		1,5	0	1,5	2,5	22
13/12/17	VI	G.C.G.o.	2,5				3	0,5	1				7		5	5,5	24,5
12/12/17	VII	G.C.G.o.	2,5				9		1		0,5			6,5	12	6,5	38
22/12/17	VII	G.C.G.o.					5,5	0,5			1			0,5	1,5	2,5	11,5
22/12/17	X	G.C.G.o.				1,5	8,5		0,5				0,5		1	2	14
22/12/17	XI	G.C.G.o.	4				13	0,5	0,5				0,5		2	1,5	22
22/12/17	XIII	G.C.G.o.	1,5				5				5		1,5		4,5	6	23,5
12/12/17	XIV	G.C.G.o.	10			1	3,5				5,5		3	1	3	6	33
22/12/17	XIV	G.C.G.o.	62,5	2,5		0,5	6	9,5						1	2,5	2	86,5
22/10/17	XV	G.C.G.o.	5,5				3				7,5		12,5		4	7	39,5
12/12/17	XV	G.C.G.o.	4				10,5							1,5	1	6	23
22/10/17	XVI	G.C.G.o.	3				2,5	1			1		8	2,5		17	35
12/12/17	XVI	G.C.G.o.	2				4	0,5	0,5		1,5		9,5	2	0,5	15	35,5
22/12/17	XXVI I	G.C.G.o.	4,5				6		0,5				8,5		2	9	30,5
22/12/17	XXVI II	G.C.G.o.	13			3,5	11,5	1,5	0,5				1,5		1	1,5	34

Data	ID	Extensor	Defeitos de Cabeça						Defeitos de Peça Intermédia				Defeitos de Cauda				Total
			Cabeça Isolada	Microcef.	Macrocef.	Cabeça Piriforme	Defeito de Acrossoma	Teratóide Amorfos	Fratura	Gota Cit. Proximal	Gota Cit. Distal	Outros Defeitos	Cauda Enrolada	DAG	Cauda Dobrada	Ventroflexão distal	
MEDIAS %			7,5	9,0	1,3	1,2	8,0	2,8	1,3	1,0	3,1	0,8	2,5	1,2	4,7	4,6	32,7

Tabela 26 Avaliação detalhada da morfologia dos ejaculados descongelados selecionados para o estudo. Valores médios por defeitos morfológicos considerado

