

Estudo Sobre a Longevidade Espermática Durante o Transporte em Sêmen Caprino

Andreia Filipa Miranda Agostinho

Enfermagem Veterinária

2023/2024

Andreia Filipa Miranda Agostinho

Estudo Sobre a longevidade Espermática Durante o Transporte em Sémén Caprino

Relatório de estágio curricular do tipo II – Introdução às Atividades de I&DE, apresentado para obtenção do grau de licenciado em Enfermagem Veterinária conferido pelo Instituto Politécnico de Portalegre

Orientador interno: Dra. Elvira Matilla Pinto

Coorientador: Rute Isabel Telo Mourão

Orientador Externo: Dr. Andrés Domingo Montes

Arguente: Dra. Carolina Maria Balão da Silva

Presidente do Júri: José Manuel Rato Nunes

Classificação: 18 valores

Escola Superior de Biociências de Elvas

2024

Agradecimentos

O maior agradecimento à minha mãe, ao meu pai, ao meu irmão e à minha avó, pelo apoio incondicional emocional e financeiro que me deram nos últimos quatro anos, fundamental para terminar este capítulo na minha vida. Sem eles não teria sido possível e estarei eternamente grata.

À Inês D., à Inês M., à Leonor e à Sofia que me acompanharam em todos os momentos e me inspiraram a fazer sempre mais e melhor. O tempo passa, as estações mudam e nós ficamos, eternamente.

À Professora Doutora Elvira Pinto por todo o apoio indispensável, paciência, boa disposição e simpatia que me proporcionou durante o estágio e a realização deste trabalho! Agradeço-lhe imensamente por me ter ajudado a ultrapassar todos os obstáculos que encontrei neste percurso, que no fim resultaram numa experiência positiva.

À Professora Rute Mourão que sempre se mostrou disponível e empenhada em ajudar-me em tudo o que fosse necessário!

Por último e igualmente importante, agradeço ao CENSYRA por esta oportunidade inesquecível, em especial a todos os trabalhadores da parte caprina e equina (Rosa, M^a Luísa, Miguel, Rosa, Juan, Vanessa, Angel e Fernando) que se mostraram sempre disponíveis a ajudar e a esclarecer as minhas dúvidas com grande simpatia e paciência apesar da barreira linguística.

Resumo

Nos caprinos a utilização de sémen refrigerado tem uma grande limitação, pois apresenta um curto prazo de viabilidade, impedindo o seu armazenamento ou transporte durante longos períodos. Este estudo avalia o efeito do diluidor Beyond® para cavalos em sémen de caprino. Para tal, foi aplicado o protocolo deste diluidor no ejaculado. Foram recolhidas 30 amostras de sémen de chibos, de fertilidade provada do Centro de Seleção e Reprodução Animal de Badajoz (Espanha), ao qual foi adicionado o diluidor Beyond® para verificar se a longevidade de sémen refrigerado era prolongada com sucesso. As amostras foram mantidas numa caixa de transporte com uma temperatura oscilante, e no frigorífico com uma temperatura constante de 7°C. Os parâmetros de cada amostra, a motilidade progressiva (MP) a motilidade total (MT), a velocidade curvilínea (VCL), a velocidade em linha reta (VSL), a velocidade média do percurso (VAP) e o índice de motilidade espermática (SMI) foram avaliadas das 0h às 96h, sendo que as do frigorífico eram avaliadas também após 1 semana. O uso do Beyond® forneceu resultados estatisticamente melhores no que respeita à longevidade espermática, uma vez que aparenta ter melhor eficácia na refrigeração do sémen de caprino das 0h às 48h em comparação com os restantes períodos de 72h a 1 semana e em comparação aos valores estatísticos literários disponíveis na atualidade.

Palavras-chave: Beyond ®; caprinos; diluidor; refrigerado; sémen; transporte.

Abstract

In goats, the use of refrigerated semen has a major limitation, as it has a short viability period, preventing its storage or transport for long periods. This study evaluates the effect of the Beyond® extender for horses on goat semen. To this end, the protocol of this extender was applied to the ejaculate. 30 samples of semen were collected from bucks, of proven fertility from the Animal Selection and Reproduction Center of Badajoz (Spain), to which the extender Beyond® was added to verify whether the longevity of refrigerated semen was successfully prolonged. The samples were kept in a transportation box with an oscillating temperature, and in the refrigerator with a constant temperature of 7°C. The parameters of each sample, progressive motility (MP), total motility (MT), curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), mean travel velocity (VAP) and sperm motility index (SMI) were evaluated from 0h to 96h, and the ones from the refrigerator were also evaluated after 1 week. The use of Beyond® provided statistically better results regarding sperm longevity, it appears to have better efficacy in refrigerating goat semen from 0h to 48h compared to the remaining periods of 72h to 1 week and compared to the literary statistical values available at the time.

Key words: Beyond ®; extender; goats; refrigerated; semen; transport.

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ATP – Adenosina Trifosfato

BCF – Frequência de Batida Cruzada

CASA – Computador Automático de Análise Espermática

CENSYRA – Centro de Seleção e Reprodução Animal

CO₂ – Dióxido de carbono

FSH – Hormona folículo estimulante

h – Horas

IA – Inseminação Artificial

ISAS – *Integrated Semen Analysis System*

min – Minutos

ml – Mililitros

nm – Nanómetros

P4 – Progesterona

rpm – Rotações por Minuto

SMI – Índice de Motilidade Espermática

T – Transmitância

T4 – Testosterona

µl – Microlitros

µm – Micromilímetros

VAP – Velocidade Média do Percurso

VCL – Velocidade Curvilínea

VSL – Velocidade em Linha Reta

°C – Graus Celsius

Índice

Índice de Quadros	viii
Índice de Figuras.....	ix
1. Introdução e Objetivos.....	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	2
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 O espermatozoide	3
2.1.1 Morfologia dos espermatozoides	3
2.2 Produção e maturação espermática.....	7
2.2.1 Espermatogênese.....	7
2.2.2 Maturação do espermatozoide no epidídimo	8
2.4 Composição do sémen	9
2.4.1 Sémen	9
2.4.2 Plasma seminal.....	9
2.5 Manipulação do sémen em caprinos.....	10
2.5.1 Recolha de sémen com vagina artificial	10
2.5.2 Fatores que afetam a sobrevivência dos espermatozoides	10
2.5.3 Diluição seminal	12
2.6 Avaliação da qualidade do sémen	14
2.6.1 Análise macroscópica.....	14
2.6.2 Análise microscópica	15
2.7 Inseminação artificial e preservação de sémen caprino.....	17
3. Materiais e Métodos.....	19
3.1 Animais	19
3.2 Colheita do sémen	19
3.3 Processamento do sémen	19

3.3.1 Motilidade Massal.....	19
3.3.2 Volume	20
3.3.3 Concentração	20
3.3.4 Primeira diluição	20
3.3.5 Centrifugação.....	21
3.3.6 Cálculos para a diluição com diluidor para cavalos Beyond®	21
3.3.7 Simulação de transporte de sémen	21
3.3.8 Controlo de temperatura	22
3.4 Métodos.....	22
3.4.1 Parâmetros a avaliar e desenho experimental	23
3.4.2 Análise Estatística	24
4. Resultados e Discussão	25
4.1 Resultados	25
4.2 Discussão	30
4.2.1 Limitações e pesquisas futuras	32
6. Conclusões	34
7. Bibliografia.....	35
8. Anexos	38
Anexo A – Protocolo de utilização de Beyond® em sémen caprino	38

Índice de Quadros

Quadro 1 - Média dos volumes (ml) e concentrações (mil milhões/ml) obtidas das 30 amostras.....	25
Quadro 2 – Comparação das Médias dos Parâmetros entre as amostras da Caixa e as do Frigorífico.....	26
Quadro 3 - Comparação do SMI entre as amostras da Caixa e as do Frigorífico	27
Quadro 4 - Comparação de motilidades às 0h do Beyond® com duas referências bibliográficas de diluidores de caprinos diferentes.....	28
Quadro 5 - Comparação da Utilização do Diluidor Beyond® a 96h na Caixa, a 96h no Frigorífico e a uma Semana no Frigorífico com Referências Bibliográficas	29

Índice de Figuras

Figura 1 - Caixa para Simulação de Transporte de Amostras de Sémén	22
Figura 2 - Gráfico Representativo das Médias das Oscilações Diárias de Temperatura Dentro da Caixa	29

1. Introdução e Objetivos

1.1 Introdução

A inseminação artificial é fundamental para programas de melhoramento genético, não só pelo facto de se obterem animais geneticamente superiores para produção e reprodução, como para prevenir doenças sexualmente transmissíveis.

Nos caprinos a utilização de sémen refrigerado tem uma grande limitação, pois apresenta um curto prazo de viabilidade, impedindo o seu armazenamento ou transporte durante longos períodos, sendo que a criopreservação é a alternativa mais viável, requerendo a utilização de mais espaço e material tendo um impacto monetário superior. Assim, o sucesso na preservação de sémen de caprino fresco é de grande interesse e está dependente de uma variedade de fatores, como a qualidade do sémen, a sua manipulação e o tipo de diluidor utilizado (Gibbons et al, 2012).

A análise do sémen tem como objetivo avaliar a qualidade do ejaculado e a capacidade reprodutiva do macho. Esta análise é fundamental para a reprodução assistida e inclui uma série de observações macroscópicas importantes: a cor e o odor são indicadores importantes da saúde do animal, o volume e a concentração do ejaculado são medidas cruciais, pois alterações nos padrões normais podem afetar a fertilidade tendo impacto significativo na capacidade reprodutiva do macho (Lalaguna, 2012).

Com uma análise microscópica do sémen, é possível avaliar parâmetros essenciais na avaliação da fertilidade do sémen, sendo feita uma análise computadorizada que permite observar a presença de anomalias e outros parâmetros da amostra que se refletem diretamente na sua qualidade. A motilidade progressiva (MP) a motilidade total (MT), a velocidade curvilínea (VCL), a velocidade em linha reta (VSL), a velocidade média do percurso (VAP), a Batida de Frequência cruzada (BCF) e o índice de motilidade espermática (SMI) são avaliações essenciais de qualidade espermática, juntos estes parâmetros fornecem uma visão abrangente da capacidade fertilizante do sémen (Horst, 2020), desde que este tenha propriedades adequadas para que ocorra uma inseminação bem-sucedida (Leboeuf et al, 2000).

Os diluidores são adicionados ao sémen para criarem um ambiente protetor e nutritivo que previne alterações adversas na motilidade dos espermatozoides, na funcionalidade da membrana e na integridade acrossómica. Estes diluidores são

produzidos para mimetizar o ambiente natural do sémen, fornecendo características essenciais que prolongam a sua vitalidade e longevidade durante maiores períodos, facilitando o seu transporte até à inseminação artificial, garantindo um melhor sucesso reprodutivo (Bustani & Baiee, 2021).

1.2 Objetivos

O objetivo geral do trabalho foi verificar se a utilização do diluidor Beyond® para cavalos, consegue prolongar a longevidade espermática de sémen de caprino refrigerado durante o transporte.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Avaliar a MT, a MP, a VCL, a VSL, o VAP e o SMI de sémen de caprino refrigerado às 0h, às 24h, às 48h, às 72h, às 96h e após 1 semana;
- Comparar os resultados das amostras mantidas numa caixa de transporte com as do frigorífico (7°C);
- Detetar diferenças no que respeita à longevidade espermática de sémen refrigerado com Beyond® e congelado encontradas na bibliografia para os parâmetros de MT, MP, VCL, VSL e VAP.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 O espermatozoide

2.1.1 Morfologia dos espermatozoides

Durante a espermatogênese nos túbulos seminíferos do testículo e o processo de maturação dos espermatozoides no epidídimo, algumas anomalias morfológicas podem ocorrer, resultando em espermatozoides com características diferentes das que permitem uma fecundação com uma taxa de sucesso elevada. Quando as percentagens de espermatozoides normais são inferiores ao esperado denomina-se de teratozoospermia, a qual pode prejudicar a fertilidade do macho.

Estas anomalias podem ocorrer nas diversas partes do espermatozoide, (cabeça, corpo e flagelo) dificultando então a sua capacidade de movimento. Por estas razões, a análise morfológica espermática é uma etapa imprescindível quando falamos de reprodução, pois estas características estão diretamente ligadas às funções do espermatozoide (David et al., 2019).

O espermatozoide caprino é composto por uma cabeça, que contém cerca de sessenta cromossomas, e um flagelo longo que permite a sua mobilidade com cerca de sessenta micromilímetros (μm) (Gravance *et al.*, 1995). Os caprinos conseguem ejacular entre dois a seis milhões de espermatozoides por centímetro cúbico, com um volume médio de 0,1 a 0,5 mililitros (ml) de ejaculado. O tempo de formação dos espermatozoides é de cerca de quarenta dias, porém a sua quantidade pode alterar-se devido a fatores internos e externos, como a raça do animal e variações nos níveis hormonais, o tamanho dos testículos que está diretamente relacionado com a produção espermática, a alimentação que afeta diretamente o estado de saúde do animal e a altura do ano, relativamente ao fotoperíodo e a temperatura do ambiente. Todos estes fatores podem afetar a espermatogênese (Quittet, 1978).

2.1.1.1 Cabeça

Na visualização microscópica, a cabeça do espermatozoide pode ser dividida em duas porções diferentes, o acrossoma e a região pós-acrossómica. A cabeça do espermatozoide caprino deve apresentar uma forma oval sem irregularidades, tendo um comprimento de $7,69\mu\text{m}$ e uma largura de $3,80\mu\text{m}$ (Gravance *et al.*, 1995). sendo que a

região acrossômica deverá ocupar até cerca de 70% da área total da cabeça do espermatozoide (Quittet, 1978).

2.1.1.2 Acrossoma

O acrossoma é formado por uma membrana que está diretamente ligada à face interna da membrana plasmática e à face externa da membrana nuclear. Entre os dois, existe uma zona que contém várias enzimas hidrolíticas como as proacrosinas, as hialuronidases, as esterases e as hidrólases. Estas enzimas formam o conteúdo acrossômico que é libertado para o exterior durante a reação acrossômica, processo que ocorre no trato reprodutor feminino e que é necessário para a fecundação do oócito. No entanto, este processo pode ser ativado por outros fatores durante o processamento do sémen para refrigeração ou congelamento, causando assim degeneração dos espermatozoides por morte celular.

A ativação antecipada deste processo causa uma grande perda na taxa de sucesso da fecundação, por isso, a observação da integridade acrossômica é um passo bastante importante na avaliação espermática, pois garante que a qualidade e o potencial do esperma no momento da fecundação se mantenham elevados. Esta avaliação pode ser realizada a partir de esfregaços corados e observação microscópica com uma iluminação de campo clara na objetiva de 100x (Lalaguna, 2012).

2.1.1.3 Núcleo

O núcleo é formado por uma membrana nuclear que contém um número haploide de cromossomas e nucleoprotéínas. Durante a espermatogénese ocorre uma condensação progressiva da cromatina que está diretamente associada a modificações químicas do ácido desoxirribonucleico (ADN) (Lalaguna, 2012). Durante a maturação no epidídimo, este mecanismo de condensação é estabilizado com o aumento de ligações de dissulfato aos grupos tiol dos resíduos de cisteína. Assim, a condensação da cromatina permite uma mobilidade espermática aumentada, pois diminui o volume do núcleo e ao mesmo tempo protege o material genético de fatores agressivos, como a exposição acídica ao trato reprodutor feminino (David *et al.*, 2019).

Após a penetração do oócito pelo espermatozoide, deverá ocorrer uma descondensação da cromatina, reduzindo as ligações de dissulfato do núcleo espermático, com o objetivo de formar um pronúcleo masculino durante o processo de fecundação (Sakkas *et al.* 1996). Este é a forma reorganizada do núcleo do espermatozoide dentro do

oócito fertilizado, e desempenha um papel fundamental na formação do zigoto para dar início ao desenvolvimento embrionário (David *et al.*, 2019).

A capacidade de fecundação do espermatozoide está diretamente dependente da sucessão adequada de três eventos: a condensação da cromatina durante a espermatogênese; a estabilização durante a maturação no epidídimo e, por último, a sua descondensação dentro do oócito no momento da fecundação. Qualquer alteração nesta sucessão de eventos, ou algum dano causado ao espermatozoide que dificulte a realização destas funções pode comprometer a integridade genética, a motilidade e a sua capacidade de fertilização (Sakkas *et al.* 1996).

2.1.1.4 Flagelo

O flagelo permite a movimentação do espermatozoide para que este consiga fecundar o oócito com sucesso. Este tem de apresentar um movimento progressivo, que consiste numa movimentação rítmica, permitindo o transporte do espermatozoide em trajetórias lineares. Simultaneamente, deve ser capaz de realizar reotropismo para que consiga nadar contra a corrente, e que permita a sua ascensão pelo trato reprodutor feminino. Se o flagelo estiver a funcionar corretamente, o espermatozoide é capaz de navegar a uma velocidade aproximada de 2 milímetros (mm) por minuto, levando cerca de 10 a 12 horas (h) para atingir os oócitos e realizar a fecundação.

Caso se verifique alguma anomalia que cause movimentos de translação ou de rotação, o espermatozoide vai ter dificuldade em realizar uma subida constante pelo trato reprodutor feminino, sendo que a taxa de sucesso de fecundação será bastante diminuída, pois não consegue concluir a ascensão, acabando por gastar todas as suas reservas energéticas (Márcio, 1986).

2.1.1.7 Motilidade dos espermatozoides

Um dos fatores mais importantes para o sucesso de fecundação do oócito pelo espermatozoide, é a sua capacidade de movimento adequado para realizar a sua ascensão pelo trato reprodutor feminino. Assim a determinação da motilidade espermática é um fator fundamental na análise da qualidade do sémen. Esta determinação é feita por uma Análise de Sémen Assistida por Computador (CASA), que permite uma avaliação precisa e objetiva de diferentes parâmetros do sémen com base nas células espermáticas individuais. Parâmetros como a concentração, a motilidade progressiva e diferentes tipos de velocidades podem ser determinadas a partir deste programa, como a velocidade

curvilínea (VCL), a velocidade em linha reta (VSL), o caminho médio de velocidade (VAP), entre outras (Khan *et al.*, 2016).

Os espermatozoides podem realizar vários tipos de movimentos, podendo estes ser progressivos, circulares ou oscilatórios. Tendo em conta que para obter uma taxa de fertilidade elevada, as amostras de sémen utilizadas devem apresentar uma porção alta de espermatozoides com motilidade progressiva. Estes espermatozoides apresentam um movimento linear e progressivo no plasma seminal, com capacidade de avançar no trato reprodutor feminino e chegar ao ócito com sucesso. Estas características são individuais de cada célula espermática, e a sua qualidade está dependente de um número variado de fatores, como o processo de recolha de sémen e o seu maneo após recolha, oscilações de temperatura, a preparação de amostras e o tempo de intervalo entre a recolha e a avaliação dos parâmetros da amostra (Lalaguna, 2012).

2.1.1.8 Metabolismo dos espermatozoides

A sobrevivência do espermatozoide está dependente de vários fatores, entre eles as reservas de energia contidas no plasma seminal, nomeadamente a frutose que fornece a energia necessária para manter a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides (Niswender *et al.*, 1987).

O consumo de energia é responsável pela continuação do desenvolvimento de todas as células vivas, incluindo dos gâmetas. A produção de adenosina trifosfato (ATP) pode ser realizada por duas vias metabólicas, fornecendo energia para as principais funções do esperma: a fosforilação oxidativa e a glicólise. A glicólise ocorre no citoplasma do espermatozoide, com o objetivo de fornecer energia para o metabolismo do gâmeta. Açúcares como a frutose e a glicose, são consideradas a principal fonte de energia do espermatozoide, porém a frutose tem a capacidade de manter a funcionalidade e a integridade da membrana, bem como a motilidade espermática pós descongelação. Estes dissacarídeos não são permeáveis, interagem com os fosfolípidos da membrana plasmática aumentando a sobrevivência dos espermatozoides durante a criopreservação. Como resultado do processo de metabolização destes açúcares pelas células espermáticas, são produzidas pequenas quantidades de dióxido de carbono (CO₂), água e ácido láctico. Quando as concentrações destes resíduos, provenientes da metabolização, se encontram em níveis elevados podem provocar um efeito inibidor da motilidade espermática, sendo que o sémen fresco tem um período de vida muito curto (David *et al.*, 2019).

Diluidores com glicose podem ser utilizados para prolongar a vida média das amostras, sendo utilizados como uma reserva extra de energia para a metabolização das células espermáticas (Bustani & Baiee, 2021). Apesar de esta adição aumentar a longevidade das amostras, a acumulação de resíduos provenientes da metabolização continuará a aumentar ao longo do tempo, provocando danos irreversíveis na viabilidade dos espermatozoides, com o comprometimento da integridade genética, das membranas celulares e da sua motilidade (David *et al.*, 2019).

2.2 Produção e maturação espermática

2.2.1 Espermatogénese

A espermatogénese é um processo indispensável no desenvolvimento do órgão reprodutor do macho, pois é este processo que irá dar origem aos espermatozoides. Esta produção de espermatozoides acontece nos túbulos seminíferos dos testículos e pode-se dividir em três etapas diferentes: replicação miótica; meiose e diferenciação pós meiótica de espermatozoides (Niswender *et al.*, 1987). Ocorre devido à morfologia dos túbulos seminíferos, os quais são constituídos por células somáticas de Sertoli e uma linha de células seminíferas, sendo que juntas formam o epitélio seminífero. Estas células têm um formato cilíndrico e contêm um núcleo de tamanho variável perto da sua membrana basal, multiplicando-se durante a vida do animal até este atingir a puberdade (David *et al.*, 2019).

As células de Sertoli ocupam toda a superfície do epitélio dos túbulos seminíferos para que se mantenham em contacto com as células germinativas durante todo o processo. Têm como função proporcionar suporte físico e nutricional durante a espermatogénese (David *et al.*, 2019).

A hormona folículo estimulante (FSH) e a testosterona (T_4) são essenciais para a atividade normal das células de Sertoli, pois são estas hormonas que vão iniciar os processos de multiplicação celular. São reguladas por hormonas como a activina e a inibina (David *et al.*, 2019). Durante este processo, as células germinativas primordiais migram para a crista genital para se diferenciarem em espermatogónias. Estas são divididas em duas classes diferentes: as de primeira classe, que formam reservas nas células tronco dos túbulos seminíferos e as de segunda classe que são submetidas a mais divisões mitóticas e meióticas (David *et al.*, 2019).

Todas as espermatogónias se mantêm em contacto com a membrana basal, todavia as de segunda classe têm uma área de contacto bastante mais reduzida. Quando a última divisão meiótica ocorre, as espermatogónias originam espermatócitos e o citoplasma das células de Sertoli intercede entre a membrana basal e os espermatócitos primários. Por outro lado, a síntese de DNA ocorre durante as divisões mitóticas durante a formação do núcleo tetraploide. A primeira divisão meiótica ocorre, e as células movem-se mais profundamente no epitélio seminífero, formando agregados de células de Sertoli em cima dos espermatócitos que se irão degenerar, para que estas consigam atravessar a barreira hemato-testicular. Por conseguinte, formam-se os espermatócitos secundários, os quais se deslocam para o compartimento basal e luminal do epitélio seminífero, sendo, posteriormente, separados do compartimento geral do fluido tecidual (David *et al.*, 2019).

A segunda e última divisão meiótica origina espermátides, que já não sofrem nenhum processo de multiplicação. As espermátides são células redondas com núcleo que irão sofrer mudanças na sua morfologia e função, com o objetivo de originarem espermatozoides. Esta transformação ocorre durante a espermiogénese, que envolve uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas essenciais para capacitar os espermatozoides para a fertilização do oócito, como a condensação do núcleo, a formação do acrossoma e o desenvolvimento do flagelo (David *et al.*, 2019).

2.2.2 Maturação do espermatozoide no epidídimo

Durante a sua permanência no epidídimo, os espermatozoides sofrem uma série de alterações que fazem parte do processo de maturação. Este processo inicia-se na cabeça do epidídimo, passando pelo corpo até à cauda, através de uma gota protoplasmática. Esta característica permite que uma pequena quantidade de citoplasma residual permaneça ligada ao espermatozoide durante a sua maturação (Niswender *et al.*, 1987).

Ao longo deste processo surgem alterações bioquímicas e morfológicas ao nível do epidídimo, que causa a estabilização da cromatina, alterações macromoleculares na membrana acrossómica e na membrana plasmática e o aparecimento de incorporações de proteínas sintetizadas pelo epitélio do epidídimo nas proteínas espermáticas. Estas alterações permitem que os espermatozoides adquiram capacidade de sobrevivência e motilidade progressiva, tornando-os aptos para fertilizar o oócito no trato reprodutor feminino (David *et al.*, 2019).

Após estas transformações, os espermatozoides maduros são armazenados na cauda do epidídimo, que está ligada ao ducto deferente. Este ducto prolonga-se ao longo do cordão espermático até à uretra, percurso que os espermatozoides irão fazer no momento da ejaculação (Niswender *et al.*, 1987).

2.4 Composição do sémen

2.4.1 Sémen

O sémen é uma suspensão líquida constituída por espermatozoides e secreções de glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino. Uma grande porção desse líquido é formada pelo plasma seminal, que se forma durante a ejaculação (Moula & Amiri, 2021).

2.4.2 Plasma seminal

O Plasma seminal resulta de um conjunto de secreções de várias glândulas acessórias e componentes do órgão genital masculino, incluindo o epidídimo, a próstata, as vesículas seminais, as glândulas bulbouretrais e outras microglândulas que se encontram na parede uretral (Moula & Amiri, 2021).

É uma substância que influencia a fisiologia e a função do esperma, podendo estar diretamente correlacionada com a qualidade e a fertilidade do sémen. É composto por açúcares, antioxidantes, sais, minerais e um grande número de proteínas, sendo que 75% da sua composição é água (Moula & Amiri, 2021).

Tem como função transportar os espermatozoides e fornecer um meio rico em nutrientes que garantam a sobrevivência dos espermatozoides após serem depositados no trato genital feminino (Moula & Amiri, 2021).

Estas características estão continuamente expostas a uma variedade de fatores que podem afetar a sua composição bioquímica, tais como: a raça, a idade, frequência e técnica de recolha de sémen, nutrição, estação do ano e stresse térmico (Moula & Amiri, 2021).

O plasma seminal dos caprinos é um líquido isotónico transparente ou opaco, embora o sémen se apresente branco devido à sua alta concentração de espermatozoides. O pH mantém-se próximo dos 7,0 por um sistema tampão (bicarbonato-carbonato) que protege os espermatozoides de alterações abruptas de pH. Estas alterações podem

prejudicar a sobrevivência da célula espermática, afetando diretamente a fertilidade (Lalaguna, 2012).

2.5 Manipulação do sémen em caprinos

2.5.1 Recolha de sémen com vagina artificial

Nos caprinos, apesar da concentração espermática ser elevada, o volume do ejaculado é bastante reduzido.

É possível realizar a recolha por eletroejaculação, no entanto este pode causar hemospermia (presença de sangue) ou urospermia (presença de urina) que altera a qualidade do sémen. Assim, na maioria dos pequenos ruminantes, o sémen é recolhido através de uma vagina artificial, onde o macho monta uma fêmea em estro ou um manequim, sendo que, no momento da ejaculação, um técnico capacitado coloca o pênis do animal no interior da vagina artificial para a recolha do sémen. Para tal, é necessário fazer recolhas recorrentes para treino destes animais, bem como profissionais treinados e capacitados para fazerem a recolha (Leão, 2018).

A vagina artificial consiste num corpo vaginal de borracha contida num tubo texturizado pouco flexível, que permite o enchimento com água quente (37-39°C) e ar de modo a controlar a temperatura e a pressão. Este tubo está acoplado a um cone de borracha numa das extremidades, ligado a um tubo coletor graduado onde se irá depositar o sémen.

Todo este material deve estar envolvido numa bolsa de material isolante, para garantir que a temperatura se mantenha desde a recolha até ao processamento do sémen (Gibbons *et al.*, 2012).

Antes da sua utilização, é conveniente higienizar o prepúcio do animal com clorexidina diluída e tricotomia se necessário, a fim de evitar contaminação do ejaculado.

A vagina artificial deve estar lavada, desinfetada e apenas ligeiramente lubrificada, pois o uso de demasiado lubrificante irá misturar-se com o sémen no tubo coletor alterando o volume da amostra e causando o aparecimento de detritos na observação microscópica (Vera & Ricarte, 2009).

2.5.2 Fatores que afetam a sobrevivência dos espermatozoides

O sémen é muito sensível a variadas alterações. Apesar de apresentar boa qualidade no momento da recolha, deteriora-se com facilidade e, por isso, é necessário

tomar medidas de precaução ao manipular amostras de sémen para que este mantenha a sua qualidade original durante o maior tempo possível (Lalaguna, 2012).

2.5.2.1 Alterações de temperatura

No momento da ejaculação o sémen encontra-se aproximadamente a 37,5 graus Celsius (°C) (temperatura corporal). Quanto mais alta for a temperatura (relativamente à temperatura normal) maior é a taxa metabólica dos espermatozoides e esgotam mais rapidamente as reservas de energia, diminuindo assim o tempo de vida dos espermatozoides.

Se a temperatura atingir os 45°C causa a morte de todos os espermatozoides. Por outro lado, se ocorrer uma diminuição da temperatura, a taxa metabólica dos espermatozoides diminui e pode causar uma perda irreversível de viabilidade. Se se atingir menos de 10°C sem a presença de crioprotetores, ocorre um choque térmico que danifica permanentemente a motilidade do sémen perdendo assim a sua capacidade de fertilização (Lalaguna, 2012).

Posto isto, a manipulação do sémen deve ser realizada sempre à mesma temperatura, até mesmo no momento da adição do diluente (Bustani & Baiee, 2021).

2.5.2.2 Presença de luz

A luz solar direta é prejudicial para a viabilidade espermática. A colheita e a manipulação de sémen devem ser realizadas em ambientes fechados para evitar o contacto prolongado com a luz solar. Exposições a luz ultravioleta pode causar danos ao ADN dentro das células espermáticas reduzindo a sua viabilidade (Lalaguna, 2012).

2.5.2.3 Contacto com água

A água reduz a pressão osmótica do plasma seminal, conduzindo à morte dos espermatozoides. É um agente espermicida, sendo que medidas de precaução devem ser implementadas durante a manipulação do sémen. Todo o material que possa entrar em contacto com as amostras deve estar devidamente seco, e a lavagem de todos esses materiais deve ser realizada com água destilada (Lalaguna, 2012).

2.5.2.4 Contacto com impurezas e bactérias

Bactérias, poeiras, pelos, urina, entre outros contaminantes podem reduzir a viabilidade espermática ou até mesmo matar os espermatozoides. A utilização de diluidores com antimicrobiano é uma boa forma de combater este problema. Tampas ou

papel filme devem ser utilizados para cobrir as amostras de sémen sempre que estas não estão a ser utilizadas, de forma a impedir a entrada de impurezas para dentro dos recipientes (Lalaguna, 2012).

2.5.2.5 Capacidade tampão do diluidor

O meio utilizado para diluir a amostra de sémen deve ter capacidade tampão apropriada para manter o pH ótimo. Alterações de pH alcalinas ou ácidas diminuem a viabilidade do esperma (Lalaguna, 2012).

2.5.3 Diluição seminal

As diluições seminais têm como objetivo proporcionar um meio capaz de prolongar a preservação das amostras de sémen para inseminação.

Contêm características que fornecem energia e preservam o metabolismo espermático. Controlam o pH para que este se mantenha entre 6.8 e 7.2, diminuem a transmissão bacteriana pela presença de antimicrobianos e fungicidas e conseguem prevenir stresse oxidativo pela presença de antioxidantes. Estas características mantêm as amostras de sémen em boas condições para que este possa ser refrigerado, congelado ou transportado para inseminação a fresco, garantindo que a taxa de fertilização da amostra continue alta.

Atualmente, existem diversos produtos que compõem os diluidores. Podem ser de origem animal e ou vegetal e todos possuem características diferentes dependendo da sua utilidade e da espécie para que são utilizados. A escolha destes diluidores deve ter em conta o objetivo de utilização do sémen (refrigeração, congelação ou transporte), para que possua os requisitos necessários para obter resultados positivos (Bustani & Baiee, 2021).

2.5.3.1 Diluidor composto por gema de ovo

O diluidor à base de gema de ovo é muito usado em sémen refrigerado ou para congelação. As suas reservas de colesterol e fosfolípidos ajudam a proteger a membrana celular dos espermatozoides contra lesões criogénicas, evitando a perda fosfolipídica dessa mesma membrana durante os processos de refrigeração ou congelamento.

As proteínas contidas na gema de ovo têm propriedades hidrofóbicas, impedindo a penetração de água na parede celular do espermatozoide, evitando assim a sua deterioração. Segundo um estudo de Bustani & Baiee (2021), verificou-se que durante a criopreservação os espermatozoides sequestram lipoproteínas de baixa densidade da

gema de ovo para se protegerem contra a alteração da temperatura (Bustani & Baiee, 2021).

Apesar de estas características positivas, a utilização da gema de ovo acarreta algumas desvantagens, como o risco de transmissão de doenças ou de contaminação bacteriana, bem como a captura de detritos da gema durante a avaliação microscópica do sémen. Assim, este diluidor é usado em diversas concentrações, sendo que o mais comum tem uma concentração de 20% adicionando-se-lhe frutose e glicerol, conferindo-lhe capacidade de preservar a fertilidade das amostras de sémen animal durante um longo período.

Outro fator que deve ser considerado, no que respeita à utilização de diluidores à base de gema de ovo, é a espécie do ovo utilizado. Comprovou-se através de um estudo realizado em 2018, que a espécie do ovo tem efeitos diferentes na qualidade do sémen de espécies distintas, por exemplo, o ovo de codorniz tem mais efeitos positivos no sémen de touro do que o ovo de galinha, e o de galinha tem mais efeito no sémen de cervo do que o ovo de codorniz. Assim, todos estes parâmetros têm de ser tomados em conta quando se escolhe a utilização de um diluidor à base de gema de ovo (Bustani & Baiee, 2021).

2.5.3.2 Diluidor composto por leite

O diluidor à base de leite desnatado foi adaptado para a congelação de sémen de mamíferos. Contém adições de arabinose, frutose e, por vezes, pequenas concentrações de gema de ovo. Estes diluidores, ao contrário dos de gema de ovo, possuem proteínas com propriedades hidrofílicas que não conseguem difundir a parede celular dos espermatozoides, controlando ao mesmo tempo o pH e evitando danos durante a alteração de temperatura (Bustani & Baiee, 2021).

2.5.3.3 Diluidor composto por lecitina de soja

A lecitina de soja é um suplemento obtido através da extração de óleo de grãos de soja. Foi desenvolvido comercialmente para a criopreservação de sémen, como alternativa a diluidores provenientes de produtos de origem animal. Este diluidor é composto por ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico e fosfatidilcolina, que evitam um choque térmico durante a criopreservação do sémen. Pode ser usado em diferentes concentrações e apresenta resultados diferentes consoante a concentração. A utilização de uma concentração a 6%, aumenta a motilidade espermática e reduz a contaminação

bacteriana de sémen de touro descongelado. Por outro lado, uma concentração de 25% melhora a viabilidade espermática, a integridade da membrana e a integridade acrossômica do esperma de touro, se este se mantiver a 5°C (Bustani & Baiee, 2021).

2.5.3.4 Diluidor composto por glicerol

O glicerol é um componente com propriedades adequadas para a criopreservação de sémen com azoto líquido, sendo este um crioprotetor celular que pode ser usado em diferentes concentrações. As concentrações podem variar entre 3% a 9%, e os melhores resultados, relativamente à preservação da motilidade, são obtidos quando se utilizam concentrações entre 4% a 7%.

Este diluidor tem a capacidade de aumentar o volume de canais de solventes descongelados e diluir as altas concentrações de sais durante o processo de arrefecimento. Pode ser adicionado a diluidores de gema de ovo, na medida em que após o descongelamento, os resultados são benéficos (Bustani & Baiee, 2021).

2.5.3.5 Diluidor Beyond®

Beyond® (Minitube) é um diluidor comercial sintético de composição desconhecida que contém antimicrobianos e fungicidas. Apresenta uma coloração transparente a ligeiramente leitoso, variando entre incolor e amarelado. Foi fabricado com o intuito de prolongar o armazenamento refrigerado de sémen equino a +5°C durante 14 dias ou +17°C durante 7 dias. Para além de um pré diluidor não necessita de qualquer tipo de adição posterior, e tem a capacidade de manter a fertilização do sémen, garantindo uma maior flexibilidade para inseminações em éguas.

2.6 Avaliação da qualidade do sémen

A análise do sémen tem como propósito avaliar a qualidade de um ejaculado e as capacidades do macho como reprodutor. Os espermatozoides têm uma função biológica complexa e são bastante influenciados por fatores externos tanto *in vitro* como *in vivo*. Deste modo, perante a inexistência de uma única avaliação capaz de determinar a fertilidade de um ejaculado, existem várias técnicas laboratoriais que podem ser utilizadas para fazer essa avaliação (Lalaguna, 2012 e Gibbons *et al.*, 2012).

2.6.1 Análise macroscópica

Estas características são importantes e devem ser referidas independentemente da qualidade de outros parâmetros seminais (Lalaguna, 2012).

2.6.1.1 Cor e odor do sémen

Logo após a recolha, a coloração é o primeiro parâmetro observável. Geralmente, o sémen apresenta uma coloração branca ou creme pálida, contudo podem ocorrer alterações que modificam a cor do ejaculado (Gibbons *et al.*, 2012). A observação de uma cor rosada pode indicar hemospermia (presença de sangue), devido à presença de lesões penianas que podem ter ocorrido durante a colheita do ejaculado. Uma coloração cinza ou acastanhada pode ser um indicador de infecção no aparelho reprodutor do animal como orquite, epididimite ou prostatite (Lalaguna, 2012).

Um odor forte é característico de urospermia (presença de urina), que é mais comum quando a recolha seminal é realizada a partir de eletroejaculação (Lalaguna, 2012).

2.6.1.2 Volume e concentração

O volume é determinado a partir de um tubo coletor graduado. Este valor é variável de animal para animal, mas é imprescindível para calcular o número total de espermatozoides do ejaculado. Este varia em média entre os 0,7ml e 3ml (Gibbons *et al.*, 2012).

Existem várias técnicas para determinar a concentração, sendo possível utilizar um espectrofotómetro, um hemocitómetro, um colorímetro, a fluorometria ou um contador de partículas digital (Lalaguna, 2012). Este parâmetro encontra-se entre os 2 e os 6 mil milhões por ml (Gibbons *et al.*, 2012), e permitirá a determinação do número total de espermatozoides por ml, possibilitando a preparação das doses de sémen para inseminação artificial (IA), refrigeração ou congelação (Lalaguna, 2012).

2.6.2 Análise microscópica

Avalia parâmetros essenciais na avaliação da fertilidade do macho, como a morfologia, as motilidades e as velocidades (Lalaguna, 2012). Esta observação deve ser feita ao microscópio colocando uma gota da amostra numa lâmina e uma lamela para ser observada na objetiva de 10x num programa computadorizado.

2.6.2.1 Motilidade espermática

Esta característica está dependente de fatores intrínsecos como a morfologia do flagelo e a atividade enzimática das proteínas, e é influenciada ainda por fatores extrínsecos como a temperatura e a composição bioquímica do meio extracelular que envolve os espermatozoides (Lalaguna, 2012).

A motilidade inclui duas classes diferentes, a motilidade linear ativa e a percentagem total de espermatozoides com capacidade de movimento. Os padrões de movimento diferem tendo em conta a necessidade funcional do espermatozoide, como, por exemplo, as trajetórias lineares dentro do plasma seminal, que são fundamentais para penetrar o muco cervical, e na ascensão pelo trato reprodutor feminino em que o flagelo apresenta uma maior amplitude no seu movimento, até que este se torne irregular e assimétrico fornecendo a força necessária para atravessar a zona pelúcida do oócito. A este movimento vigoroso e não progressivo dá-se o nome de hiperatividade espermática (Khan *et al.*, 2016).

Esta avaliação é determinada pelo programa CASA, com capacidade de categorizar cada espermatozoide presente no campo microscópico em quatro classes diferentes: espermatozoides com uma trajetória retilínea; espermatozoides com uma trajetória curvilínea; a motilidade progressiva; e espermatozoides imóveis (Khan *et al.*, 2016).

Para além das motilidades, inclui também uma análise das variáveis cinéticas: a VCL, a VSL, a VAP, a BCF e o SMI. A VCL refere-se à velocidade ao longo da trajetória real e curvilínea; a VSL representa a velocidade ao longo de uma linha reta desde o início até ao fim do movimento; a VAP é uma trajetória que elimina as variações do movimento criando uma linha intermediária entre a VCL e a VSL. A BCF descreve a medição da batida da cabeça do espermatozoide enquanto este realiza uma trajetória. A SMI fornece uma média quantitativa da capacidade de os espermatozoides alcançarem o oócito para fertilização, parâmetro que interpreta a relação entre os MP, o VCL e a BCF. Estas velocidades proporcionam uma visão detalhada da capacidade de movimento do espermatozoide, refletindo-se diretamente na sua capacidade de fertilização (Horst, 2020).

2.6.2.2 Motilidade massal

Esta análise avalia a formação e a progressão de ondas produzidas pelo movimento espermático. A observação desta onda só é possível em espécies que possuam uma alta concentração de espermatozoides, como no caso dos pequenos ruminantes. Imediatamente após a recolha, coloca-se uma gota de sémen numa lâmina a 37° e observa-se ao microscópio ótico numa objetiva de 10x.

A classificação da motilidade massal está dependente de três fatores: a concentração, a motilidade progressiva e a velocidade progressiva dos espermatozoides.

Ao observar-se o movimento das ondas, recorre-se a uma escala de pontuação de 1 a 5, sendo que no 1 é possível visualizar apenas alguns espermatozoides móveis e no 5 visualizam-se ondas rápidas e vigorosa (Cargaleiro, 2012).

2.7 Inseminação artificial e preservação de sémen caprino

De momento, a IA é a melhor tecnologia disponível para desenvolver e melhorar programas de genética, sendo que esta temática está diretamente relacionada com técnicas de preservação de sémen. A preservação de sémen permite um uso mais eficiente de ejaculados de caprinos escolhidos pela sua genética, prolongando o seu uso durante e fora da época reprodutiva. A preservação de sémen a 15°C é adequada para períodos de armazenamento curtos, sendo que a preservação a 5°C é indicada para períodos mais prolongados de 12 a 24h (Naim, 2009).

Um grande número de diluidores e crioprotectores já foram testados na congelação de sémen caprino, incluindo: leite de vaca desnatado; citrato de sódio; glicose; gema de ovo; lactose; e sacarose. Estes testes foram baseados na viabilidade espermática após o descongelamento, avaliando a sua fertilidade. Dentro destes diluidores não foi possível definir o mais eficaz. Todavia, o leite de vaca desnatado com adição de glucose é o que se utiliza com mais frequência (Leboeuf *et al.*, 2000).

O sucesso da IA está dependente da coordenação do momento da inseminação e da ovulação da fêmea. Um estudo de 1966 demonstrou que a IA feita em diferentes intervalos de tempo, desde o início do estro natural, tem diferentes resultados na fertilidade, sendo que esta foi mais elevada quando a IA foi realizada nas primeiras 12h. Para os estros sincronizados (técnica realizada fora da época reprodutiva) são utilizadas esponjas intravaginais embebidas em progesterona (P₄), juntamente com administração de gonadotrofinas séricas (PMSG) ou coriônicas equinas (eCG) no momento da remoção da esponja, de modo a provocar ovulação. Neste caso, a IA deve ser realizada 43h após a remoção da esponja. Assim, de forma a garantir uma fertilidade satisfatória, a inseminação deve ser realizada perto do tempo de ovulação e, apesar da evolução na eficácia da sincronização hormonal, ainda existem variações temporais no momento do estro após o tratamento que podem afetar a fertilidade. Melhorias no processamento do

sémen, a curto e a longo prazo, ainda podem ser realizadas, a fim de garantir uma boa capacidade espermática no momento da fertilização (Leboeuf *et al.*, 2000).

3. Materiais e Métodos

Este estudo foi realizado entre 1 de abril e 25 de março de 2024 no Centro de Seleção e Reprodução Animal (CENSYRA) de Badajoz, em Espanha.

3.1 Animais

Para a realização deste estudo foram realizadas colheitas seriadas de catorze chibos de raça Verata (4), Florida (7) e Retinta (1) com idades compreendidas entre os 2 e os 5 anos de fertilidade provada. Para a recolha de todas as amostras de sémen foi utilizada uma de duas fêmeas recetivas de raça Retinta, com idades de 3 e 8 anos, contidas numa manga de forma a ficarem imóveis para os machos realizarem o salto. Foram utilizadas vaginas artificiais lubrificadas com gel não espermicida. Cada animal realizou um salto para recolha de ejaculado, sendo este utilizado para verificar a longevidade da utilização do diluidor Beyond® para cavalos durante o transporte no sémen de caprino.

3.2 Colheita do sémen

A recolha de sémen foi realizada todas as segundas-feiras com o auxílio de uma vagina artificial e de uma cabra Retinta recetiva contida numa manga. A vagina artificial consistia num corpo vaginal com uma torneira de entrada de água que permitia também a insuflação de ar, diminuindo o peso da vagina e possibilitando alterações da pressão interna. A mucosa interior era de borracha e estava conectada a um funil de borracha, que por sua vez encaixa num tubo coletor graduado. A vagina artificial era então envolvida numa bolsa termorreguladora para manter a temperatura. Após a recolha do ejaculado, a vagina foi agitada para que todo o sémen ficasse contido no tubo graduado para que fosse levado rapidamente para o laboratório para ser preparado e analisado.

3.3 Processamento do sémen

3.3.1 Motilidade Massal

A motilidade massal foi determinada a partir de uma gota a fresco no microscópio usando a objetiva de 10x. Atribuiu-se uma classificação numa escala de 0 a 5, ao observar a motilidade das ondas de sémen. Por correlação, foi possível determinar a motilidade individual e a qualidade da mesma. Esta avaliação foi feita por uma médica veterinária experiente na observação das gotas a fresco, capacitada para dar uma cotação apropriada ao que estava a visualizar.

3.3.2 Volume

O volume foi visualizado nos tubos coletores graduados, sendo que estes permitiram uma recolha de 10ml de amostra. O tubo foi posteriormente identificado com os últimos quatro dígitos da identificação do animal e o volume foi apontado numa folha de recolha seminal, juntamente com todos os outros dados recolhidos.

3.3.3 Concentração

A concentração espermática foi calculada por espectrofotometria realizada num equipamento *Thermo*, usando uma mistura de 10ml de citrato de sódio com 0,25 microlitros (μ l) de sémen. A máquina teve de ser regulada com os parâmetros a 540 nanómetros (nm) e 100.0% de transmitância (T), os quais permitem a medição da quantidade de luz absorvida por uma determinada solução. Os 540nm foram colocados manualmente e os 100.0%T foram calculados ao colocar um recipiente de citrato de sódio sem mistura de sémen na máquina, fazendo uma leitura a laser do citrato puro.

Para a realização da leitura da concentração de cada amostra foi adicionada, noutro recipiente, a mistura de citrato de sódio com sémen para que a máquina pudesse calcular a diferença entre o citrato puro e o citrato com 0,25 μ l de sémen.

A percentagem de T que aparece no equipamento tinha uma tabela de valores estipulada, onde a %T ($\lambda = 540\text{nm}$) é igual ao $N^\circ \text{ spz} \times 10^6$ baseada numa equação reta de ajuste polinomial de $\lambda = 1,2813 x^2 - 245,36 + 12818$. Dependendo da percentagem de T conseguimos identificar na tabela a concentração da amostra, que iria posteriormente permitir o cálculo das doses e da quantidade de diluidor a adicionar.

3.3.4 Primeira diluição

Após a obtenção dos parâmetros mencionados anteriormente, a amostra foi colocada num banho-maria a 33°C, de forma a manter a temperatura indicada para se realizar a primeira diluição com INRA 96®, sendo que este permitiu a conservação do sémen até à sua manipulação e preparação em laboratório. Esta diluição foi feita a 1:1, com diluidor que se encontrava à mesma temperatura que o sémen. Após a diluição o tubo foi selado com papel filme e colocado dentro de um copo com água em banho-maria, para se manter a uma temperatura constante dentro de uma geleira ao ser transportado para o próximo laboratório.

3.3.5 Centrifugação

Após a diluição feita com INRA 96® (IMV®), cada amostra teve de ser transferida para um tubo de 15ml para ser centrifugada a 1727 rotações por minuto (rpm) a 600 de força relativa centrífuga, durante 15 minutos (min) e a uma temperatura de 23°C. No final da centrifugação, a amostra estava visivelmente dividida em duas camadas diferentes, sendo que os *pellets* estavam agregados no fundo do tubo enquanto um sobrenadante branco flutuava no topo da amostra. Esse sobrenadante foi retirado numa câmara de fluxo laminar antes de se adicionar a próxima diluição.

3.3.6 Cálculos para a diluição com diluidor para cavalos Beyond®

Após a centrifugação alguns cálculos foram realizados para determinar a quantidade necessária de diluidor Beyond® a adicionar a cada amostra. Foi necessário ter em conta as perdas ocasionadas pela formação de *pellets* e pela eliminação do sobrenadante após a centrifugação. Para se determinar este valor foi reduzido 20% do volume total do ejaculado inicial (como indicado no protocolo do Beyond®), calculando assim o volume da amostra depois da centrifugação. Este resultado foi multiplicado pela concentração da amostra obtida previamente com o espectrofotómetro, obtendo-se o número total de espermatozoides da amostra. Para se obter uma diluição de 200×10^6 para cada dose, o número total de espermatozoides foi dividido por 200, para calcular o número de doses possíveis de realizar com a amostra, este resultado foi então multiplicado por 0,25 (valor em microlitros de cada palheta de inseminação) para se obter o volume total necessário para a realização das doses calculadas anteriormente. Por último, o volume total da amostra e o volume total após centrifugação foram subtraídos, de forma a calcular o volume total de diluidor a adicionar à amostra.

Ao terminar todos estes processos, cada amostra foi dividida em dois tubos *Eppendorf* de 1ml, um para se simular o transporte de sémen para inseminação numa caixa de transporte e outro para se manter durante uma semana no frigorífico para que esteja conservado sempre a uma temperatura constante.

3.3.7 Simulação de transporte de sémen

A caixa de transporte, uma caixa térmica de esferovite com paredes grossas (Figura 1), contendo apenas duas ranhuras para colocar duas placas de gelo, e dois espaços onde se enviam as amostras preparadas. Estas foram devidamente identificadas e colocadas num suporte, com o objetivo de simular o seu transporte durante 96h.



Figura 1 Caixa para Simulação de Transporte de Amostras de Sémén e o Termómetro

3.3.8 Controlo de temperatura

Dentro da caixa, ao lado das amostras, colocou-se um termómetro digital da Elitech©, que recolheu alterações de temperatura de 15 em 15min. Estes dados podiam ser consultados na aplicação *Elitech Data Logger*, que permitia a observação de um gráfico das oscilações de temperatura durante 24h, mostrando também a temperatura mínima e a máxima que a caixa atingiu durante esse tempo. Assim, foi possível controlar a temperatura dentro da caixa, trocando as placas de gelo após 24h de modo a garantir que a temperatura se mantinha entre os 5°C e os 8°C.

Os tubos *Eppendorfs* que se armazenados no frigorífico, estavam num suporte na parte de trás para que se mantivessem a uma temperatura constante de 7°C (com pequenas oscilações sempre que se abria o frigorífico), permitindo testar a durabilidade das amostras até as 168h (1 semana).

3.4 Métodos

Tendo todas as amostras devidamente preparadas e prontas para a simulação de transporte, foi realizada uma visualização destas para a determinação dos seus parâmetros iniciais. Para tal, efetuou-se uma diluição para análise com uma concentração mais pequena que permitiu a sua visualização ao microscópio. A diluição foi de 50×10^6 a partir da diluição de 200×10^6 .

Todos os equipamentos para a realização desta análise foram colocados a uma temperatura constante de 37°C, a fim de evitar alterações súbitas na temperatura que pudessem afetar as amostras.

A mesa de aquecimento continha as lâminas e as lamelas onde foram colocadas as amostras, bem como as pontas de pipetas que foram utilizadas para as recolhas. A platina do microscópio estava também à mesma temperatura.

Para observação ao microscópio foram colocadas 2 gotas de 5µl da amostra com diluição de 50×10^6 , colocando lamelas por cima das gotas para espalhar a amostra posteriormente observada na objetiva 10x. Com a utilização do programa de análise de sémen (ISAS®), foram capturados quatro campos que continham entre 50-100 espermatozoides, de modo a obter aproximadamente 200 espermatozoides no total. Em cada campo, verificou-se se o ISAS® identificou corretamente todos os espermatozoides estáticos e se alguns estavam em falta foram adicionados manualmente. Se, por erro, alguns detritos se confundiram com espermatozoides estáticos, estes eram eliminados. Os dados obtidos pelo ISAS®, foram guardados e devidamente identificados no computador, com um código que continha a identificação do animal, a data de recolha e o tempo que terá passado desde a recolha (Ex: 2147 04.15.24 - 24h).

Para as amostras que se encontravam dentro da caixa de esferovite foi realizada uma análise inicial, uma análise às 24h, uma análise às 48h, uma análise às 72h e, por fim, uma análise às 96h. Para as amostras que se encontravam a uma temperatura constante no frigorífico, foram realizadas análises nos mesmos *timings* que as amostras conservadas na caixa de esferovite e ainda uma análise às 168h (1 semana).

3.4.1 Parâmetros a avaliar e desenho experimental

Diariamente para cada amostra foram recolhidos os MT, os MP, a VLC, a VSL e a VAP e com estes parâmetros foi possível calcular o valor do SMI que inclui os MP, a VCL e BCF. No total foram realizadas 330 observações das 30 amostras recolhidas.

As motilidades e velocidades obtidas na caixa e no frigorífico após a diluição com o Beyond® nos diferentes tempos (24h, 48h, 72h, 96h e 1 semana), foram comparadas com os valores em fresco (0h).

As motilidades e velocidades obtidas na caixa e no frigorífico com o diluidor Beyond® foram comparadas com as encontradas na bibliografia que utilizaram diversos diluidores caprinos.

As motilidades e velocidades obtidas na caixa e no frigorífico com o diluidor de cavalos às 96h e no frigorífico após 1 semana, foram comparadas com resultados pós congelação pesquisadas em artigos científicos publicados.

3.4.2 Análise Estatística

Os dados das motilidades e velocidades foram testados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk; os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Os grupos foram comparados usando uma ANOVA nas classificações devido à sua distribuição não gaussiana. Quando foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo, foi utilizado o teste post-hoc de Dunn. Holm-Sidak ou método de Dunnett dependendo da origem dos dados. Para as motilidades e velocidades os dados foram comparados com o valor do controlo (0h).

As médias obtidas no estudo foram comparadas com as encontradas na bibliografia mediante o teste T de Student.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *Sigma Plot* versão 12.3. para Windows (Systat Software, Chicago, IL, EUA). As diferenças entre os valores foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ ou $p < 0,001$.

4. Resultados e Discussão

4.1 Resultados

Em relação ao volume e à concentração, foi calculada a média das 30 amostras obtendo valores de 0,8 ml de volume e 6,4 mil milhões por ml de concentração (quadro 1). Sendo que ambos os valores estão dentro dos parâmetros encontrados na bibliografia.

Quadro 1 - Média dos volumes (ml) e concentrações (mil milhões/ml) obtidas das 30 amostras

	Volume (ml)	Concentração (mil milhões/ml)
Média	0,8	6,4

No que respeita à comparação entre os valores dos parâmetros da caixa perante as do frigorífico (quadro 2), os valores médios não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$). No entanto, relativamente ao controlo da amostra realizada em fresco (0h), os restantes valores apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), observando-se uma diminuição gradual na caixa às 24h ($92,67 \pm 1,0$ vs. $86,53 \pm 2,0$; $p < 0,05$), às 48h ($92,67 \pm 1,0$ vs. $82,77 \pm 2,3$; $p < 0,05$), às 72h ($92,67 \pm 1,0$ vs. $79,49 \pm 3,0$; $p < 0,05$) e às 96h ($92,67 \pm 1,0$ vs. $74,22 \pm 3,4$; $p < 0,05$) e no frigorífico às 24h ($92,67 \pm 1,0$ vs. $86,75 \pm 2,0$; $p < 0,05$), às 48h ($92,67 \pm 1,0$ vs. $86,09 \pm 1,7$; $p < 0,05$), às 72h ($92,67 \pm 1,0$ vs. $85,61 \pm 1,8$; $p < 0,05$), às 96h ($92,67 \pm 1,0$ vs. $82,87 \pm 2,4$; $p < 0,05$) e após uma semana ($92,67 \pm 1,0$ vs. $72,14 \pm 3,2$; $p < 0,05$) relativamente ao MT. Foi possível verificar o mesmo acontecimento na caixa às 48h ($63,51 \pm 1,0$ vs. $50,84 \pm 2,4$; $p < 0,05$), às 72h ($63,51 \pm 1,0$ vs. $42,99 \pm 2,5$; $p < 0,05$) e às 96h ($63,51 \pm 1,0$ vs. $32,75 \pm 2,0$; $p < 0,05$) e no frigorífico às 48h ($63,51 \pm 1,0$ vs. $51,32 \pm 1,9$; $p < 0,05$), às 72h ($63,51 \pm 1,0$ vs. $42,80 \pm 2,1$; $p < 0,05$), às 96h ($63,51 \pm 1,0$ vs. $36,27 \pm 2,2$; $p < 0,05$) e após uma semana ($63,51 \pm 1,0$ vs. $15,25 \pm 1,2$; $p < 0,05$) relativamente ao MP. Relativamente às velocidades tendo em conta o controlo da amostra realizada às 0h, observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) com uma diminuição gradual na caixa às 24h ($149,80 \pm 4,0$ vs. $130,61 \pm 3,1$; $p < 0,05$), às 48h ($149,80 \pm 4,0$ vs. $125,63 \pm 2,6$; $p < 0,05$), às 72h ($149,80 \pm 4,0$ vs. $127,1 \pm 2,6$; $p < 0,05$) e às 96h ($149,80 \pm 4,0$ vs. $127,35 \pm 3,0$; $p < 0,05$) e no frigorífico às 24h ($149,80 \pm 4,0$ vs. $132,33 \pm 2,8$; $p < 0,05$), às 48h ($149,80 \pm 4,0$ vs. $126,01 \pm 2,4$; $p < 0,05$), às 72h ($149,80 \pm 4,0$ vs. $128,06 \pm 2,3$; $p < 0,05$), às 92h ($149,80 \pm 4,0$ vs. $130,72 \pm 2,3$; $p < 0,05$) e após 1 semana ($149,80 \pm 4,0$ vs. $142,98 \pm 3,7$; $p < 0,05$) relativamente ao VCL, uma diminuição na caixa às 24h ($111,94 \pm 3,5$ vs. $99,95 \pm 2,2$; $p < 0,05$), às 42h ($111,94 \pm 3,5$ vs. $85,36 \pm$

3,0; $p < 0,05$), às 72h ($111,94 \pm 3,5$ vs. $74,95 \pm 3,0$; $p < 0,05$) e às 96h ($111,94 \pm 3,5$ vs. $61,6 \pm 2,8$; $p < 0,05$) e no frigorífico às 48h ($111,94 \pm 3,5$ vs. $84,07 \pm 2,5$; $p < 0,05$) às 72h ($111,94 \pm 3,5$ vs. $73,02 \pm 2,5$; $p < 0,05$), às 96h ($111,94 \pm 3,5$ vs. $63,90 \pm 2,6$; $p < 0,05$) e após 1 semana ($111,94 \pm 3,5$ vs. $37,12 \pm 1,3$; $p < 0,05$) relativamente ao VSL e uma diminuição na caixa às 48h ($123,76 \pm 5,5$ vs. $102,35 \pm 3,1$; $p < 0,05$), às 72h ($123,76 \pm 5,5$ vs. $96,02 \pm 2,9$; $p < 0,05$) e às 96h ($123,76 \pm 5,5$ vs. $86,36 \pm 3,1$; $p < 0,05$) e no frigorífico às 48h ($123,76 \pm 5,5$ vs. $101,65 \pm 2,7$; $p < 0,05$), às 72h ($123,76 \pm 5,5$ vs. $95,67 \pm 2,8$; $p < 0,05$), às 92h ($123,76 \pm 5,5$ vs. $88,20 \pm 2,3$; $p < 0,05$) e após 1 semana ($123,76 \pm 5,5$ vs. $69,20 \pm 1,3$; $p < 0,05$) em relação ao VAP. Foi realizada a comparação entre grupos (caixa e frigorífico) para todos os parâmetros e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Quadro 2 – Comparação das Médias dos Parâmetros entre as amostras da Caixa e as do Frigorífico

Refrigeração +5°C	Amostra	n	MT (%)	MP (%)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)
0 horas	Controlo	30	92,67 ± 1,0	63,51 ± 1,0	149,80 ± 4,0	111,94 ± 3,5	123,76 ± 5,5
	Frigorífico	30	86,75 ± 2,0*	59,80 ± 1,8	132,33 ± 2,8*	100,44 ± 2,0	114,9 ± 2,7
24 horas	Caixa	30	86,53 ± 2,0*	58,96 ± 1,6	130,61 ± 3,1*	99,95 ± 2,2*	113,96 ± 2,9
	Frigorífico	30	86,09 ± 1,7*	51,32 ± 1,9*	126,01 ± 2,4*	84,07 ± 2,5*	101,65 ± 2,7*
48 horas	Caixa	30	82,77 ± 2,3*	50,84 ± 2,4*	125,63 ± 2,6*	85,36 ± 3,0*	102,35 ± 3,1*
	Frigorífico	30	85,61 ± 1,8*	42,80 ± 2,1*	128,06 ± 2,3*	73,02 ± 2,5*	95,67 ± 2,8*
72 horas	Caixa	30	79,49 ± 3,0*	42,99 ± 2,5*	127,1 ± 2,6*	74,95 ± 3,0*	96,02 ± 2,9*
	Frigorífico	30	82,87 ± 2,4*	36,27 ± 2,2*	130,72 ± 2,3*	63,90 ± 2,6*	88,20 ± 2,3*
96 horas	Caixa	30	74,22 ± 3,4*	32,75 ± 2,0*	127,35 ± 3,0*	61,6 ± 2,8*	86,36 ± 3,1*
	Frigorífico	30	72,14 ± 3,2*	15,25 ± 1,2*	142,98 ± 3,7*	37,12 ± 1,3*	69,20 ± 1,3*

Comparação de motilidades (MT e MP) e velocidades (VCL, VSL e VAP) às 0, 24, 48, 72, 96h e uma semana com controlo (0h) de cada parâmetro. Valores representados como média ± erro padrão da média. *Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Relativamente ao SMI descrito no quadro 3, não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras da caixa e as do frigorífico ($p > 0,05$). Contudo, em comparação com o controlo foi possível observar-se valores com diferenças significativas ($p < 0,05$) a partir das 24h ($1607,79 \pm 79,8$ vs. $1286,18 \pm 51,4$; $p < 0,05$), às 48h ($1607,79 \pm$

79,8 vs. $1133,9 \pm 57,4$; $p < 0,05$), às 72h ($1607,79 \pm 79,8$ vs. $1040,75 \pm 54,5$; $p < 0,05$), às 92h ($1607,79 \pm 79,8$ vs. $903,83 \pm 58,9$; $p < 0,05$) na caixa e às 24h ($1607,79 \pm 79,8$ vs. $1288,77 \pm 44,2$; $p < 0,05$), às 48h ($1607,79 \pm 79,8$ vs. $1127,02 \pm 48,7$; $p < 0,05$), às 72h ($1607,79 \pm 79,8$ vs. $1062,71 \pm 53,1$; $p < 0,05$), às 96h ($1607,79 \pm 79,8$ vs. $973,01 \pm 48,0$; $p < 0,05$) e após 1 semana ($1607,79 \pm 79,8$ vs. $729,95 \pm 38,7$; $p < 0,05$), ocorrendo, novamente uma diminuição gradual em ambas as amostras (caixa e frigorífico) ao longo do tempo.

Quadro 3 - Comparação do SMI entre as amostras da Caixa e as do Frigorífico

Refrigeração +5°	Amostra	n	SMI
0 horas	Controlo	30	$1607,79 \pm 79,8$
	Frigorífico	30	$1288,77 \pm 44,2$
24 horas	Caixa	30	$1286,18 \pm 51,4^*$
	Frigorífico	30	$1127,02 \pm 48,7^*$
48 horas	Caixa	30	$1133,9 \pm 57,4^*$
	Frigorífico	30	$1062,71 \pm 53,1^*$
72 horas	Caixa	30	$1040,75 \pm 54,5^*$
	Frigorífico	30	$973,01 \pm 48,0^*$
96 horas	Caixa	30	$903,83 \pm 58,9^*$
	Frigorífico	30	$729,95 \pm 38,7^*$
1 semana	Frigorífico	30	$729,95 \pm 38,7^*$

Comparação de SMI às 0, 24, 48, 72, 96 h e uma semana com o controlo (0h). Valores representados como média \pm erro padrão da média. *Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Comparativamente à bibliografia existente, (quadro 4), não foram encontradas diferenças significativas perante os MP de Dorado *et al.*, 2007 com a utilização de Triladyl® e Gent® de caprinos utilizados às 0h comparativamente à utilização do Beyond® ($64,38 \pm 1,1$ vs. $63,51 \pm 1,0$ e $69,03 \pm 2,0$ vs. $63,51 \pm 1,0$; $p > 0,05$). Nos MT também não se observaram diferenças significativas perante os diluidores de Triladyl® e Gent® de Dorado *et al.*, 2007 e a utilização de Beyond® às 0h ($91,43 \pm 1,3$ vs. $92,67 \pm 1,0$ e $94,87 \pm 2,4$ vs. $92,67 \pm 1,0$; $p > 0,05$). Porém, observaram-se diferenças significativas comparativamente a Sadeghi *et al.*, 2020 com a utilização de Tris-BSA tanto nos MP ($45,3 \pm 2,3$ vs. $63,51 \pm 1,0$; $p < 0,001$) como nos MT ($67,9 \pm 1,2$ vs. $92,67 \pm 1,0$; $p < 0,001$). Em relação às velocidades foram observadas diferenças significativas na utilização do Beyond® comparativamente ao Triladyl® e Gent® utilizado em Dorado *et al.*, 2007 e o Tris-BSA utilizado em Sadeghi *et al.*, 2020, onde o VCL ($207,08 \pm 10,2$ vs. $149,80 \pm 4,0$

e $225,27 \pm 13,5$ vs. $149,80 \pm 4,0$; $p < 0,001$), o VSL ($85,6 \pm 2,3$ vs. $111,94 \pm 3,5$; $p < 0,05$) e o VAP ($158,55 \pm 3,7$ vs. $123,76 \pm 5,5$ e $168,43 \pm 5,8$ vs. $123,76 \pm 5,5$; $p < 0,001$) mostraram melhores resultados nestas bibliografias do que os que foram obtidos com a utilização do Beyond®.

Quadro 4 - Comparação de motilidades às 0h do Beyond® com duas referências bibliográficas de diluidores de caprinos diferentes

Motilidades	n	0h	Tratamento	Referência
MP (%)	30	63,51 ± 1,0	Beyond®	Própria
	24	45,3 ± 2,3 *	Tris-BSA	(Sadeghi <i>et al.</i> , 2020)
	110	64,38 ± 1,1	Triladyl®	(Dorado <i>et al.</i> , 2007)
	110	69,03 ± 2,0	Gent®	(Dorado <i>et al.</i> , 2007)
MT (%)	30	92,67 ± 1,0	Beyond®	Própria
	24	67,9 ± 1,2 *	Tris-BSA	(Sadeghi <i>et al.</i> , 2020)
	110	91,43 ± 1,3	Triladyl®	(Dorado <i>et al.</i> , 2007)
	110	94,87 ± 2,4	Gent®	(Dorado <i>et al.</i> , 2007)
VCL (µm/s)	30	149,80 ± 4,0	Beyond®	Própria
	24	148,4 ± 1,6	Tris-BSA	(Sadeghi <i>et al.</i> , 2020)
	110	207,08 ± 10,2*	Triladyl®	(Dorado <i>et al.</i> , 2007)
	110	225,27 ± 13,5*	Gent®	(Dorado <i>et al.</i> , 2007)
VSL (µm/s)	30	111,94 ± 3,5	Beyond®	Própria
	24	85,6 ± 2,3*	Tris-BSA	(Sadeghi <i>et al.</i> , 2020)
	110	134,21 ± 2,0	Triladyl®	(Dorado <i>et al.</i> , 2007)
	110	138,88 ± 3,2	Gent®	(Dorado <i>et al.</i> , 2007)
VAP (µm/s)	30	123,76 ± 5,5	Beyond®	Própria
	24	127 ± 1,5	Tris-BSA	(Sadeghi, <i>et al.</i> , 2020)
	110	158,55 ± 3,7*	Triladyl®	(Dorado <i>et al.</i> , 2007)
	110	168,43 ± 5,8*	Gent®	(Dorado <i>et al.</i> , 2007)

Comparação de motilidades (MT e MP) e velocidades (VCL, VSL e VAP) às 0h do Beyond® com bibliografia. Valores representados como média ± erro padrão da média. *Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

Foi ainda realizada uma comparação da utilização do Beyond® às 96h em caixa, às 96h no frigorífico e após uma semana no frigorífico com referências bibliográficas pós congelamento (quadro 5). Mostraram-se diferenças estatisticamente significativas entre a pós congelamento da bibliografia e os valores da caixa a 96h nos MT ($50,5 \pm 2,9$ vs. $74,22 \pm 3,4$; $p < 0,001$) e nos MP ($32,75 \pm 2,0$ vs. $16,0 \pm 2,6$; $p < 0,001$). Diferenças significativas entre a pós congelamento e o frigorífico a 96h nos MT ($63,67 \pm 3,1$ vs. $82,87 \pm 2,4$; $p < 0,001$) e nos MP ($23,80 \pm 4,7$ vs. $36,27 \pm 2,2$; $p < 0,001$). Observou-se ainda que os valores pós

congelamento comparativamente à refrigeração no frigorífico durante uma semana, apresentam diferenças estatisticamente significativas nos MT (50.5 ± 2.9 vs. $72,14 \pm 3,2$; $p < 0.05$) e nos MP (16.0 ± 2.6 vs. $15,25 \pm 1,2$; $p < 0.05$).

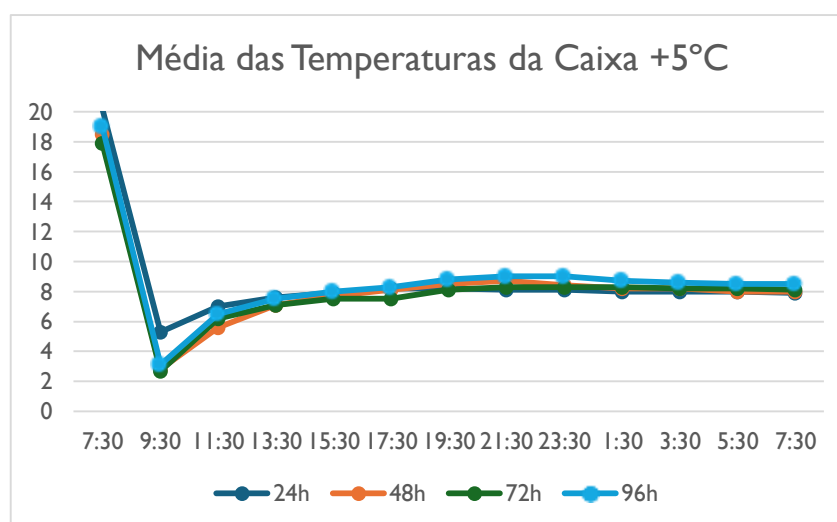
Quadro 5 - Comparação da Utilização do Diluidor Beyond® a 96h na Caixa, a 96h no Frigorífico e a uma Semana no Frigorífico com Referências Bibliográficas

Tratamento	n	MT (%)	MP (%)	Referência
Frigorífico 96h	30	$82,87 \pm 2,4^a$	$36,27 \pm 2,2^a$	Própria
Caixa 96h	30	$74,22 \pm 3,4^{a,b}$	$32,75 \pm 2,0^{a,b}$	Própria
1 semana	30	$72,14 \pm 3,2^{b,c}$	$15,25 \pm 1,2^c$	Própria
Pós congelação	27	$63,67 \pm 3,1^{c,d}$	$23,80 \pm 4,7^{b,d}$	(Silva-Torres <i>et al.</i> , 2015)
	48	50.5 ± 2.9^e	$16.0 \pm 2.6^{c,d}$	(Ohaneja <i>et al.</i> , 2015)
	110	$58,80 \pm 2,4^e$	$39.74 \pm 2,0^a$	(Dorado <i>et al.</i> , 2007)

Comparação de motilidades (MT e MP) às 96h e uma semana da caixa e do frigorífico com os valores pós congelação encontrados na bibliografia. Valores representados como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre grupos ($p < 0,05$; $p < 0,001$).

As avaliações das temperaturas dentro da caixa foram registadas e representadas (figura 2). Pode ser observada uma subida brusca de temperatura quase até aos 20°C devida à abertura da caixa para a avaliação das amostras. Posteriormente, verificou-se uma descida constante após a troca das placas de gelo, atingindo praticamente os 2°C e voltando novamente a subir gradualmente, apesar de nunca ultrapassar os 9°C.

Figura 2 - Gráfico Representativo das Médias das Oscilações Diárias de Temperatura Dentro da Caixa



4.2 Discussão

Um dos principais desafios na IA é garantir que as amostras de sémen mantêm a sua viabilidade desde o momento da recolha até ao momento da inseminação. O transporte dessas amostras, especialmente em condições refrigeradas, é ainda bastante limitado, podendo influenciar significativamente a qualidade do sémen e o sucesso de inseminação, devido a fatores como as oscilações de temperatura e o tempo decorrido durante o transporte (Leboeuf *et al.*, 2000). Diluidores à base de leite desnatado são os mais utilizados na preparação de doses refrigeradas de sémen caprino, embora este possa ser armazenado entre os 2 e os 15°C, é recomendado uma temperatura de 4°C. Contudo, a descida da temperatura corporal para esta temperatura causa mudanças estruturais nas membranas espermáticas, podendo até alterar a sua funcionalidade. Estes danos são evidentes imediatamente após a queda da temperatura e agravam-se quando sofrem descidas bruscas (Palazón *et al.*, 2018).

Para minimizar as alterações provocadas pela descida de temperatura, são utilizados produtos que atuam como estabilizadores de membranas sendo adicionados quando se encontram à mesma temperatura que as amostras, protegendo-as enquanto esta desce lentamente (Palazón *et al.*, 2018). Assim, os diluidores fornecem condições essenciais que mantêm a integridade dos espermatozoides, protegendo-os contra danos celulares, fornecendo um meio nutritivo e um estabilizador de pH. Estas adições são fundamentais durante o transporte, pois os espermatozoides são altamente sensíveis a mudanças no seu ambiente e sem condições adequadas perdem a capacidade de realizarem a sua função (Gibbons *et al.*, 2012).

Atualmente, o sémen caprino é utilizado para IA em fresco ou refrigerado (5°C), nas primeiras 24h, ou após congelação (-196°C). A utilização de Beyond® neste estudo, mostrou resultados positivos relativamente ao prolongamento da longevidade espermática quando comparados com outros diluidores na bibliografia. Num estudo de 2020 por Sadeghi *et al.*, foi comprovado que o armazenamento refrigerado de sémen com diluidor Tris-BSA mantém a maioria dos parâmetros de qualidade espermática ao longo do tempo (Sadeghi *et al.*, 2020), com uma duração relevante até às 48h, sendo que o uso de Beyond® superou os resultados desse estudo até às 96h em sémen refrigerado. Comparativamente a Dorado *et al.*, 2007, o Beyond® obteve piores resultados no que diz respeito às velocidades de sémen refrigerado. Porém às 96h, com a utilização de Beyond®, foi possível comprovar a eficácia deste diluidor quando comparado à

bibliografia pós congelamento, os parâmetros com Beyond® mostraram-se mais elevados do que os estudos de 2015 por Ohaneja *et al.*, com a utilização do diluidor TCG e o estudo de 2007 por Dorado *et al.*, com a utilizador de diluidores Triladyl® e Gent® (Ohaneja *et al.*, 2015 e Dorado *et al.*, 2007).

Os espermatozoides de bovino classificados com um SMI alto têm maior probabilidade de cumprir a sua função e estabelecer a gestação do que os que apresentam um SMI elevado. Isto sugere que o SMI é um indicador confiável de fertilidade, sendo um parâmetro importante na avaliação espermática (Nagata *et al.*, 2018). Não foi possível encontrar bibliografia relativamente aos parâmetros de SMI em chibos. Nos dados recolhidos neste estudo foi possível observar-se uma diminuição gradual do valor de SMI das 0h às 96h. Apesar de não ter sido possível realizar IA com estas amostras, podemos concluir que existe alguma probabilidade de o sémen possuir uma boa qualidade fertilizante às 96h quando diluído com Beyond®, além de possuir uma MP e uma VSL de valores ótimos tendo em conta as horas de refrigeração.

É importante mencionar ainda que, foi imperativo o uso de uma caixa adequada que mantivesse a temperatura constante sem oscilações significativas. As caixas de envio de sémen refrigerado de cavalo foram as mais apropriadas pois levam dois tubos de água congelados, de modo a ocupar mais espaço na caixa para diminuir o vazio, garantindo que a temperatura aumenta mais devagar e se mantém estável até às 48h.

As oscilações observadas (figura 2) após a estabilização da temperatura são influenciadas diretamente pela temperatura do ambiente exterior, sendo que, em dias de mais calor, as placas de gelo perdiam a temperatura mais rapidamente durante as horas mais quentes, voltando a estabilizar apenas durante a noite com a diminuição da temperatura exterior à caixa. A abertura da caixa para a realização da análise das amostras causa uma grande perda de temperatura, o que não acontece durante um transporte de sémen, por isso, foi imprescindível a mudança das placas após a abertura da caixa para que esta voltasse aos valores pretendidos. As caixas utilizadas, asseguram a refrigeração do sémen de cavalo durante o transporte até 48h.

O diluidor Beyond® foi desenvolvido para proporcionar um meio que mantém a integridade das amostras por períodos prolongados em sémen de equino. Neste estudo o diluidor Beyond® foi utilizado em sémen de caprino, e foi possível verificar que as amostras apresentaram uma resistência notável a alterações de temperatura e um resultado

positivo perante o prolongamento das amostras refrigeradas durante o transporte até às 96h. Como o diluidor não foi previamente testado em caprinos, não foi possível comparar com outros estudos bibliográficos.

Uma vez que a análise estatística dos resultados foi comparada com dados de referências bibliográficas disponíveis, a diluição de Beyond® foi eficaz na preservação das motilidades e velocidades das amostras, que sofreram diminuições graduais das 0h às 96h de transporte, e mostrou resultados consideravelmente melhores que outros diluidores utilizados pós congelação.

Desta forma, o uso de Beyond® pode proporcionar uma solução viável para transporte de amostras de sémen de caprino, facilitando as inseminações artificiais com sémen refrigerado, podendo vir a ter um benefício substancial na indústria reprodutiva.

4.2.1 Limitações e pesquisas futuras

Não obstante a relevância do estudo apresentado, existem alguns aspetos que devem ser tidos em conta. Em primeiro lugar, uma limitação deste estudo, reside na reduzida dimensão da amostra, que por sua vez, reduz o poder estatístico dos resultados. Para além disso, ainda em relação às amostras, estas foram recolhidas no CENSYRA com uma limitação nas raças de caprinos (Florida, Verato e Retinto) disponíveis para a recolha de sémen, o que faz com que as generalizações dos resultados para outro tipo de raças sejam incertas.

Em segundo lugar, verificou-se a impossibilidade de utilizar estas amostras refrigeradas com a utilização de Beyond® em inseminações artificiais. Embora tenha sido possível comprovar a longevidade das amostras durante o transporte comparativamente a referências bibliográficas, não foi possível garantir que os resultados sejam positivos após a IA com estas amostras de sémen. Em investigações futuras, seria interessante realizar estudos focados no sucesso da IA, que permitam determinar a taxa de sucesso de amostras refrigeradas com Beyond® em cada uma das etapas deste estudo. Assim, seria possível proporcionar uma compreensão mais profunda dos fatores que influenciam os resultados, permitindo a identificação de possíveis melhorias para aumentar a eficácia das IA utilizando estas amostras, validando a viabilidade do Beyond® e permitindo otimizar as condições para maximizar a sua taxa de sucesso.

É importante mencionar ainda, a escassez de publicações científicas que abordam a utilização do Beyond®, tanto em equinos como em outras espécies na atualidade. Posto, isto, este campo de pesquisa necessita uma investigação mais aprofundada para constatar se realmente existe um impacto substancial deste diluidor na eficiência reprodutiva, comparativamente com outros diluidores disponíveis no mercado.

6. Conclusões

- O diluidor Beyond® para cavalos consegue prolongar a longevidade espermática de sémen caprino refrigerado durante o transporte;
- Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras mantidas na caixa de transporte e as do frigorífico (7°C) para os parâmetros MT, MP, VCL, VSL, VAP e SMI refrigerado às 0h, às 24h, às 48h, às 72h, às 96h e após 1 semana;
- O diluidor de sémen de cavalos Beyond® adicionado ao sémen de chibo, não apresenta diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o sémen refrigerado da bibliografia em fresco;
- O Beyond® apresentou melhores resultados no que respeita à longevidade espermática após 1 semana de armazenamento comparativamente com o sémen pós congelado encontrado na bibliografia.

7. Bibliografía

Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary world*, 14(5), 1220–1233. Doi: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>

Cargaleiro, K.M.S. (2012). Avaliação do potencial reprodutivo de touros através do exame andrológico. URI: <http://hdl.handle.net/10174/9136>

David N., Timothy P., Gary W. (2019) *Veterinary Reproduction & Obstetrics*. Edinburgh: Saunders.

Dorado, J., Rodríguez, I., Hidalgo, M., (2007). Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.048>

Gibbons, A.E., Cueto M.I., Galarraga B., Macarena M., Fernandez J. (2016) *Manual de Obtención, Procesamiento y Conservación del Semen Ovino*. URI: <http://hdl.handle.net/11336/106147>

Gravance C.G., Lewis K.M., Casey P.J. (1995). Computer automated Sperm Head Morphometry Analysis (ASMA) of Goat Spermatozoa. Doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00286-H](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00286-H)

Horst G.V.D. (2020). Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106350>

Khan M.H., Sinha P., Hazarika S.B, Perumal P. (2016). Study on Sperm Motility and Velocity Parameters of Freshly Collected Mithun Semen Through Computer-assisted Sperm Analyser (CASA). Doi: [10.56093/ijans.v8i3.68849](https://doi.org/10.56093/ijans.v8i3.68849)

Lalaguna v.c. (2012) Desarrollo de un Método de Referencia Basado en el Método ISAS y Análisis de Imágenes para la Evaluación Morfométrica del Acrosoma del Espermatozoide en la Especie Ovina. <https://zaguan.unizar.es/record/7200#>

Leão, Ana. (2018). Ensaio da Actividade Reprodutiva e Inseminação Artificial de Cabras da Raça Serrana – Ecótipo Transmontano – em maio Avaliação dos efeitos da dose de eCG, do diluidor e do processo de preservação do semen. URI: <http://hdl.handle.net/10198/17731>

Leboeuf B., Restall B., Salamon S. (2000) Production and Storage of Goat Semen for Artificial Insemination. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00156-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00156-1)

Márcio Infante Vieira. (1986) Criação de Cabras, Técnica Prática Lucrativa. Brasil: Livraria Nobel S. A.

Moula A.B., Amiri B.E. (2021). Factors Influencing Seminal Plasma Composition and its Relevance to Succeed Sperm Technology in Sheep: An Updated Review. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2022.106759>

Nagata MPB, Endo K, Ogata K, Yamanaka K, Egashira J, Katafuchi N, Yamanouchi T, Matsuda H, Goto Y, Sakatani M, Hojo T, Nishizono H, Yotsushima K, Takenouchi N, Hashiyada Y, Yamashita K. Live births from artificial insemination of microfluidic-sorted bovine spermatozoa characterized by trajectories correlated with fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Apr 3;115(14): E3087-E3096. Doi: [10.1073/pnas.1717974115](https://doi.org/10.1073/pnas.1717974115). Epub 2018 Mar 19.

Niswender G.D., Baird D.T., Findlay J.K., Weir B.J. (1987) Reproduction in domestic ruminants. Proceedings of the second international symposium. *Journal of reproduction and fertility supplement*, 34(2), 1-291.

Ohaneje, U.L.; Osuagwuh, U.I.; Alvarez-Rodríguez, M.; Yáñez-Ortiz, I.; Tabarez, A.; Palomo, M.J. The Re-Addition of Seminal Plasma after Thawing Does Not Improve Buck Sperm Quality Parameters. *Animals* 2021, 11, 3452. Doi: <https://doi.org/10.3390/ani11123452>

Palazón S. e Cervera E. (2018). Desarrollo de un protótipo para refrigerar dosis de semen de caprino durante el transporte entre comunidades autónomas: efectos sobre la calidad in vitro y resultados de fertilidade in vivo. URI: <http://hdl.handle.net/10396/19923>

Quittet E. (1978) La Cabra, Guía Práctica Para El Ganadero. Madrid: Mundi-prensa.

Sadeghi, S., Del Gallego, R., García-Colomer, B., Gómez, E. A., Yániz, J. L., Gosálvez, J., López-Fernández, C., & Silvestre, M. A. (2020). Effect of Sperm Concentration and Storage Temperature on Goat Spermatozoa during Liquid Storage. *Biology*, 9(9), 300. Doi: <https://doi.org/10.3390/biology9090300>

Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996 Apr;11(4):837-43. Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019263>.

Silva-Torres, Alberio & Hernández-Corredor, Leonardo. (2015). Motilidad y vitalidad de semen caprino criopreservado en diferentes diluyentes. <https://www.researchgate.net/publication/293779329> Motilidad y vitalidad de semen caprino criopreservado en diferentes diluyentes

Vera, Tomas & Ricarte, Armando. (2009). “Guía Para La Evaluación Del Semen De Caprinos. Aporte De Algunas Metodologías Para La Evaluación De La Calidad Seminal De Reproductores Machos Caprinos”. Cartilla de divulgación. Doi: [10.13140/RG.2.1.2143.9125](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2143.9125).

8. Anexos

Anexo A – Protocolo de utilização de Beyond® em sémen caprino

Pré-recolha

Levar tubos 15ml, tubos para citrato, 15ml de INRA 96®.

Recolha de sémen na segunda-feira.

Laboratório pós recolha

1. Observação de Motilidade massal (score de 1-5).
2. Medição da concentração com citrato de sódio.
10ml de citrato para cada amostra nos tubos, sendo a primeira para calibrar a máquina (parâmetros: 540nm 100.0% T).
3. Cálculos para a concentração, nº total de espermatozoides e o nº de doses.
4. Adição de diluidor (INRA 96®) ao sémen nos tubos de 15ml, em diluição 1:1.

Laboratório pós diluição INRA 96®

1. Centrifugar a 1727 rpm/15min.
2. Retirar o sobrenadante na camara de fluxo laminar, adicionar a quantidade de Beyond® necessária.
3. Fazer regra 3 simples a 80% para saber a concentração das *pellets* e quanto é necessário de diluidor para ficar com $200 \cdot 10^6 / 0,25$.

3ml-----100% X= Volume de amostra depois de centrifugação

Xml----- 80%

Concentração x Volume pós centrifugação = Nº total de espermatozoides

Nº total de espermatozoides/200 = Nº total de doses

Nº doses x 0,25 = Volume total

Volume Total – Volume pós centrifugação = Volume de diluidor Beyond® a adicionar

4. Agitar a amostra e dividir em 2 *ependorfs* bem identificados, um vai para a caixa durante 96h e o outro fica no frigorifico durante 1 semana.

5. Contas para passar a diluição de 200.10^6 para 50.10^6 , estas vão ser fixas, pelo que num *eppendorf* para observação terá 60µl de amostra e 940µl de diluidor INRA 96®.
6. Colocar duas gotas de 5µl numa lamina com lamelas à mesma temperatura e observar ao microscópio, capturando campos entre 50 a 100 espermatozoides para obter um total de aproximadamente 200 espermatozoides.
7. Verificar se ISAS® capturou todos os estáticos de cada campo, eliminando os detritos e gravar com os dados do animal e a data (ex: xxxx 04 – 03 – 24)
8. Fazer uma observação da amostra inicial, uma às 24h, uma às 48h, uma às 72h, uma às 96h e uma às 168h (1 semana para a do frigorifico) para verificar se o uso de diluente de cavalo nos chibos prolonga a sua longevidade durante o transporte.