

**Estudo comparativo da qualidade de sémen
criopreservado, obtido de epidídimo de cavalos
sujeitos a prévia castração química**

**-Técnicas Inovadoras de Avaliação da Viabilidade
Espermática**

Jéssica Laura Cipriano Fernandes

Relatório de Estágio Profissionalizante para obtenção do Grau
de
Mestre em Engenharia Agropecuária

Júri:

Presidente: Prof. José Manuel Serras de Oliveira Tavares

Arguente: Prof. Rosário Plácido Roberto da Costa

Orientador: Doutor Pedro Nuno D'Almeida Monteiro Pinto Bravo

Coimbra, 2021

**Estudo comparativo da qualidade de sémen
criopreservado, obtido de epidídimo de cavalos
sujeitos a prévia castração química**

**-Técnicas Inovadoras de Avaliação da Viabilidade
Espermática**

Jéssica Laura Cipriano Fernandes

Relatório de Estágio Profissionalizante para obtenção do Grau
de
Mestre em Engenharia Agropecuária

Júri:

Presidente: Prof. José Manuel Serras de Oliveira Tavares

Arguente: Prof. Rosário Plácido Roberto da Costa

Orientador: Doutor Pedro Nuno D'Almeida Monteiro Pinto Bravo

Coimbra, 2021

*“Thoughts become things. If you can see
it in your mind... you can hold it in your hand.”*

*- **Bob Proctor***

Agradecimentos

O ano de 2021 revelou-se um ano fugaz, com bastantes obstáculos que me pareceram impossíveis de contornar, mas com a ajuda da minha família, pais, avós e Julieta, tudo se tornou possível. Por isso, este trabalho é dedicado a vocês, que serão sempre o meu apoio incondicional e aqueles que mais acreditam em mim. Sem vocês não sou nada.

Este trabalho desafiou-me a diversos níveis, principalmente a trabalhar em ambientes fora da minha zona de conforto, a exigir mais de mim e a aprender todo um outro mundo... o mundo laboratorial.

Tenho um agradecimento do tamanho do mundo para o professor Dr. Pedro Pinto Bravo por ser um “*role model*” de excelência, um docente que se preocupa genuinamente com os seus alunos, que para além de professor, é amigo. Sempre confiou nas minhas capacidades e sempre acreditou no meu potencial, mesmo com o seu tempo reduzido, conseguia ajudar-me sempre. Deu-me imensa força, nos dias em que eu própria duvidava de mim. Desde o início em que mostrei interesse em estagiar na área de reprodução o professor retribuiu esse interesse em ajudar-me a encontrar o melhor tema possível.

Um agradecimento especial ao Senhor Diogo Cadima, porque sem ele não seria possível embarcar nesta aventura da viabilidade celular. Obrigada por nos deixar estudar os seus ganhões Puro Sangue Lusitano.

Não poderia deixar de agradecer a minha amiga e colega de casa Marina, que é como uma irmã mais nova para mim, por todo o seu apoio e companhia, por todos os almoços que me fez porque estava em estágio e por me deixar comida na mesa quando chegava às 23h da noite a casa depois de uma tarde inteira no laboratório.

Por fim, quero deixar um agradecimento do fundo do meu coração ao meu grupo de amigos, que sempre se mostraram interessados em saber como estava a correr, se me encontrava bem e que estavam sempre prontos a ouvir os meus desabafos.

Resumo

Este trabalho divide-se em dois pontos importantes: implementação e validação de técnicas inovadoras para avaliação da viabilidade espermática.

Congelar sémen epididimal consiste num método eficaz e prático para preservar material genético. O epidídimo, sendo um reservatório de sémen, abre uma possibilidade de aplicações práticas.

A comercialização de sémen refrigerado tem vindo a aumentar de forma significativa, portanto, todos os aspetos relacionados com esta, nomeadamente novas formas de avaliar a viabilidade celular de sémen refrigerado, são de extremo interesse científico. O *PrestoBlue* é considerado um reagente de ação rápida e foi o reagente escolhido para este ensaio.

Em termos de viabilidade foram testados seis Puros Sangue Lusitanos de idades distintas e apenas dois *Warmblood*, procedendo à recolha de sémen com vagina artificial e posterior avaliação.

O sémen obtido da cauda do epidídimo após a orquiectomia física, submetido à congelação, apresentou características de motilidade semelhante ao sémen obtido por recolha de sémen. O sémen congelado após tratamento de castração química, apresentou características de motilidade semelhantes ao sémen de garanhões que não sofreram castração química, apesar de se terem verificado alterações físicas resultantes do mesmo. O *PrestoBlue* apresenta-se como um reagente fiável para futuros estudos de viabilidade espermática em condições de refrigeração.

Palavras-chave: Garanhão, castração, sémen, epididimário, viabilidade, *Prestoblue*.

Abstract

This work was divided in two important points: implementation and validation of innovative techniques for evaluating sperm viability.

Freezing epididymal semen is an effective and practical method to preserve genetic material. The epididymis, being a reservoir of semen, opens up a possibility of practical applications.

The commercialization of refrigerated semen has been increasing significantly, therefore, all aspects related to it, namely new ways to assess the cell viability of refrigerated semen, are of extreme scientific interest. PrestoBlue is considered a fast-acting reagent and was the reagent of choice for this assay.

In terms of viability, six *Puro Sangue Lusitano* of different ages and two Warmbloods were tested, proceeding to the collection of semen with an artificial vagina and subsequent evaluation.

The semen obtained from the tail of the epididymis after physical orchiectomy, submitted to freezing, showed similar motility characteristics to the semen obtained by semen collection (e.g. mobility $\geq 35\%$). The frozen semen after chemical castration treatment presented motility characteristics similar to the semen of stallions that did not undergo chemical castration, despite the physical alterations resulting from it. PrestoBlue presents itself as a reliable reagent for future sperm viability studies under refrigerated conditions.

Key words: Stallion, orchiectomy, semen, epididymal, viability, Prestoblue.

Índice

| | |
|---|------------|
| Agradecimentos | ii |
| Resumo | iii |
| Abstract | iv |
| Índice | v |
| Índice de Figuras | vii |
| Índice de Tabelas | ix |
| Lista de Abreviaturas | ix |
| 1. Introdução | 10 |
| 2. Revisão Bibliográfica | 12 |
| 2.1. <i>Anatomia e Fisiologia</i> | 12 |
| 2.1.1. Égua | 12 |
| 2.1.2. Garanhão | 13 |
| 2.1.3. Testículo..... | 15 |
| 2.1.4. Epidídimo | 15 |
| 2.2. <i>Castração Equina</i> | 16 |
| 2.3. <i>Biotecnologia do sémen equino</i> | 17 |
| 2.3.1. Sémen Refrigerado | 18 |
| 2.3.2. Sémen Criopreservado | 19 |
| 2.4. <i>Sémen Epididimário</i> | 22 |
| 2.4.1. Criopreservação de sémen Epidimário | 23 |
| 2.5. <i>Parâmetros a avaliar na qualidade dos espermatozoides</i> | 24 |
| 2.5.1. Motilidade | 25 |
| 2.5.2. Concentração..... | 26 |
| 2.5.3. Vitalidade..... | 27 |
| 2.5.4. Morfologia | 28 |
| 2.6. <i>Avaliação da Morfologia do esperma de garanhão</i> | 29 |
| 2.6.1. Patogénese dos defeitos do esperma | 29 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.6.2. | Influência da Raça e da Idade na qualidade do sémen..... | 32 |
| 2.7. | <i>PrestoBlue</i> | 33 |
| 3. | Material e Métodos | 36 |
| 3.1. | <i>Colheita de sémen</i> | 36 |
| 3.2. | <i>Castração</i> | 38 |
| 3.2.1. | Física | 38 |
| 3.2.2. | Química..... | 39 |
| 3.3. | <i>Recolha do sémen no Epidídimo</i> | 40 |
| 3.3.1. | Método de Flotação | 40 |
| 3.3.2. | Técnica do fluxo retrógrado | 42 |
| 3.4. | <i>Congelação sémen</i> | 43 |
| 3.5. | <i>Protocolo da Equigerminal</i> | 44 |
| 3.6. | <i>Análise Estatística</i> | 51 |
| 3.7. | <i>Trabalho Experimental</i> | 51 |
| 4. | Resultados e Discussão | 53 |
| 4.1. | <i>Congelação de sémen epididimário de garanhões sujeitos a orquiectomia física ...</i> 53 | |
| 4.2. | <i>Avaliação da qualidade do sémen epididimário obtido de garanhões previamente submetidos a castração química</i> | 54 |
| 4.3. | <i>Avaliar a técnica do PrestoBlue, como técnica fiável para avaliar a viabilidade celular do sémen equino em condições de refrigeração</i> | 55 |
| 5. | Conclusão | 66 |
| 6. | Referências Bibliográficas | 67 |
| 7. | Anexos..... | 73 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1- Gráfico resumo das hormonas do garanhão. | 14 |
| Figura 2-Diferentes regiões anatómicas do epidídimo e ducto deferente.... | 16 |
| Figura 3-Modificações na organização do mosaico fluido da membrana lipídica, quando acontece arrefecimento rápido..... | 18 |
| Figura 4-Breve resumo de um protocolo manual da congelação de sémen. 20 | |
| Figura 5-Canais não congelados, demonstrando a formação de gelo..... | 21 |
| Figura 6-Quadro resumo dos parâmetros macroscópicos imediatos..... | 24 |
| Figura 7-Avaliação da motilidade espermática..... | 25 |
| Figura 8-Câmara de Neubauer..... | 26 |
| Figura 9-Dois desenhos da malha..... | 27 |
| Figura 10-Recipientes Spermac e tina de lâminas Coplin. | 28 |
| Figura 11-- Quadro resumo das fases da espermatogénese | 30 |
| Figura 12-Reação química. | 34 |
| Figura 13- Diferença da coloração entre a primeira hora com a segunda hora | 35 |
| | |
| Figura 14-- Vagina artificial utilizada na recolha. | 36 |
| Figura 15-Recolha de sémen. | 37 |
| Figura 16-Quadro resumo das técnicas de orquiectomia | 38 |
| Figura 17-Método de flotação..... | 41 |
| Figura 18-Técnica do fluxo retrógrado..... | 42 |
| Figura 19-Quadro com informações das recolhas e hora de plaqueamento. | 45 |
| | |
| Figura 20- Esquema do meio completo utilizado e cálculos utilizados. | 46 |
| Figura 21- Eppendorf Centrifuge 5810 R..... | 47 |
| Figura 22- Câmara de Fluxo..... | 47 |
| Figura 23- Preparação da câmara de Neubauer..... | 48 |
| Figura 24- Microscópio digital. | 49 |
| Figura 25- Esquema utilizado na microplaca. | 50 |
| Figura 26- Cálculo da normalização dos valores | 51 |
| Figura 27- Viabilidade Celular após 1 hora de incubação..... | 58 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 28-Viabilidade Celular após 2 horas de incubação | 60 |
| Figura 29- Viabilidade Celular após 3 horas de incubação | 61 |
| Figura 30-Layout com as tabelas de cada concentração, para as três horas de observação. | 63 |
| Figura 31-Diferenças obtidas em cada concentração, nas 3 horas de observação. | 64 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Concentração de espermatozoides. | 56 |
| Tabela 2- Resultados obtidos após normalização dos valores por concentração na hora 1 | 57 |
| Tabela 3- Sumário ANOVA 1ª Hora..... | 58 |
| Tabela 4- Resultados obtidos após normalização dos valores por concentração na hora 2 | 59 |
| Tabela 5- Sumário ANOVA 2aHora | 59 |
| Tabela 6- Resultados obtidos após normalização dos valores por concentração na hora 3 | 60 |
| Tabela 7- Sumário ANOVA 3ª Hora..... | 61 |

Lista de Abreviaturas

FSH- Hormona Folículo-Estimulante

GnRH- Hormona Libertadora de Gonadotrofinas

IA- Inseminação Artificial

LH- Hormona Luteinizante

OD- Densidade Ótica

SPZ- Espermatozoides

1. Introdução



A reprodução nos equinos tem uma enorme intervenção médico-veterinária em Portugal e no mundo. A base para um bom acompanhamento reprodutivo é o conhecimento da anatomia e fisiologia animal, indispensável para uma avaliação objetiva e eficaz para cada caso em concreto. Esta espécie apresenta sazonalidade reprodutiva, associada a dias de maior fotoperíodo. Durante as estações mais quentes verifica-se um aumento no tamanho e peso testicular, aumento na produção de espermatozoides, produção de fração gelatinosa das glândulas vesiculares, líbido e concentração plasmática de diversas hormonas (Bettencourt et al, 2018). Deve-se ao facto de existirem alterações na secreção da hormona luteinizante (LH) e da hormona folículo-estimulante (FSH) e também alterações no comportamento sexual. Este fotoperíodo é mediado pela melatonina, que é produzida durante a noite e, como tal, diminui nas fases de fotoperíodo crescente, levando a um período de maior atividade reprodutiva (Bettencourt et al, 2018). A prolactina também influencia a atividade reprodutiva, pois é produzida pela pituitária, que está associada ao aumento da exposição à luz (Bettencourt et al, 2018).

O Puro Sangue Lusitano, montado há 5 mil anos, é o cavalo de sela mais antigo do mundo e também o mais procurado lá fora: cerca de 80% dos Puro Sangue Lusitano criados em Portugal são exportados para Espanha, Europa do Norte, América Latina e Ásia. Os restantes 20% ficam em Portugal (Rodrigues, 2018).

A congelação de sémen epididimal consiste num método eficaz e bastante prático para preservar o material genético de um garanhão. De acordo com alguns relatos (Morris, 2002; Monteiro et al., 2011), confirmam-se gestações e/ou nascimentos resultantes de Inseminação Artificial (IA) com a utilização de sémen epididimal, o que comprova a sua capacidade fertilizante.

O epidídimo e os vasos deferentes armazenam um importante número de espermatozoides férteis. Este reservatório de sémen abre uma vasta possibilidade para aplicações na prática, como por exemplo, quando é necessária a castração de um garanhão e/ou quando por motivos imprevisíveis, um garanhão tenha que ser eutanasiado subitamente. Graças a esta técnica, ainda que de forma limitada, é possível recuperar algum potencial genético do garanhão (Roels et al. 2013).

A utilização e comercialização de sémen refrigerado, em várias espécies zootécnicas e nomeadamente nos equinos, tem sofrido um enorme aumento e expansão nas últimas duas décadas. Neste sentido, todos os aspetos relacionados com esta técnica, desde novos diluidores, novas formas de expedição do sémen e novas formas de avaliar a viabilidade celular do sémen refrigerado, assumem-se como temas que em toda a comunidade científica e indústria equina, merecem uma atenção especial.

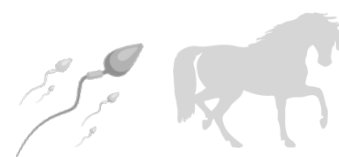
No dia-a-dia dos centros de reprodução equina, dispersos particularmente pelos continentes americano e europeu, a viabilidade celular do sémen é aferida e avocada de acordo com um valor médio da mobilidade dos espermatozoides, entre a mobilidade massal e a mobilidade individual. Por toda a academia e veterinários de campo, são identificados motivos de insuficiente acuidade deste parâmetro, e repetidamente são identificados casos de ganhões com “boa mobilidade”, mas fracas taxas de fertilidade e por outro lado, ganhões com má mobilidade de sémen, mas boas taxas de fertilidade.

Como tal, torna-se importante implementar e validar técnicas inovadoras para a avaliação da viabilidade celular em condições de refrigeração, neste caso de espermatozoides. O *PrestoBlue* é um reagente utilizado para a determinação da viabilidade celular *in vitro*, utilizado noutros tecidos (Boncler et al, 2014, Xu et al, 2015, Lall et al, 2013, Nowak et al 2020).

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Desenvolver conhecimentos e aperfeiçoar a técnica de conservação de sémen epididimário de ganhão sujeito a orquiectomia física;
2. Avaliar a qualidade do sémen epididimário obtido de ganhões previamente submetidos a castração química;
3. Avaliar a técnica do *PrestoBlue*, como técnica fiável para avaliar a viabilidade celular do sémen equino em condições de refrigeração.

2. Revisão Bibliográfica



2.1. Anatomia e Fisiologia

2.1.1. Égua

O cavalo é um animal poliéstrico sazonal e a sua ciclicidade sexual (época reprodutiva) manifesta-se em determinada altura do ano. No hemisfério norte acontece durante a primavera e verão. Esta sazonalidade é controlada pelo fotoperíodo. Contudo, podem existir exceções e algumas éguas podem manter a sua época reprodutiva ao longo do ano, particularmente em Portugal, que não se encontra muito afastado da linha equatorial e especialmente se submetidas a uma fonte de iluminação artificial, como é o caso dos animais estabulados (Equitação Magazine, 2017). Dado que é uma gestação longa, cerca de 11 meses, os poldros irão evitar o frio do inverno e encontrar assim melhores condições ambientais para o seu desenvolvimento nos primeiros tempos de vida (Silva, 2009).

Na égua, a reprodução constitui um processo complexo em que todo o organismo desempenha um papel fundamental. O aparelho reprodutor é responsável pelo ciclo éstrico, comportamento sexual da égua e controlo da gestação, do nascimento e da lactação (Silva, 2009).

O aparelho reprodutor compreende os ovários, as trompas de Falópio, o útero, a vagina e a vulva. O ovário expulsa o óvulo para as trompas de Falópio, que depois é levado até ao corno uterino, onde ocorre a fecundação. No útero, o óvulo fecundado transforma-se em embrião e, posteriormente, em feto (Silva, 2009).

A égua atinge a puberdade entre os 10 e os 24 meses, ou seja, é o período em que os órgãos reprodutivos se tornam funcionais (Silva, 2009).

O **Ciclo éstrico** é o período compreendido entre a ovulação de um folículo maduro até à ovulação do folículo maduro seguinte. O ciclo éstrico da égua dura, de forma geral, 21 a 22 dias (podendo variar entre os 18 e os 24 dias), compreendendo as seguintes fases:

- **Proestro:** Período de preparação durante o qual os folículos aumentam de tamanho, as paredes vaginais tornam-se mais espessas e o útero aumenta as suas secreções mucosas.
- **Estro:** Período de **cio** e de receptividade da fêmea para com o macho, que dura em média 5 dias, mas tem grandes variações individuais. A ovulação dá-se 24 a 48 horas antes do final do estro.
- **Metaestro:** Formação do corpo lúteo.
- **Diestro:** De aproximadamente 14 dias e corresponde ao período de atividade lútea antes do próximo estro. (Silva, 2009)

2.1.2. Garanhão

O garanhão (cavalo macho não castrado), apesar das suas características sexuais variarem ao longo do ano, nunca deixa de produzir espermatozoides e não perde a sua capacidade de ejacular durante todo o ano. Este animal deve produzir sémen de qualidade, livre de agentes infecciosos para o trato reprodutivo da égua, daí o recurso à Inseminação Artificial (IA) para diminuir contágio de doenças sexualmente transmissíveis, no sentido de poder fertilizar um número considerável de fêmeas por época de reprodução (Sepulveda & Pequito, 2017).

Considera-se “bom garanhão” aquele capaz de engravidar mais de 75% das éguas (por cobrição natural ou IA) numa determinada época reprodutiva. Normalmente os garanhões devem-se encontrar separados das éguas, pois podem adotar comportamentos agressivos durante a época de reprodução (Sepulveda & Pequito, 2017).

A função reprodutiva do macho é produzir espermatozoides para posteriormente depositar no interior da fêmea. Os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos e transportados através da *rete testis* para o epidídimo, onde são armazenados para amadurecerem (Aidar, 2013).

A fisiologia reprodutiva do garanhão é bastante complexa e inclui diversas estruturas: o hipotálamo, hipófise, glândula pineal, órgão de Jacobson e testículos. No hipotálamo acontece o primeiro estímulo hormonal no ciclo reprodutivo do garanhão. É através deste que ocorre a libertação da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), que age na hipófise anterior, regulando a produção e libertação da hormona gonadotrofina, da hormona luteinizante (LH) e a hormona folículo-estimulante (FSH), que irão atuar nas células dos testículos regularizando a espermatogênese (Aidar, 2013).

A **FSH** atua sobre as células de Sertoli e regula a produção de proteína ligadora de andrógenos, estrogénios, fatores de crescimento, inibina e ativina. Estes são componentes importantes para a produção de espermatozoides. A inibina e ativina relacionam-se com o processo de feedback do FSH, regulação do fluido seminífero tubular, manutenção da barreira hematotesticular e do desenvolvimento das células germinativas essenciais para a espermatogênese (Aidar, 2013).

A **LH** atua sobre as células de Leydig dos testículos, promovendo o estímulo para a produção de hormonas esteroides, como a testosterona, a diidrotestosterona e estrogénios, que regulam a espermatogênese, as glândulas acessórias e a manutenção da libido sexual (figura 1).

A espermatogênese é todo o processo envolvente à transformação das células do epitélio germinativo. Ocorrem mitoses e meioses durante o processo de forma progressiva (Aidar, 2013)

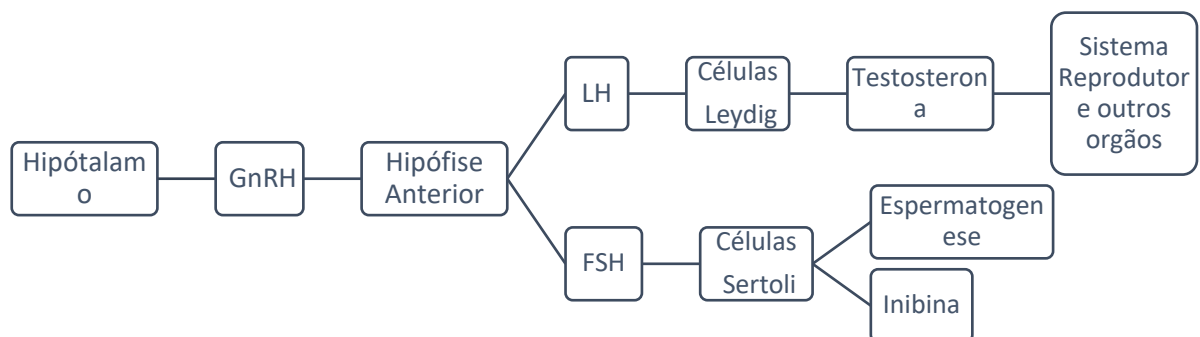


Figura 1- Gráfico resumo das hormonas do macho. Fonte: própria, 2020

2.1.3. Testículo

O **testículo**, gónada masculino, que tem como função a produção de gâmetas, o espermatozoide (função exócrina) e produção de testosterona (função endócrina), apresenta uma forma ovalada, ligeiramente achatado na lateral e o seu eixo mais longo é o horizontal. Como medida padrão, variam entre 80-140 mm de comprimento e 50-80 mm de largura, estas medidas podem ser influenciadas pela idade do animal e também pela época do ano (Bettencourt et al, 2018).

O testículo é dividido por septos concêntricos que vão formar numerosos lóbulos. Ao centro, os septos reúnem-se para formar o mediastino do testículo. Em cada lóbulo testicular existem cerca de 2-4 tubos (seminíferos) bastante enovelados que podem atingir alguns metros de comprimento (1-3m). Os tubos seminíferos terminam-se nos canalículos retos. Estes, por processo de anastomose, dando origem aos ductos eferentes. Estes, convergem e formam o epidídimo. A partir deste momento, as vias espermáticas já se encontram fora do testículo (Bettencourt et al, 2018).

2.1.4. Epidídimo

No **epidídimo** (figura 2) existem 13 a 15 ductos eferentes que se fundem na cabeça do epidídimo, dando origem a um único ducto, o epididimal, que atravessa a cabeça, corpo e cauda (Roels et al. 2013).

À medida que os espermatozoides passam pelo epidídimo, eles amadurecem e ganham a capacidade de fertilização ao entrar na cauda do epidídimo (Roels et al.2013).

O epitélio do epidídimo possui capacidades absortivas e secretoras que promovem alterações nas células espermáticas, que irá resultar na sua maturação, durante o trânsito das células espermáticas pelo epidídimo (Bergstein- Galan et al, 2018).

Os espermatozoides extragonodais que se encontram em reserva, localizam-se na cauda do epidídimo, bem como no ducto deferente, que contem 62% e 7% das reservas totais de espermatozoides, respetivamente (Roels et al.2013).

As condições existentes e específicas da região da cauda mantêm os espermatozoides maduros e num estado calmo. Durante a ejaculação, há uma mistura com o plasma seminal, ou seja, a atividade metabólica dos espermatozoides aumenta levando

assim a uma redução da sua expectativa de vida. Pode existir um total de 15 a 25 bilhões de espermatozoides a ser recolhidos por par de epidídimos (Roels et al.2013).

Existe uma pequena diferença a nível de motilidade total e progressiva, que são semelhantes ou por vezes ligeiramente mais altas no sémen ejaculado fresco do que no sémen epididimal fresco. Já a nível da motilidade progressiva esta pode ser claramente diminuída/ausente no sémen epididimal (Roels et al. 2013).

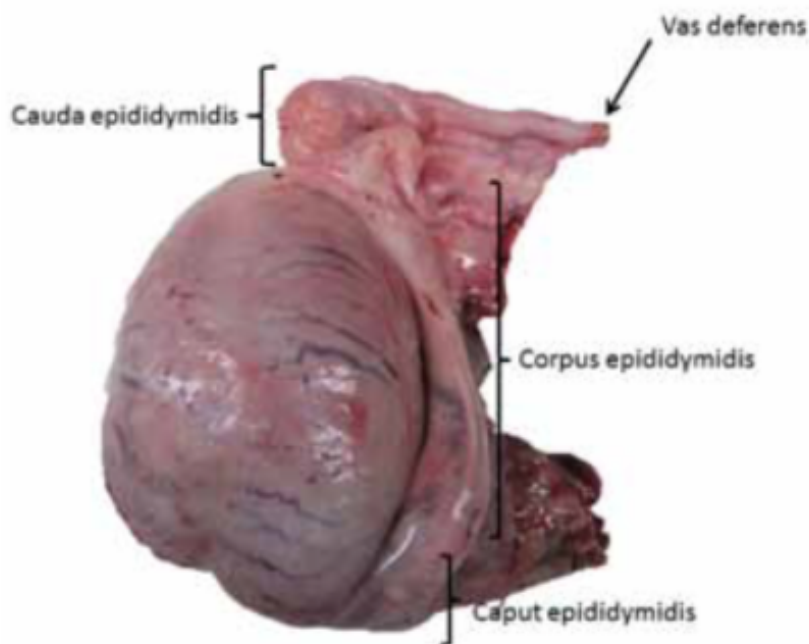


Figura 2-Diferentes regiões anatómicas do epidídimo e ducto deferente (Roels et al. 2013).

2.2. Castração Equina

Esta prática, para além de ser utilizada para obter um controlo nos comportamentos tendencialmente agressivos do garanhão, pode também ser utilizada para esterilizar animais com valor genético inferior. Ao suprimir a secreção de hormonas, o animal irá acalmar naturalmente e evitar montas indesejáveis (Felicio et al, 2017).

Animais inteiros podem manifestar comportamentos mais perigosos, especialmente para com pessoas com menos experiência em manejo equino, principalmente em animais com problemas comportamentais (Felicio et al, 2017).

Por isso, a orquiectomia consiste num dos procedimentos cirúrgicos mais comumente praticados em equinos. Apesar de se tratar de um procedimento simples e de rotina, o potencial para complicações é elevado (Felicio et al, 2017).

A intervenção deve ser realizada por médicos veterinários habilitados e por isso, são realizadas diversas técnicas cirúrgicas e anestésicas com a finalidade de minimizar as complicações pós-operatórias e os custos com o procedimento, principalmente quando é realizado em animais com baixo potencial genético e conseqüentemente menor valor comercial (Felicio et al, 2017).

As várias complicações que podemos encontrar neste procedimento, vão desde hemorragias, edemas escrotais, infecção nas incisões, peritonite, trauma peniano, etc (Felicio et al, 2017).

Esta cirurgia pode e deve ser utilizada como fim terapêutico em casos de animais que apresentem hérnias testiculares, hidrocelo, varicocele, tumores testiculares, torção do funículo espermático e orquites (Felicio et al, 2017).

A castração pode ser realizada numa clínica veterinária ou nas instalações do proprietário, consoante preferência e disponibilidade. A primeira hipótese é tendencialmente preferível, pois caso ocorra uma complicação do procedimento, existe uma maior facilidade em agir. Mas também acarreta alguns inconvenientes, principalmente os encargos financeiros acrescidos e o stress causado ao animal devido ao transporte do mesmo e à alteração temporária do meio ao qual está habituado (Felicio et al, 2017).

2.3. Biotecnologia do sémen equino

Todos os métodos adotados na indústria equina têm como objetivo reduzir os custos de produção e seleção de animais reprodutores com genética superior, pois a produtividade é essencial para obter resultados económicos positivos. São de extrema importância as biotecnologias do sémen para se conseguir maximizar o uso de garanhões, prevenir a propagação de doenças, diminuir barreiras geográficas e aumentar sobretudo a longevidade do sémen (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

2.3.1. Sémen Refrigerado

Um dos principais objetivos da refrigeração de espermatozoides é diminuir o metabolismo celular, que conseqüentemente vai diminuir a formação de produtos tóxicos originários do catabolismo, diminuindo assim os danos causados às células. Quando existe uma diminuição da temperatura em 10°C acontece uma quebra de 50% no metabolismo celular. Espermatozoides mantidos a 5°C apresentam 10% do metabolismo inicial (38°C), após a ejaculação. Quando há redução do metabolismo há um aumento da longevidade dos espermatozoides, conseguindo taxas de concepção semelhantes às do sémen fresco (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Enquanto que a diminuição da temperatura aumenta a longevidade do sémen, uma queda repentina na temperatura pode levar a mudanças na estabilidade da membrana plasmática do sémen (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Numa primeira fase, o sémen que se encontra a 37°C passa para a temperatura ambiente, o que não se trata de uma diminuição muito crítica. Porém, se a amostra se encontrar a uma temperatura menor que 20,7°C, os lípidos da membrana do espermatozoide mudam do estado líquido-cristalino para um gel, que irão dar resultado a cadeias de ácidos gordos.

Esses danos são conhecidos como “choque frio” (figura 3) e podem ser identificados quando existe uma observação de um padrão anormal de movimento, diminuição da motilidade espermática, dano na membrana e perda de componentes intracelulares. É importante ter em atenção às curvas de refrigeração específicas para evitar danos irreversíveis à célula (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

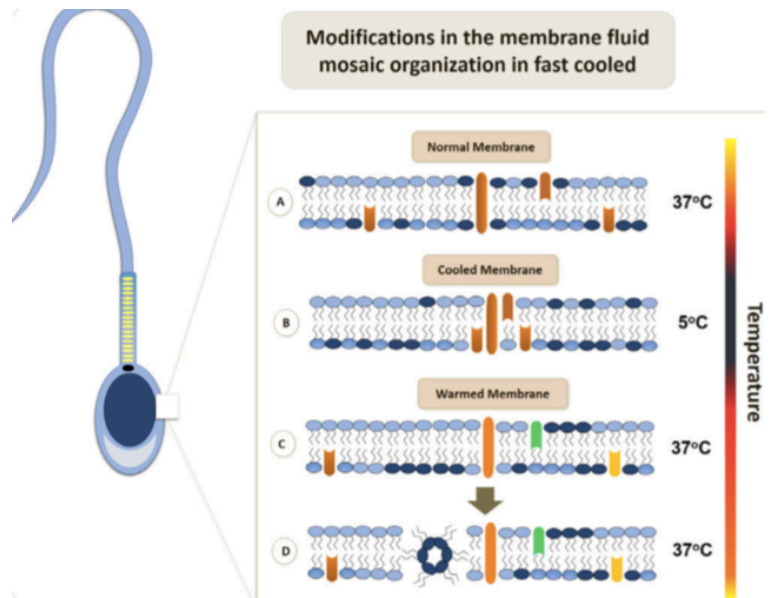


Figura 3-Modificações na organização do mosaico fluido da membrana lipídica, quando acontece arrefecimento rápido (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Como afirma Bruemmer (2006), o transporte deve ser feito através de dispositivos de refrigeração passivo devidamente projetado para o envio de sémen refrigerado e encaminhados para o laboratório responsável e apropriado para a sua análise.

Os sistemas passivos utilizam expansores que contêm lípidos, colesterol e lipoproteínas para minimizar possíveis danos celulares. Diversos extensores têm sido desenvolvidos de forma a maximizar a longevidade do sémen, protegendo os espermatozoides e prolongar a sua sobrevivência, a temperaturas de 4°C e 8°C e são baseados em leite desnatados e glicose (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

2.3.2. Sémen Criopreservado

A criopreservação de sémen consiste em armazenar o sémen a – 196°C (em azoto líquido) para estagnar o metabolismo espermático, aumentando assim a longevidade celular (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Esta técnica apresenta diversas vantagens, pois otimiza o uso do garanhão, resultando num maior número de descendentes com alto valor genético. Permite a preservação do material genético por tempo ilimitado, reduz custos e os riscos envolvidos no transporte animal, diminuição da propagação de doenças, elimina barreiras geográficas e permite o uso de garanhões incapacitados (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Na espécie equina, esta técnica tem sido limitada pela diminuição da capacidade de fertilização do sémen após o descongelamento em alguns garanhões, ou seja, é necessário a monitorização do ciclo éstrico da égua (Monteiro & Sancler-Silve, 2018).

Podem também existir alguns fatores individuais e raciais relativamente à resistência dos espermatozoides à congelação, ou seja, a biotecnologia do sémen torna-se bastante variável entre garanhões. Estes podem ser considerados como “mau freezer” (mau congelador) ou “bom freezer” (bom congelador), de acordo com as características de motilidade espermática após descongelação (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Um **mau freezer** apresenta uma mobilidade progressiva após o descongelamento menor ou igual a 35% em três ou mais ejaculados, numa amostra de dez ejaculados.

Um **bom freezer** apresenta uma mobilidade progressiva após o descongelamento maior que 35%, ou seja, são resistentes à criopreservação.

Para além das diferenças individuais de cada garanhão, existem muitos outros fatores que podem afetar o sucesso da IA, como por exemplo, o processamento, o diluidor utilizado, o sistema de armazenamento, o protocolo de descongelação e o tempo de inseminação (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Para contrariar esses fatores prejudiciais, têm sido feitas diversas modificações nos protocolos a fim de melhorar os resultados. As modificações podem consistir, no uso de diferentes extensores, como por exemplo adição de diferentes crioprotetores. Deve-se também ajustar o protocolo utilizado na descongelação (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Este processo de congelação de sémen começa com a recolha do mesmo. De seguida, remove-se a fração de gel por filtração, adiciona-se diluidor à base de leite desnatado e posteriormente retira-se o plasma seminal (por filtração ou por centrifugação). Adiciona-se um diluidor específico para congelar (com crioprotetores) e o sémen é colocado em micropalhinhas de 0,5 mL. As palhinhas são colocadas no frigorífico a 5°C durante 25 minutos e por fim colocam-se sobre os vapores do azoto, a 5 cm da linha do próprio azoto, durante 10 minutos (figura 4).

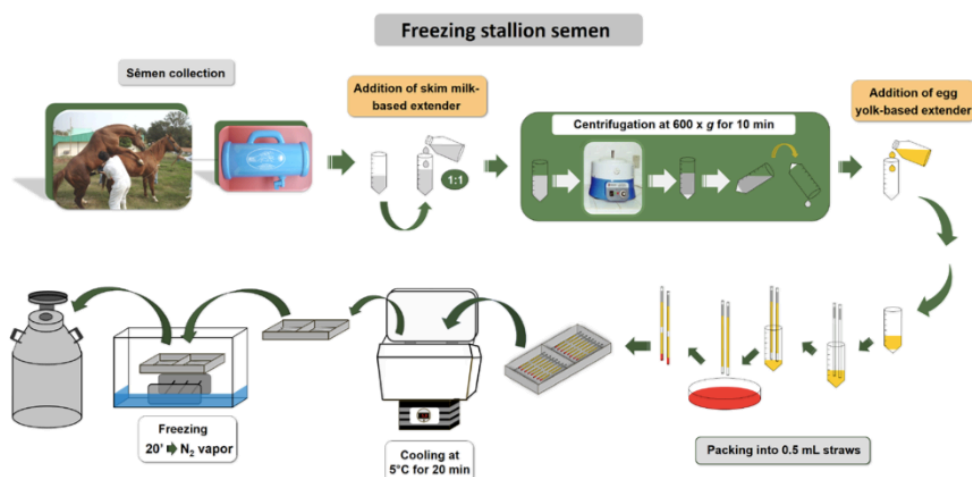


Figura 4-Breve resumo de um protocolo manual da congelação de sémen (MONTEIRO & Sancler-Silva, 2018).

Existem diversos diluidores no mercado, cada um deles com especificidades e protocolos diferentes, mas todos têm o mesmo objetivo de equilibrar o pH do sémen (efeito tampão), neutralizando produtos tóxicos do metabolismo espermático, protegendo o esperma do choque térmico, mantendo o equilíbrio eletrolítico e osmótico e assim

inibindo o crescimento bacteriano e fornecer energia ao esperma. São compostos de tampões, de crioprotetores não penetrantes (lipoproteínas e di ou trissacarídeos), fonte de energia (monossacarídeos), crioprotetores intracelulares (glicerol e amidas) (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Os crioprotetores penetrantes e não penetrantes são essenciais para a criopreservação, evitando assim a formação de cristais de gelo, dentro e fora da célula. Promovem também o efeito osmótico, induzindo a desidratação dos espermatozoides, algo fundamental para a sua sobrevivência (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

O processo de congelação começa com a refrigeração do sémen à temperatura ambiente (em torno dos 20°C) para 5°C (temperatura do frigorífico). Nesta faixa de temperatura a membrana plasmática muda do estado líquido-cristalino para um estado em gel, o que o torna mais suscetível aos danos causados por stress térmico. Como consequência pode haver uma diminuição da motilidade e da fertilização. Para tentar contrariar esse efeito, adiciona-se diluidores com crioprotetores. A refrigeração deve ser lenta o suficiente para que ocorra de forma correta a desidratação celular para evitar a formação de cristais de gelo intracelulares (figura 5) (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

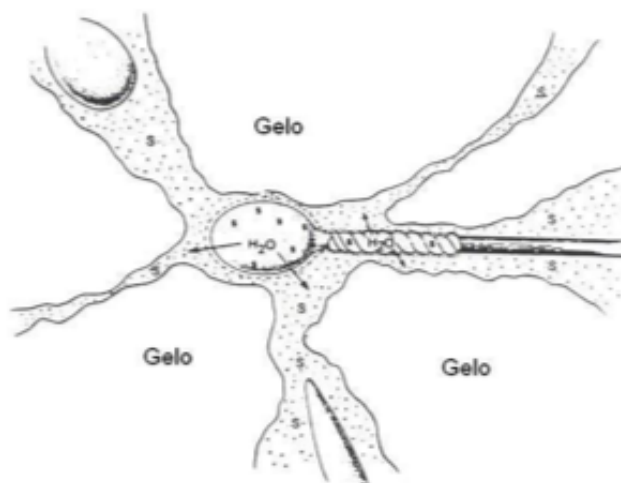


Figura 5-Canais não congelados, demonstrando a formação de gelo (Aidar, 2013)

Por outro lado, deve ser rápida o suficiente para evitar a exposição prolongada dos espermatozoides a soluções hipersaturadas do ambiente extracelular (Loomis et al, 2007).

Entre os 15°C negativos e os 60°C negativos ocorre a congelação completa dos espermatozoides, acaba a atividade metabólica e as células permanecem inativas. Feita

esta etapa, as palhinhas são imersas em azoto líquido (que se encontra a -196°C) por tempo ilimitado, até serem usadas (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

O resultado final é observado aquando a descongelação da palhinha, que deve manter uma curva compatível à curva utilizada na congelação. Caso a curva de congelação tenha sido lenta, a curva de descongelação deve ser lenta também para que os cristais de gela extracelulares descongelem, causando diluição dos solutos e promovendo a reidratação celular lenta. O protocolo mais comumente usado é o de 37°C por 30 segundos, pois não leva à desnaturação dos componentes do esperma caso se ultrapasse o tempo de exposição (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

2.4. Sémen Epididimário

Existem diversos acontecimentos que podem encerrar de forma prematura a vida reprodutiva de um garanhão. Morte súbita, lesão grave, castração, processos obstrutivos ou qualquer outro evento que possa impedir a colheita de sémen e/ou acasalamento do animal. Como já foi referido anteriormente, uma coleta final de espermatozoides pode ser realizada de maneira a preservar o valor genético do animal. Por conta disso, são desenvolvidos diversos estudos sobre a preservação de sémen epididimário para uso futuro, de maneira a evitar perdas genéticas. Esses estudos descrevem algumas técnicas de colheita de esperma epididimal (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Em equinos, os espermatozoides epididimários têm se mostrado resistentes à criopreservação viabilizando assim o uso de animais já aposentados ou mesmo falecidos, como já foi referido anteriormente (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Vários métodos de recuperação de espermatozoides epididimários têm sido utilizados em equinos. Estes, podem ser divididos em recuperação de esperma “*in vivo*” e “*in vitro*” (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

“*In Vivo*” consiste na observação feita imediatamente após a coleta, conservando-se todas as características vitais do objeto em estudo. Por outro lado, “*in vitro*” consiste em processos realizados fora do sistema vivo, em ambiente controlado e fechado (laboratórios p.e.) (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Neste caso em específico, as técnicas mais utilizadas são “*in vitro*”, e em particular os métodos de flotação e fluxo retrógrado (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Para objeto de estudo, os epidídimos podem ser coletados por meio de castração de rotina. Em caso de eutanásia (e se esta for inevitável), será preferível realizar a castração antes da injeção dos compostos, uma vez que podem interferir com a qualidade do sémen (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

É de extrema importância que o epidídimo e canais deferentes se encontrem intactos de forma a minimizar a perda de espermatozoides. Na impossibilidade de realizar a castração próxima ao laboratório, o material de estudo deve ser colocado num equipamento de refrigeração passivo. Esta refrigeração dos epidídimos é necessária para preservar a viabilidade e a fertilidade dos espermatozoides (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

Ao chegar ao laboratório, dissecam-se o epidídimo do testículo, para se proceder à coleta dos espermatozoides com as técnicas adequadas (Roels et al.). Após a remoção do epidídimo, os espermatozoides permanecem viáveis até serem afetados pela decomposição do tecido (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

A viabilidade do esperma é mantida por períodos mais longos quando o epidídimo é armazenado a 5°C. Caso o epidídimo seja mantido em temperatura ambiente, poderá existir um declínio progressivo na qualidade do esperma, sobrevivendo até 24 horas após a orquiectomia (Monteiro & Sancler-Silva, 2018).

2.4.1. Criopreservação de sémen Epididimário

A criopreservação de sémen epididimário pode ser realizada de acordo com os protocolos padrão utilizados (K. ROELS et al.2013).

A capacidade destes espermatozoides em específico têm de resistir à criogenia está diretamente relacionada com a capacidade que os espermatozoides ejaculados têm de resistir ao criodano num determinado indivíduo. Após descongelar as palhinhas, normalmente não se observa diferenças entre a mobilidade total e progressiva do sémen epididimal em comparação com o sémen ejaculado, isto quando se utiliza os diluidores que funcionam melhor com o protocolo usado. Normalmente, quando não existem dados sobre a capacidade de congelação do sémen de um garanhão em particular, utiliza-se o diluidor BotuCrio® (Anexo 1) (Roels et al. 2013).

2.5. Parâmetros a avaliar na qualidade dos espermatozoides

O processo de criopreservação apesar de trazer imensas vantagens para a produção e reprodução das mais variadas espécies, no entanto pode provocar danos estruturais às células que por sua vez podem alterar os resultados da fertilização (Melo-Maciel et al, 2012).

São alguns os parâmetros a avaliar na qualidade dos espermatozoides antes de se proceder à criopreservação.

Numa avaliação imediata, observa-se o volume da amostra, cor, aspeto, odor, motilidade e vigor. Quando se faz recolha de sémen com garanhão, numa primeira fase remove-se a fração de gel e de qualquer outra sujidade presente no ejaculado, portanto é importante realizar a filtração após a colheita. De seguida inicia-se a avaliação das características macroscópicas (figura 6) (Oliveira et al, 2019).

| Parâmetro Imediato | Característica |
|--------------------|---|
| Volume | <ul style="list-style-type: none">• Expresso em mililitros (ml);• Varia consoante raça, idade e método de coleta. |
| Cor | <ul style="list-style-type: none">• Branco a acinzentado;• Consoante o componente presente (sangue, pus, urina e sujidades). |
| Densidade | <ul style="list-style-type: none">• Consistência normal aquosa, aspeto leitoso;• <i>Odor sui generis</i>. |

Figura 6-Quadro resumo dos parâmetros macroscópicos imediatos (Oliveira et al, 2019)

Após a avaliação macroscópica, inicia-se a análise microscópica com o auxílio do microscópio ótico (Oliveira et al, 2019)

2.5.1. Motilidade

Apesar de ser considerado um parâmetro imediato, este já requer uma apreciação mais técnica e precisa, com recurso a um microscópio ótico. Utilizando uma lâmina e lamela pré-aquecidas e mantidas aproximadamente a 37°C, coloca-se uma gota de sémen. Inicia-se a avaliação da motilidade espermática com a objetiva de 10x.

A motilidade espermática expressa-se em percentagem (0 a 100%) e é importante para realizar uma estimativa da viabilidade espermática, que consiste no número de espermatozoides móveis (figura 7) (Oliveira et al, 2019).

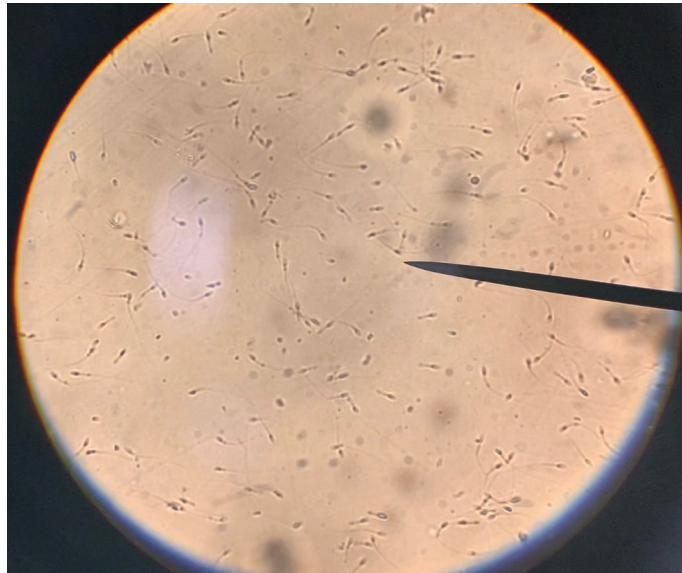


Figura 7-Avaliação da motilidade espermática.
Fonte: Própria, 2020

Esta avaliação é considerada uma análise subjetiva. Para uma avaliação objetiva pode-se utilizar software especializado, como por exemplo, o *Computer-Assisted semen analyses* (Oliveira et al, 2019).

Nesta análise, podem existir diversos fatores que podem alterar a avaliação, tais como a concentração no campo de visão, o grau de contaminação do sémen, grau de aglutinação e temperatura (Samper et al, 2009).

2.5.2. Concentração

A concentração pode ser considerada um dos parâmetros mais importantes a avaliar na qualidade do sêmen, pois irá determinar se este terá qualidade suficiente para ser utilizado em Inseminação Artificial e se se encontra viável para ser refrigerado e/ou criopreservado. Através deste parâmetro é também possível determinar quantas éguas poderão ser inseminadas com apenas um ejaculado.

A medição é feita com auxílio de um espectrofotómetro, fotocolorímetros ou câmara de Neubauer (Samper et al, 2009).

No laboratório de Reprodução Animal da Escola Superior Agrária de Coimbra, é possível utilizar dois equipamentos para avaliar a concentração da amostra: espectrofotómetro e a Câmara de Neubauer.

O **espectrofotómetro** é um aparelho com capacidade de produzir uma luz monocromática, luz esta com um comprimento de onda, capaz de detetar de forma sensível a quantidade de luz absorvida por uma amostra a um dado comprimento de onda, figura (REBELO et al, 2017)

A **Câmara de Neubauer** (figura 8) foi desenvolvida para determinar a concentração de células num volume específico de uma solução. São constituídas geralmente por uma lâmina grossa de uso microscópico com uma profundidade específica.



Figura 8-Câmara de Neubauer. Fonte:
https://www.ufrgs.br/labvir/material/contagem_celulas.pdf

O centro, é formado por duas câmaras com linhas divididas em quadrantes de dimensões conhecidas, chamadas de malhas de leitura. Como se trata de um padrão de quadrantes é possível visualizar a amostra no microscópio e realizar a contagem determinando o número de células presentes naquela determinada área. Podem existir dois desenhos da malha: Neubauer e Fuchs Rosenthal (figura 9) (Kasvi, 2017).

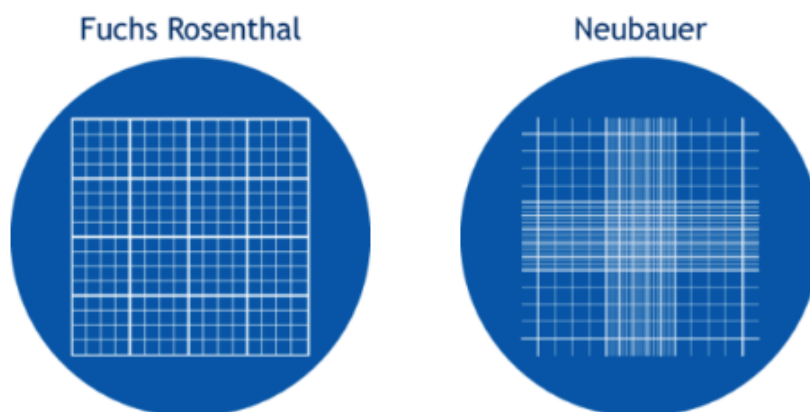


Figura 9-Dois desenhos da malha. Fonte: <https://kasvi.com.br/como-e-realizada-contagem-de-celulas/>

2.5.3. Vitalidade

A vitalidade do espermatozoide reflete-se na proporção de espermatozoides que se encontram “vivos”. Esta, deve ser determinada em amostras de sémen com menos de 40% de espermatozoides móveis, com recurso ao corante eosina-nigrosina para estabelecer a percentagem de espermatozoides vivos.

Esta técnica baseia-se no princípio de que a membrana das células mortas se altera, permitindo a infiltração da eosina na membrana, apresentando uma cor vermelha. Por outro lado, uma célula viva irá excluir o corante. A nigrosina servirá para conferir um fundo escuro que facilitará a avaliação das lâminas. Espermatozoides incolores são considerados “vivos” (Samper, 2009).

2.5.4. Morfologia

A morfologia dos espermatozoides consiste numa avaliação muito importante para entender a saúde reprodutiva de um garanhão.

A Minitube tem uma gama adequada a esta avaliação, a Spermac. Esta, consiste numa coloração diagnóstica de células de esperma de diferentes espécies animais, incluindo espermatozoides humanos. A coloração é usada para conferir uma distinção clara entre espermatozoides morfologicamente anormais e normais (Minitube, 2021).

Para este tipo de avaliação é necessário os quatro recipientes e uma tina de lâminas Coplin (figura 10).



Figura 10-Recipientes Spermac e tina de lâminas Coplin. Fontes:
<https://www.minitube.com/catalog/en/spermac-stain-kit-p1747/> e
<https://www.minitube.com/catalog/en/dye-bath-coplin-p1754/?previous=1>

São necessárias cinco tinas para os cinco recipientes e uma ordem específica. Em primeiro lugar mergulha-se a lâmina, 5 a 6 vezes, na tina com o Fixador e deixar escorrer o excesso. Repetir o mesmo processo nas restantes tinas, seguindo a ordem A, B e C.

No final, o objetivo é obter uma lâmina de cor verde pálido transparente. Caso a lâmina apresente uma cor verde escura indica que o esfregaço secou demasiado antes de se usar o fixador.

2.6. Avaliação da Morfologia do esperma de garanhão

A avaliação da morfologia dos espermatozoides é uma parte bastante importante para a avaliação da saúde reprodutiva de um garanhão. Estes, são selecionados com base no seu pedigree, desempenho atlético ou outras características fenotípicas. Com as mudanças na indústria equina, estas indicam a importância de avaliações mais críticas na fertilidade tem vindo a aumentar. A avaliação da espermorfologia faz parte da avaliação da saúde reprodutiva do garanhão. O propósito desta avaliação é identificar os animais que podem ser incapazes de atingir níveis mínimos específicos a nível da fertilidade e/ou alertar os proprietários sobre potenciais problemas. O exame, ajuda a identificar possíveis problemas que levam a uma fertilidade reduzida, de modo a recorrer a medidas que podem maximizar a fertilidade do garanhão. É de extrema importância entender que o objetivo principal desta avaliação ao sémen é a identificação de ejaculados inférteis e subférteis (Brito, 2007).

Um exame da morfologia do esperma por si só não pode justificar a afirmação de que a fertilidade potencial de um ejaculado é alta, mas pode ser razoável afirmar que a fertilidade potencial é baixa quando existe uma alta proporção de espermatozoides anormais. A espermorfologia tem grande impacto na fertilidade em muitas espécies (Brito, 2007).

2.6.1. Patogéneses dos defeitos do esperma

A espermatogénese é o processo cronológico organizado que envolve multiplicação e diferenciação de células germinativas no epitélio seminífero dos testículos, que irá resultar na formação de uma célula altamente especializada, o espermatozoide (gameta masculino). A espermatogénese pode ser dividida em: espermatocitogénese, meiose e espermiogénese, (figura 11).

| Fase | Descrição |
|---|---|
| <u>Espermatocitogénese</u> Duração de 19,4 dias em ganhões | Proliferação cíclica da população de células-tronco germinativas de espermatogonias por mitose para produzir espermátocitos primários e ao mesmo tempo renovar o seu próprio número e dar continuidade à linhagem de células-tronco. |
| <u>Meiose</u> Duração de 19,4 dias em ganhões | Formação de espermátocitos secundários e espermátides haploides a partir dos espermátocitos primários diploides. |
| <u>Espermiogénese</u> Duração de 18,6 dias em ganhões | Metamorfose de espermátides redondas haploides em espermatozoides maduros que têm uma pequena cabeça plana com núcleo condensado e uma vesícula especializada contendo enzimas e uma cauda necessária para a sua motilidade. Não envolve nenhuma divisão celular. |

Figura 11-- Quadro resumo das fases da espermatogénese (Brito, 2007)

A duração total da espermatogénese é de 57 dias em ganhões. Depois de deixarem os testículos, os espermatozoides são transportados através do epidídimo onde irá ocorrer a maturação final e os mesmos adquirem a capacidade fertilizante, um processo que geralmente leva 9 a 14 dias a ocorrer. Assim, os espermatozoides que se encontram presentes no ejaculado começaram a ser produzidos 66 a 71 dias antes. A espermorfologia é o resultado de eventos que ocorreram nos últimos dois meses que influenciaram a espermatogénese, o transporte e maturação do esperma através do epidídimo (Brito, 2007).

As formas mais brandas de degeneração testicular não demonstram sinais muito detetáveis nos testículos, mas manifesta-se principalmente pelo aumento da produção de espermatozoides anormais. As alterações na morfologia manifestam-se na ejaculação após um intervalo que pode variar de acordo com a fase do desenvolvimento das células

germinativas no determinado momento da ejaculação e o tempo necessário para que as células danificadas sejam libertadas nos túbulos seminíferos e transportadas pelo epidídimo (Brito, 2007).

A espermatogénese normal em mamíferos escrotais depende essencialmente da manutenção da temperatura testicular ideal, entre 3°C a 5°C abaixo da temperatura corporal. As taxas metabólicas e a procura de oxigénio aumentam como resultado do aumento da temperatura do testículo. A artéria testicular longa e bastante enrolada também limita o suprimento de sangue até aos testículos. Como o sangue no testículo não aumenta (ou não aumenta o suficiente) para responder ao aumento da taxa metabólica do tecido aquecido, desenvolve-se hipoxia testicular que pode ser prejudicial à correta produção de espermatozoides (Brito, 2007).

A manutenção de uma concentração adequada de testosterona intratesticular também é essencial para que ocorra uma espermatogénese normal. Uma desregulação endócrina leva à diminuição da produção de testosterona e irá consequentemente levar a um aumento de produção de espermatozoides anormais. Entre alguns desreguladores endócrinos mais comuns encontram-se: os cortisóis, os esteroides anabolizantes e os progestágenos. Essas hormonas podem inibir a GnRH, a LH e por fim a produção de testosterona (Brito, 2007).

Algumas doenças, exercícios esgotantes, fadiga, mudanças drásticas a nível de nutrição e manejo, mudanças de domínio social e transportes de longas distâncias são eventos que podem resultar em stress com o aumento da produção de cortisol e espermatozoides anormais, embora este stress deva persistir por um longo período de tempo suficiente para que a diminuição da concentração de testosterona afete a qualidade do sémen (Brito, 2007).

O tratamento de ganhões com testosterona ou esteroides anabolizantes resulta numa diminuição da secreção de LH, diminuição e atrofia das células de Leydig, diminuição de enzimas esteroidogénicas testiculares e redução da secreção de testosterona, largura escrotal total, produção de espermatozoides e percentagem de espermatozoides normais (Brito, 2007).

Os progestágenos por vezes são administrados em ganhões para tentar suprimir comportamentos “agressivos”, muitas vezes comportamentos ditos normais de um ganhão, porém esses tratamentos podem interferir na produção de esperma de uma maneira bastante parecida aos esteroides anabolizantes (Brito, 2007).

2.6.2. Influência da Raça e da Idade na qualidade do sémen

A qualidade do sémen pode aumentar após a puberdade e diminuir com a idade mais avançada em garanhões. Os efeitos da idade estão relacionados com fatores como a espermatogénese ineficiente em poldros e degeneração testicular devido ao envelhecimento em garanhões mais velhos (Brito, 2007).

Segundo alguns estudos (Dowsett & Knott, 1996), indicam que a maioria das características do sémen e do esperma são influenciadas pela idade do garanhão. Sémen de qualidade inferior foi recolhida em garanhões com menos de 3 anos de idade ou em garanhões com mais de 14 anos de idade. Estes efeitos da idade devem-se provavelmente a diferenças produção e quantidade de produção diária de espermatozoides, que estão relacionadas a uma espermatogénese imatura em poldros, degeneração testicular devido ao envelhecimento e função epididimal anormal. Embora os efeitos da idade nos parâmetros do sémen sejam aparentes, eles têm pouca influência na fertilidade do garanhão, exceto quando se usa ou garanhões muito novos ou garanhões muito velhos. Por isso, recomenda-se que a idade seja levada em consideração ao avaliar garanhões para fins de reprodução.

Como a maturidade sexual no cavalo só ocorre por volta dos 5 anos de idade, existem pequenos volumes de sémen, menor concentração de esperma, menor número total de espermatozoides, maiores percentagens de espermatozoides sem mobilidade e/ou mortos e anormalidades espermáticas foram obtidas neste estudo de Dowsett e Knott (1996), em garanhões com menos de 3 anos de idade, portanto foram considerados normais.

A redução da qualidade do sémen em garanhões mais velhos (11 ou mais anos) pode indicar a existência de uma idade crítica em que alguns animais aumentam a sua produção de espermatozoides anormais devido a uma espermatogénese defeituosa e função epididimal. Sugere-se que os garanhões com 14 anos de idade ou mais se estejam a aproximar do final da sua vida útil sexual (Dowsett & Knott, 1996).

A degeneração idiopática é uma condição que não apresenta nenhuma causa subjacente para que seja identificada. Embora possa afetar garanhões mais jovens, esta é mais frequente em animais de meia-idade ou mais velhos. Esta degeneração compreende um grupo heterogéneo de problemas que parecem estar relacionados com a esteroidogénese (processo de produção de hormonas esteroides) testicular anormal

resultando num anormal funcionamento das células de Sertoli e secreção de inibina. Esta degeneração pode também resultar em mudanças detetáveis no tamanho e consistência testicular, o que pode resultar num declínio constante na produção de esperma e na qualidade do mesmo.

Para Dowsett e Knott (1996), existem alguns efeitos da raça na morfologia dos espermatozoides, mas as diferenças na história e no manejo, as grandes diferenças no número de ganhões de cada raça, a grande variedade dentro da própria raça e a falta de avaliação das interações com a idade tornam muito difícil averiguar se os efeitos na morfologia dos espermatozoides podem ser atribuídos apenas à raça nesses estudos. O resultado final é que a variação individual parece muito maior do que a variação entre as raças (Brito, 2007).

2.7. PrestoBlue

A avaliação do sémen de ganhões é uma parte fundamental da avaliação da subfertilidade do animal e determinação do potencial reprodutivo. A viabilidade espermática refere-se à saúde geral do esperma e quando esta é medida usando técnicas de fluorescência, foca-se na capacidade de uma determinada substância penetrar na membrana espermática danificada ou intacta (Love, 2016).

A viabilidade celular determina a presença de células vivas e/ou mortas, com base numa amostra total de células.

Um ensaio de viabilidade celular analisa, numa cultura celular, células metabolicamente ativas, com o intuito de avaliar a sua atividade. Estes ensaios são usados para fazer uma triagem de moléculas que possuem efeitos na proliferação celular ou possíveis efeitos tóxicos que podem eventualmente conduzir à morte celular. Muitos destes ensaios são realizados em placas de titulação de 96 “poços”.

Atualmente, estão disponíveis diversos ensaios de viabilidade celular, cada um com uma abordagem específica para detetar diferentes parâmetros de viabilidade celular (integridade celular, proliferação celular e funções metabólicas). Estes métodos podem ser divididos em quatro tipos:

- Exclusão de corante;
- Ensaio colorimétricos;

- Ensaio Fluorimétricos;
- Ensaio luminométricos;

O ensaio Fluorimétricos, método utilizado neste estudo, utiliza a fluorescência para a detecção de marcadores celulares. Para utilizar este ensaio, é necessário considerar possíveis interferências de fluorescências contaminantes provenientes de algum componente utilizado na experiência, ou até mesmo da própria amostra em estudo. Dentro destes ensaios, encontra-se o ensaio de redução de resazurina, que usa o poder da redução-oxidação para dar força à sua capacidade de representar a viabilidade celular. (OTTONI, 2017)

O reagente **PrestoBlue** é baseado em resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), um corante azul, levemente fluorescente. Trata-se de um indicador de redox (redução-oxidação) em ensaios de viabilidade celular. É uma solução permeável que após a sua redução, forma resorufina, um composto fluorescente rosa que pode ser medido quantitativamente para determinar a viabilidade (figura 12). Este reagente pode ser medido visualmente, usando a absorvência ou utilizando as saídas fluorescentes da resorufina reduzida (Lall et al, 2013).

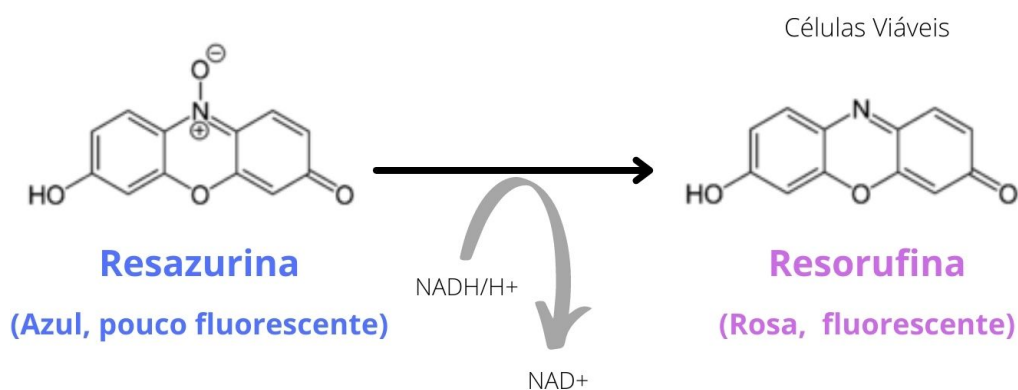


Figura 12-Reação química. Adaptado : Canabarro, 2017

As células viáveis convertem de forma contínua a resazurina em resorufina, ou seja, há uma mudança na coloração de azul para rosa como resposta à atividade metabólica de células viáveis, aumentando a fluorescência geral e a cor do meio de cultura celular (figura 13), com as diferenças entre a primeira hora e a segunda hora, notando-se uma diferença na coloração (Anexo nº 2) (Invitrogen, 2012).

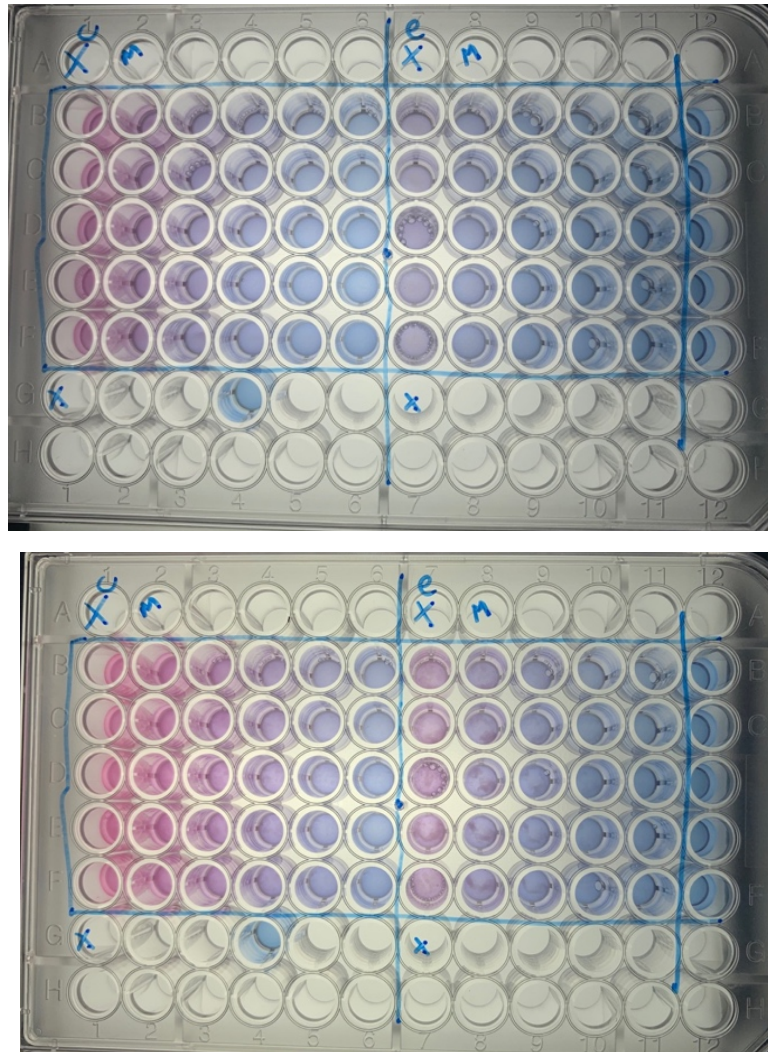


Figura 13- Diferença da coloração entre a primeira hora com a segunda hora. Fonte: Própria, 2021

3. Material e Métodos



3.1. Colheita de sémen

Segundo Bettencourt et al (2018), o método mais seguro e eficaz para a recolha de sémen é recorrendo à vagina artificial (VA), mas é um método que está dependente da experiência e líbido do garanhão, como da experiência do técnico que efetua a colheita.

O garanhão escolhido para a colheita deverá ser dirigido por alguém experiente e que o conheça, permitindo assim prever possíveis comportamentos indesejados do animal. Antes da colheita, o pénis do garanhão deve ser limpo para remover o smegma e alguns detritos, minimizando o risco de contaminação do sémen. A remoção de detritos é também essencial para minimizar riscos associados à leitura da concentração por espectrofotometria, e avaliação da qualidade do sémen (Bettencourt et al, 2018).

Existem diversos modelos de VA, mas a base de funcionamento de todas é idêntica. Neste caso utilizou-se o modelo INRA, composto pelo corpo, *liner* interno de borracha, bainha sanitária e copo de recolha (figura 14).



Figura 14-- Vagina artificial utilizada na recolha. Fonte: Própria, 2021

Depois de montada a VA, enche-se de água, entre os 45°C e os 48°C, para se obter uma temperatura interna em contacto com o “liner” adequada. Esta temperatura pode variar de garanhão para garanhão, podendo facilmente ser regulada. A pressão da VA também tende a depender também das preferências de cada animal, mas sempre adequada para que o pénis entre sem dificuldade e para que haja ingurgitação da glande durante a excitação sexual e a ejaculação. Após a VA estar devidamente montada e cheia, pode-se colocar uma pequena quantidade de gel lubrificante não espermicida para que seja facilitada a penetração. Excesso de gel, mesmo não espermicida, pode provocar choque osmótico aos espermatozoides (Bettencourt et al, 2018).

Uma vez que o cavalo tenha realizado a monta, o pénis deve ser desviado para o lado e introduzido dentro da VA, devidamente colocada em posição semi-horizontal com o tubo coletor ligeiramente elevado, simulando assim a anatomia da vagina da fêmea. Se a temperatura e pressão estiverem adequadas ao garanhão, estimularão o garanhão a fazer movimentos pélvicos.

Quando se opta por utilizar uma égua, esta deve ser escolhida com alguma precaução. Esta, deve apresentar sinais evidentes de cio, para não rejeitar o macho. Deve também ser uma égua calma e de bom maneio. É importante ser peada, para que não lhe seja possível escoicear o garanhão ou o operador (figura 15).



Figura 15-Recolha de sémen. Fonte: Própria, 2021

Na ausência de égua em cio, ou no caso de garanhões treinados, a melhor opção para se realizar a colheita de sêmen é o manequim, reduzindo assim possíveis riscos inerentes tanto para o garanhão como para o operador durante as colheitas. No entanto, para alguns garanhões é importante a presença da égua em cio para aumentar a estimulação sexual, facilitando a monta e ejaculação (Bettencourt et al, 2018).

3.2. Castração

3.2.1. Física

Dentro deste procedimento, existem três técnicas cirúrgicas utilizadas na espécie equina: orquiectomia aberta, semi-fechada e fechada (figura 16). Quando os animais são castrados a campo, as posições mais usuais são em estação ou em decúbito lateral. Esta última mais utilizada, apesar de ser um processo mais moroso, é uma posição mais segura.

Quando se decide castrar no hospital, com condições de assepsia rigorosas, a probabilidade de se desenvolverem complicações pós-operatórias é bastante menor do que em cavalos castrados a campo (Rodrigues, 2019).

| Técnica | Descrição |
|--------------|---|
| Fechada | Incisão na pele escrotal, túnica dartos e fáscia escrotal, até se encontrar a túnica vaginal que não se incide. Incisão é feita a cerca de 1 a 2cm da rafe mediana. O testículo é então agarrado e a fáscia escrotal é dissecada de modo a ser separada do folheto parietal e do músculo cremáster. |
| Semi-fechada | Incisão de cerca de 2 a 3cm na túnica vaginal, de modo a observar a evidência de herniação intestinal no canal inguinal, emasculando também toda a túnica vaginal. |
| Aberta | Incisão na túnica vaginal, ligamento da cauda do epidídimo é cortado de modo a libertar o testículo das túnicas e apenas o cordão espermático é emasculado. O Emasculador é deixado durante 10 minutos até ser retirado. |

Figura 16-Quadro resumo das técnicas de orquiectomia (Rodrigues, 2019)

Ambas as técnicas têm as suas vantagens e desvantagens, sendo inteiramente da escolha do médico veterinário escolher a opção mais indicada. A técnica aberta é um procedimento mais rápido pois não existe um processo de dissecação moroso, mas como não existe eliminação da túnica vaginal e existe uma maior probabilidade de infeção. A técnica semi-fechada permite uma maior visualização, mas apresenta uma maior probabilidade de complicação pós-operatória (Rodrigues, 2019).

Neste estágio a técnica utilizada pela equipa de Veterinários da Equicare é a técnica aberta.

3.2.2. Química

Nos últimos anos, investigadores demonstraram interesse em desenvolver uma alternativa à castração cirúrgica. Segundo Ibrahim et al (2016), um esterilizante químico ideal será aquele que interrompe de forma efetiva a espermatogénese e a androgénese, como também a libido, livre de efeitos colaterais tóxicos.

Este método de castração consiste no tratamento dos machos com estrogénios, que inibem a ação da testosterona e a função testicular, sem que exista a destruição dos testículos. Em termos de produção de carne, tem interesse uma vez que melhora a qualidade da carcaça, pois existe um aumento do ritmo de deposição de gordura, intramuscular e abdominal, contribuindo para uma carne mais clara, tenra e succulenta. Estes estrogénios são sintéticos, como por exemplo o dietilestilbestrol, que é capaz de desencadear consequências ao nível do hipotálamo, diminuindo a GnRH, da hipófise, diminuindo a LH e dos testículos, diminuindo assim a testosterona. Todas estas diminuições culminam na supressão das características sexuais secundárias e inibição da espermatogénese (Antunes, 2017).

Para Abou-Khalil et al (2020), a procura de métodos de castração eficazes que comprometam minimamente a fisiologia corporal dos animais merece especial atenção.

O medicamento utilizado é o Improvac®, que induz uma resposta imune contra a hormona GnRH, que controla a função testicular através das hormonas gonadotróficas LH e FSH. A substância ativa presente é um análogo sintético da GnRH, conjugado com uma proteína transportadora imunogénica, que aumenta o nível e duração do efeito do medicamento. Existe uma redução da produção e concentração de testosterona e de outros esteroides testiculares, incluindo a androsterona, uma das principais substâncias

responsáveis pelo odor sexual. Após uma segunda administração, observa-se uma redução do comportamento típico dos machos, como por exemplo a agressividade.

Dada a dose inicial, os machos encontram-se primovacinados, mas mantêm a função testicular íntegra até a administração da segunda dose, a qual provoca uma forte resposta imunitária contra a GnRH, suprimindo temporariamente a função testicular (Anexo 2).

Geralmente é o proprietário que opta pela castração química, quando o objetivo é obter uma maior tranquilidade comportamental do animal, sem que haja impedimento definitivo da sua utilização reprodutiva. Passados 6 a 12 meses o efeito desaparece parcialmente ou completamente. De uma forma geral, este procedimento tem custos mais baixos quando comparado com a castração física e por outro lado não implica a orquiectomia física definitiva, caso o proprietário ainda pretenda vir a manter o potencial genético do animal.

Abou-Khalil et al (2020) realizou um estudo envolvendo burros, dividido por dois grupos experimentais, animais castrados quimicamente e animais castrados cirurgicamente, com o objetivo de avaliar as várias respostas no sistema biológico, nomeadamente respostas ao stress, perfil lipídico e bio-marcadores de stress oxidativo e mais tarde avaliar potenciais diferenças em parâmetros físicos.

Embora a castração química possa ser uma alternativa não cirúrgica mais indicada em termos de eficácia, custo, bem-estar animal e questões metabólicas em outros animais, como por exemplo, em ratos albinos (Jana et al, 2002), cães (Leoci et al, 2019) e cabras de raça *Black Bengal* (Jana et al, 2005), existem ainda poucos estudos a longo prazo noutros animais, nomeadamente na espécie equina.

3.3. Recolha do sémen no Epidídimo

3.3.1. Método de Flotação

O Método de Flotação (figura 17), destaca-se por ser uma técnica que não requer muitos conhecimentos e habilidades especializadas (Roels et al. 2013). De uma forma geral consiste em realizar algumas incisões longitudinais na cauda do epidídimo (MONTEIRO & Sancler-Silva, 2018) e colocar numa caixa de Petri cheia com aproximadamente 5 mL de diluidor de sémen aquecido. Durante dez minutos, os

espermatozoides podem nadar para fora do epidídimo. Para ajudar, pode-se pressionar o epidídimo contra a placa de Petri de modo a “espremer” o restante. No final, retira-se os remanescentes do epidídimo e o extensor de sémen é coletado para observação.

Pode-se encontrar algumas desvantagens na utilização desta técnica: número de espermatozoides obtidos inferior (cerca de 4 a 5 bilhões de espermatozoides), quando comparado com o fluxo retrógrado (cerca de 15 a 20×10^9 de espermatozoides); devido as incisões efetuadas e ao tempo permitido, existe uma maior exposição a contaminações provenientes do sangue (Roels et al.2013).



Figura 17-Método de flotação (Roels et al.)

3.3.2. Técnica do fluxo retrógrado

Esta técnica (figura 18), já requer um cuidado mais especial, pois requer a remoção cuidadosa da túnica albugínea e dissecação cuidadosa do tecido conjuntivo ao redor do epidídimo (Roels et al., 2013) deve-se ter especial atenção para não cortar ou danificar a cauda. O tubo único é totalmente enxaguado pelo extensor a partir do canal deferente após desenrolar o ducto epididimal, permitindo a saída de espermatozoides até à transição cauda-corpo do epidídimo (MONTEIRO & Sancler-Silva, 2018). Os espermatozoides podem ser coletados num recipiente.



Figura 18-Técnica do fluxo retrógrado (MONTEIRO & Sancler-Silva, 2018) à esquerda; Realização da técnica FONTE: Própria

3.4. Congelação sémen

Diluição do sémen

Depois de realizada a colheita, colocar o sémen em banho maria e fracionar o ejaculado em dois tubos falcon e adicionar o diluidor de centrifugação. Fechar os tubos com o devido cuidado e levar a centrifugar.

Centrifugação

Centrifuga-se a 542 G durante 10 minutos à temperatura ambiente. No final, eliminar o sobrenadante que não deverá conter espermatozoides e ressuspende-se o *pellet* de espermatozoides (SPZs) da amostra com 3mL de diluidor de congelação, juntando à posteriori tudo no mesmo falcon. Fechar cada um dos tubos e homogeneizar à temperatura ambiente.

Após o *pellet* de SPZs estar completamente ressuspendido e o total de SPZs dos (eventuais) dois *falcons* estarem reunidos em apenas um, avalia-se a motilidade e determina-se a concentração recorrendo a uma câmara de contagem celular.

Com base, pelo menos nestes dois parâmetros (motilidade e concentração), podemos estimar o número total de espermatozoides viáveis que teremos à nossa disposição. Procurando obter uma concentração final de 400×10^6 SPZ/ml, o que implica que cada palhinha irá ficar com 200×10^6 SPZs viáveis, sabemos o número total de palhinhas que iremos obter; sabendo o número total de palhetas que iremos obter e que cada uma tem o volume de 0,5 ml, podemos agora adicionar o volume do diluidor de congelação em falta.

Enchimento das palhetas

O enchimento das palhetas foi efetuado individualmente, utilizando para este efeito um micromanipulador de embriões. O sémen, depois de se encontrar na diluição pretendida é aspirado para o interior das palhetas, deixando um espaço de ar no meio destas, evitando desta forma que estas rebentem quando submetidas a congelação. De

seguida, as palhetas são seladas utilizando um pó vedante (Sealing ball, glass, for 0.5 ml straws, Orange, REF: 13400/0900 Minitube) e colocadas na *rack* de congelação.

Arrefecimento do sémen

No frigorífico, colocar as palhetas a 4°C durante 30 minutos. Colocar as palhetas arrefecidas nos vapores de azoto durante 10 minutos, colocando a *rack* de congelação a 4 cm acima do nível do azoto líquido, aproveitando assim os vapores do mesmo.

Congelação do sémen

Ao final do tempo de arrefecimento nos vapores de azoto, as palhetas são mergulhadas em azoto líquido. Por fim, coloca-se as palhetas nos canisteres com o azoto.

3.5. Protocolo da Equigerminal

Campo

Procede-se à colheita de sémen, geralmente, a dois garanhões Puro Sangue Lusitano, ou na casa do produtor ou nas instalações da Escola Superior Agrária de Coimbra. Por cada garanhão, recolhíamos dois Falcons de 15ml, 12ml com o diluidor de centrifugação e os 3ml restantes com o sémen recolhido, já devidamente filtrado. Ao todo, recolhemos amostras 8 cavalos, 6 são Puro Sangue Lusitano e 2 são *Warmblood* (figura 19).

A contagem começou no número quatro, pois as três primeiras recolhas foram para acertar o método e meio a realizar na experiência, os resultados obtidos não foram contabilizados.

| Data | Cavalo | Hora Recolha | Hora Plaqueamento |
|------------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| 11 Maio | PSL #4 | 12:00 | 16:31 |
| 13 Maio | PSL #5 | 12:30 | 16:30 |
| 18 Maio | WB #1 | 9:00 | 21:00 |
| 18 Maio | WB #2 | 11:45 | 21:00 |
| 6 Julho | PSL #6 | 10:50 | 17:31 |
| 6 Julho | PSL #7 | 11:06 | 17:31 |
| 14 Setembro | PSL #8 | 10:15 | 15:18 |
| 14 Setembro | PSL #9 | 10:45 | 15:18 |

Figura 19-Quadro com informações das recolhas e hora de plaqueamento. Fonte: Própria, 2021

Laboratório Equigerminial

Preparação do Meio

Foi preparado um meio completo final de 50 mL, que contém 0,5 mL de Fungisona a 1% para combater possíveis fungos existentes na amostra, 5 mL de Soro Fetal Bovino (FBS) a 10%, este soro, é um suplemento para meios de cultura celular, promovendo o crescimento de células, 0,5 mL de Glutamax a 1%, composto por um nutriente essencial para a cultura de células e por fim 44 mL de DMEM F_{12} , um meio basal que serve de suporte ao crescimento de culturas (figura 20).



Meio Completo
50ml de Volume final

- 0,5 ml de Fungisona a 1%
- 5 ml de FBS a 10%
- 0,5 ml de Glutamax a 1%
- 44 ml DMEM F₁₂

Cálculos:

- Fungisona 1%: $1 \times 50 = 100 \times \approx 0,5 \text{ ml}$
- FBS 10%: $10 \times 50 = 100 \times \approx 5 \text{ ml}$
- Glutamax 1%: $1 \times 50 = 100 \times \approx 0,5 \text{ ml}$
- DMEM F₁₂: $50 - 0,5 - 0,5 - 5 = 44 \text{ ml}$

Figura 20- Esquema do meio completo utilizado e cálculos utilizados. Fonte: Própria, 2021

Ao chegar ao laboratório, a primeira tarefa a ser cumprida é centrifugar as amostras de sémen recolhidas em campo. O centrifugador utilizado é o *Eppendorf Centrifuge 5810 R* (figura 21), que para além de centrifugar também tem capacidade de regular a temperatura. Foi utilizado sempre a mesma configuração para todas as amostras:

- 1200 g;
- 4°C;
- 20 minutos;
- Rampa de aceleração a 9;
- Rampa de desaceleração a 2;



Figura 21- Eppendorf Centrifuge 5810 R. Fonte: Própria, 2021.

Durante estes 20 minutos, prepara-se a Câmara de Fluxo, com todo o material necessário para as próximas tarefas. Esta câmara permite realizar um trabalho seguro em ambiente limpo (figura 22).

Terminados os 20 minutos da centrifugação, levam-se as amostras para a Câmara de fluxo, retira-se o sobrenadante da amostra e ressuspende-se os Falcons. De seguida adicionamos 10 ml de DPBS para realizar a lavagem. De seguida, coloca-se novamente na centrifugadora por mais 20 minutos, com as mesmas configurações da primeira etapa.



Figura 22- Câmara de Fluxo. Fonte: Própria, 2021

Ao fim de 20 minutos, mais uma vez é necessário retirar o sobrenadante das amostras (com auxílio de uma pipeta de *pastour*). Por fim, adiciona-se 3 ml do meio a cada um dos tubos falcon, que foi preparado anteriormente, e ressuspende-se os *pellets* de espermatozoides das amostras novamente.

Contagem de Espermatozoides

Concluída esta etapa, é tempo de preparar para fazer a contagem de espermatozoides. Para isso, é necessário preparar a câmara de Neubauer, fazendo uma diluição de 1/10 entre o reagente Trypan Blue com a amostra de sémen, isto é, pipetar 20 μL do falcon que contem sémen e meio e pipetar 180 μL do reagente Trypan Blue para um Eppendorf de 2 ml. De seguida pipetar apenas 10 μL desta preparação para a câmara de Neubauer, como exemplifica a figura (figura 23).

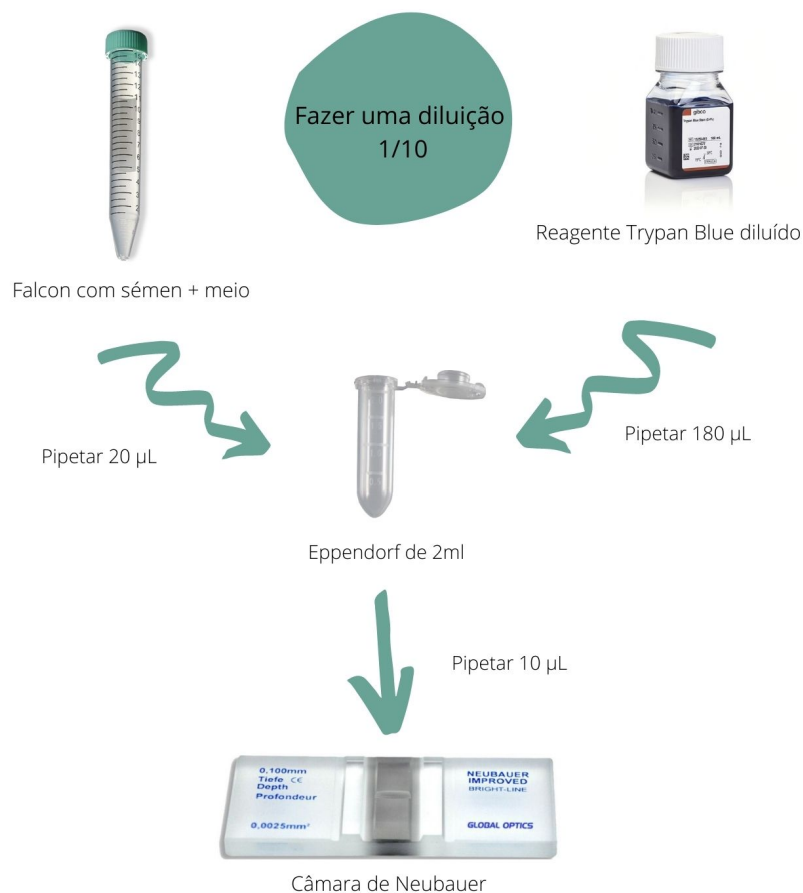


Figura 23- Preparação da câmara de Neubauer. Fonte: Própria, 2021

Depois de montar a Câmara de Neubauer faz-se a observação num microscópio digital, onde facilita o processo de contagem (figura 24).



Figura 24- Microscópio digital. Fonte: Própria, 2021

Feita a contagem, realizam-se os cálculos de concentrações da contagem de espermatozoides, o número total de espermatozoides por ejaculado e as concentrações necessárias para o plaqueamento (consultar anexo nº3).

Preparação da microplaca de 96 poços

Dado que o ensaio com *PrestoBlue* é altamente sensível, para se chegar a um resultado ideal, selecionar a placa adequada é de extrema importância. Placas diferentes têm propriedades refletivas diferentes. As placas pretas absorvem a luz, reduzem a fluorescência de fundo e minimizam a diafonia de poço para poço. As placas brancas refletem a luz e maximizam o sinal de saída. Por isso, neste ensaio foram utilizadas placas transparentes, pois são favoráveis em estudos de culturas de células (Xu et al, 2015).

Na primeira coluna de poços (coluna nº 2), é necessário pipetar 300 µL de sémen + meio + Presto Blue em cada poço, 4 por amostra de sémen, 8 poços no total.

Nos restantes poços (coluna 3 a 8), pipeta-se 100 µL de meio + Presto Blue a 10%, em cada um dos 48 poços, contando com a coluna de controlo. Para realizar as diluições sucessivas de 1/1,5, pipeta-se 200 µL da coluna nº 2 para as restantes colunas, até à coluna nº7, no final descarta-se os 200 µL finais, perfazendo um total de 100 µL por poço (figura 25).

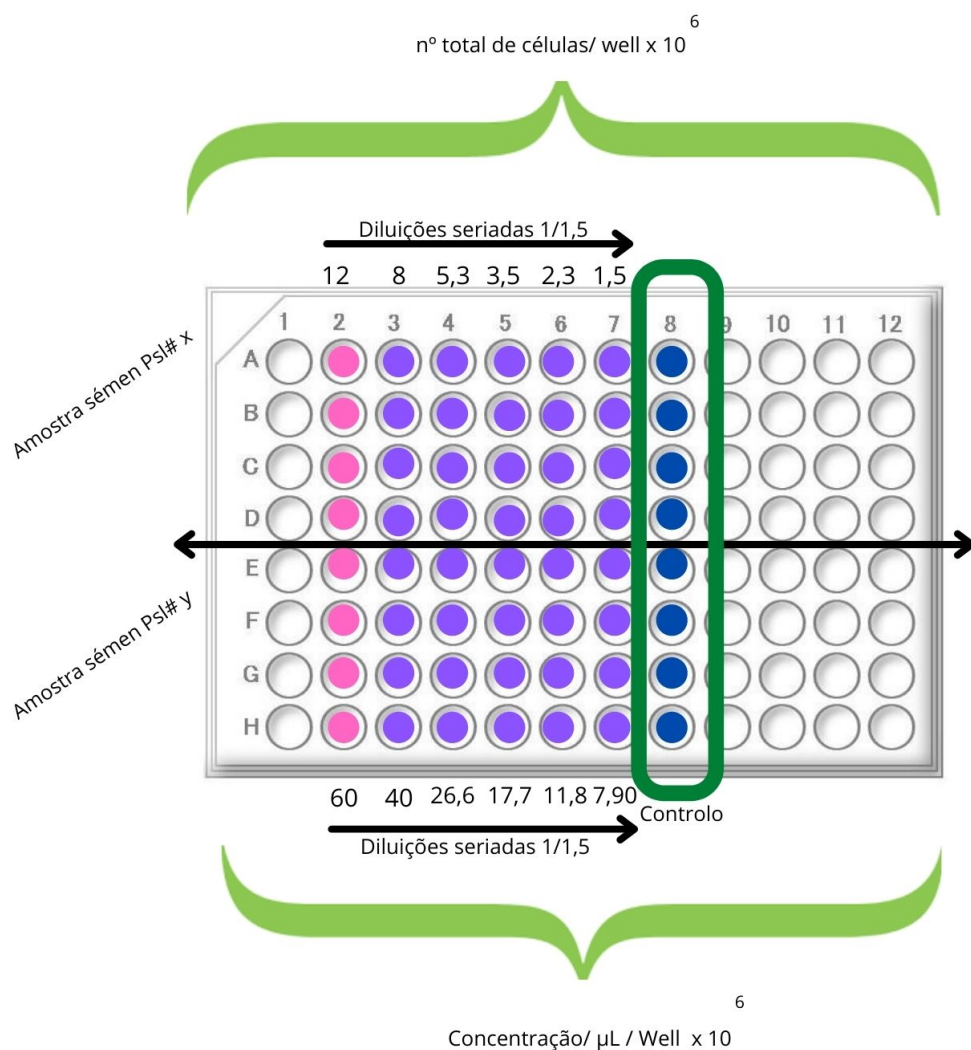


Figura 25- Esquema utilizado na microplaca. Fonte: Própria, 2021

Depois de preparada a placa, coloca-se na incubadora a 37°C para se fazer a leitura no espectrofotómetro a cada hora, durante 3 horas.

3.6. Análise Estatística

Após a leitura das placas no espectrofotómetro, o programa utilizado dava acesso a uma folha Excel com todos os dados da leitura para os comprimentos de onda de 570nm e 600nm. Para normalizar os valores obtidos, realiza-se a subtração dos valores obtidos de cada poço no comprimento de onda de 570nm pelo OD (Densidade Ótica) Branco obtido em cada microplaca (Figura 26).

$$\text{Normalização dos valores} = OD\ 570\ \text{nm} - OD\ \text{Branco}$$

Figura 26- Cálculo da normalização dos valores. Fonte: Própria, 2021

Os resultados referentes ao estudo, foram analisados pela Análise de Variância, pelo teste de comparação de todas os pares de colunas de Bonferroni. (ANOVA; GraphPAD PRISM, Version 5.00, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

A significância foi definida para um valor de $p < 0,05$.

3.7. Trabalho Experimental

Trabalho I: Congelação de sémen epididimário de garanhões sujeitos a orquiectomia física

Os animais incluídos neste trabalho foram 4 garanhões, dois de raça Puro-Sangue Lusitano (PSL) e dois de raças *Warmbloods*, com idades entre os 3 e os 7 anos.

As intervenções cirúrgicas foram realizadas pela técnica aberta, de acordo com a descrição anterior, no ponto 3.2.1.

A recolha de sémen a partir do epidídimo foi efetuada tal como referido no ponto 3.4.2 e a congelação do sémen epididimário foi realizada de acordo com o ponto 3.5.

A avaliação do sémen congelado foi realizada 3 semanas após a congelação, após uma descongelação rápida de 30 segundos a 37°C e esta consistiu numa avaliação da motilidade após a descongelação.

Trabalho II: Avaliação da qualidade do sémen epididimário obtido de garanhões previamente submetidos a castração química

Neste trabalho, vários fatores que nos foram externos, levaram a que apenas pudéssemos contar com dois animais.

Os animais em questão foram submetidos à castração química 2 e 4 semanas antes da castração física, de acordo com o autor Antunes (2017).

A castração física foi realizada tal como referido no ponto anterior, pela técnica aberta e em decúbito dorsal.

O sémen obtido a partir do epidídimo, foi obtido e sujeito a congelação, de acordo com o ponto 3.5.

A descongelação e a avaliação do sémen, foram avaliadas tal como no ponto anterior.

Trabalho III: Avaliar a técnica do PrestoBlue, como técnica fiável para avaliar a viabilidade celular do sémen equino em condições de refrigeração

Neste trabalho foram incluídos 6 garanhões da raça PSL, com idade compreendidas entre os 6 e os 18 anos.

As recolhas de sémen foram realizadas de acordo com o ponto 3.1. O procedimento laboratorial seguinte foi realizado de acordo com o ponto 3.5. e o tratamento estatístico dos resultados obtidos, foi realizado de acordo com o ponto 3.6.

4. Resultados e Discussão



4.1. Congelação de sémen epididimário de garanhões sujeitos a orquiectomia física

Como referido na Revisão Bibliográfica, esta técnica tem vindo a ser crescentemente utilizada particularmente em situações extremas.

Numa fase inicial, verificaram-se alguns problemas relacionados com uma má avaliação inicial da qualidade de sémen, logo após a sua obtenção por lavagem retrógrada do epidídimo.

Logo que este problema foi ultrapassado, e a técnica aperfeiçoada, foi possível congelar sémen de 4 cavalos submetidos a orquiectomia (castração) física. A posterior avaliação da motilidade do sémen congelado a partir do epidídimo, revelou-se dentro dos valores normais para o sémen congelado a partir de uma ejaculação, ou seja, entre os 25-35% de motilidade (Roels et al, 2013). O número reduzido de animais em estudo, não permitiu realizar uma avaliação estatística destes resultados.

Estes resultados estão de acordo com os resultados reportados por outros autores, nomeadamente Guimarães e colaboradores (2012), num trabalho com uma amostra de 10 garanhões, onde concluíram que a congelação de semen epididimário obtido imediatamente após a castração, ou em alternativa após a refrigeração de todo o epidídimo durante 24h e posterior recolha do semen por fluxo retrógrado, apresentaram resultados semelhantes.

Também em termos de taxa de concepção, o sémen epididimário apresenta geralmente bons resultados. De acordo com Monteiro et al (2011), a taxa de concepção de três grupos de éguas foi semelhante, recorrendo tanto a sémen recolhido por vagina artificial, como sémen obtido do epidídimo logo após a orquiectomia, como sémen obtido a partir de epidídimo refrigerado a 5°C durante 24h.

Papa et al (2008) investigou o efeito de diferentes diluidores na capacidade de criopreservação dos espermatozoides provenientes do epidídimo. Foi observado que as motilidades totais e progressivas foram diferentes entre diluidores, porém, a integridade da membrana não apresentou grandes variações significativas. A utilização do BotuCrio

aumentou a cinética espermática, que se encontra relacionado à sua composição com diversos aminoácidos responsáveis pela proteção da integridade espermática e ativação da motilidade dos espermatozoides.

Segundo Bruemmer (2006), é necessário um cuidado adequado na recolha dos testículos e epidídimos, juntamente com o acondicionamento e transporte adequados. Reunidas estas condições, o autor afirma que pode ser uma contribuição no resgate de espermatozoides viáveis. Com o avançar das técnicas de reprodução assistida, mais descendência pode existir através de esperma epididimal armazenado de garanhões valiosos.

4.2. Avaliação da qualidade do sémen epididimário obtido de garanhões previamente submetidos a castração química

A avaliação da qualidade do sémen epididimário dos 2 garanhões previamente submetidos a castração química, não revelou diferenças relativamente aos garanhões que não tinham sido submetidos a este tratamento.

Este tratamento tem sido relacionado com uma relativa diminuição da libido sexual e da circunferência escrotal (Antunes, 2017). Estes aspetos foram parcialmente observados. Porém alterações à motilidade, não se observaram. O número reduzido de animais neste estudo, bem como o reduzido período de intervalo entre o tratamento químico e a castração física e subsequente processamento do sémen, não permitiram uma análise estatística desta abordagem. É de referir que foi relatado pelos proprietários uma redução da libido sexual, o que sugere que as alterações comportamentais podem anteceder as alterações fisiológicas em particular as características seminais.

Segundo Abou-Khalil et al (2020), apesar de a castração não cirúrgica apresentar bons resultados em outras espécies, como foi anteriormente mencionado, pouco se sabe sobre os impactos no estado fisiológico do corpo a longo prazo. Estes autores realizaram várias comparações em burros castrados cirurgicamente *versus* burros quimicamente castrados e a realização de uma orquiectomia física indicou existir menos stress e pequenas alterações no perfil lipídico em relação à castração química.

Ibrahim et al (2016) também realizou estudos da influência da castração química em burros, com base nos níveis de testosterona e nas alterações histopatológicas nos

testículos sujeitos ao procedimento. Estes tentaram observar a eficácia da castração química com 20% de cloreto de cálcio dissolvido em etanol. Na conclusão desse estudo, observou-se inflamação na genitália externa, ulcerações escrotais e fístulas (Ibrahim et al, 2016).

Por outro lado, importa no futuro repetir este ensaio com um número superior de animais, pois os resultados obtidos, podem sugerir que apesar de habitualmente se verificarem alterações comportamentais e morfológicas (redução da circunferência escrotal), é possível que não ocorram alterações da função espermática e assim a castração química poderia ser utilizada apenas com efeito temporário, não comprometendo definitivamente a função reprodutiva do garanhão no futuro.

4.3. Avaliar a técnica do *PrestoBlue*, como técnica fiável para avaliar a viabilidade celular do sémen equino em condições de refrigeração

Numa primeira fase, enquanto as placas se encontram na incubadora, realizaram-se os cálculos de concentrações de espermatozoides/ 6 mL e o total de espermatozoides no ejaculado (consultar anexo nº2).

O total do ejaculado foi observado após filtração.

Para avaliar a técnica utilizando o reagente *PrestoBlue*, é de extrema importância a correta escolha do meio para a proliferação celular, facilitando assim o sucesso da técnica. Neste caso, optou por se adicionar Fungisona a 1%, um antifúngico, e Glutamax a 1%, um nutriente que ajuda na cultura de células. Foi importante a adição do antifúngico, pois de modo a evitar contaminações externas (prepúcio sujo contamina o sémen p.e), evitando assim possíveis contaminações em toda a microplaca e/ou de outras amostras presentes na incubadora.

Dentro do grupo de *Warmbloods*, apenas dois garanhões foram sujeitos a recolha, por isso é possível observar que o WB #1 de apenas 5 anos de idade apresenta uma maior concentração de espermatozoides pelos 6 mL recolhidos ao todo, cerca de $113,6 \times 10^6$ spz/6 mL, mas relativamente ao total de espermatozoides por ejaculado, o WB #2 de 8 anos ejaculou um maior volume e também apresenta uma concentração total maior, cerca de $46,67 \times 10^8$ spz/ejaculado total.

No grupo dos Puro Sangue Lusitanos, o cavalo com uma maior concentração de espermatozoides por 6 mL foi o PSL #6, cerca de $201,6 \times 10^6$ spz, porém, apenas ejaculou um total de 16 mL.

Por outro lado, o cavalo com um maior número de espermatozoides por ejaculado foi o PSL #7, com cerca de $43,52 \times 10^8$ spz (tabela 1).

Tabela 1- Concentração de espermatozoides.

| Cavalo | Idade (anos) | Concentração de SPZ/ 6 mL | Total do Ejaculado (mL) | Nº total de SPZ/ Ejaculado |
|--------|--------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------|
| PSL #4 | 6 | $82,93 \times 10^6$ spz | 20 | 16,59 $\times 10^8$ spz |
| PSL #5 | 15 | $16,00 \times 10^6$ spz | 55 | 8,8 $\times 10^8$ spz |
| WB #1 | 5 | $113,6 \times 10^6$ spz | 25 | 28,40 $\times 10^8$ spz |
| WB #2 | 8 | $93,33 \times 10^6$ spz | 50 | 46,67 $\times 10^8$ spz |
| PSL #6 | 17 | $201,6 \times 10^6$ spz | 16 | 32,26 $\times 10^8$ spz |
| PSL #7 | 19 | $108,8 \times 10^6$ spz | 40 | 43,52 $\times 10^8$ spz |
| PSL #8 | 16 | $107,7 \times 10^6$ spz | 25 | 26,93 $\times 10^8$ spz |
| PSL #9 | 21 | $115,4 \times 10^6$ spz | 30 | 34,62 $\times 10^8$ spz |

Nos equinos, a puberdade é atingida entre as 56 a 97 semanas com média de 83 semanas (Gamboa et al, 2009), e a maturidade sexual é alcançada dos 2 a 4 anos mais tarde, visto que o tamanho testicular e a produção diária de esperma vão aumentando gradualmente ao longo dos anos após atingida a puberdade.

Os animais mais jovens utilizados neste trabalho, contavam com 6 anos (PSL# 4) e 5 anos (WB #1), coincidiu com os um dos volumes mais baixos de ejaculado, cerca de 20 ml e 25 ml, respetivamente. O número total de espermatozoides por ejaculado destes animais, também foi dos mais baixos da nossa amostra, cerca de $16,59 \times 10^8$ spz/ejaculado para o puro sangue lusitano de 6 anos e cerca de $28,40 \times 10^8$ spz por ejaculado.


Análise das Microplacas

É importante para o estudo, definir as concentrações a utilizar e qual a concentração mais adequada para o desenvolvimento e viabilidade celular para este reagente, o PrestoBlue.

Após normalização dos valores, como descrito no ponto 3.6, análise estatística, foi realizada uma tabela com todos os valores médios obtidos de cada garanhão, para cada concentração na primeira hora.

De notar que, a concentração 1 (C1) é igual a $7,90 \times 10^6$ spz, a concentração 2 (C2) é igual a $11,8 \times 10^6$ spz, a concentração 3 (C3) é igual $17,7 \times 10^6$ spz, a concentração 4 (C4) é igual a $26,6 \times 10^6$ spz, a concentração 5 (C5) é igual a 40×10^6 spz, e por fim a concentração 6 (C6) é igual a 60×10^6 spz (tabela 2).

Tabela 2- Resultados obtidos após normalização dos valores por concentração na hora 1

|  | Group A | Group B | Group C | Group D | Group E | Group F |
|---|----------|---------|---------|---------|---------|----------|
| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
| 1 | 0.12324 | 0.17048 | 0.16208 | 0.19332 | 0.42478 | 0.94300 |
| 2 | 0.03676 | 0.05474 | 0.06492 | 0.14862 | 0.14862 | -0.42900 |
| 3 | 0.16320 | 0.22446 | 0.36290 | 0.48012 | 0.68334 | 0.45450 |
| 4 | 0.16002 | 0.19136 | 0.33006 | 0.48222 | 0.73906 | 0.09608 |
| 5 | 0.19514 | 0.26470 | 0.37606 | 0.48742 | 0.64590 | 1.05220 |
| 6 | 0.11926 | 0.17116 | 0.24538 | 0.33516 | 0.47492 | 0.87080 |
| 7 | -0.39750 | 0.16294 | 0.28274 | 0.44684 | 0.61196 | 0.62980 |
| 8 | | 0.11834 | 0.16118 | 0.23162 | 0.32380 | 0.31480 |

Após análise dos valores obtidos do grupo de animais, após 1 hora na incubadora, existe uma diferença estatisticamente significativa entre as médias (tabela 2). O $P=0.0049$, portanto apresenta um valor bastante significativo (tabela 3).

Tabela 3- Sumário ANOVA 1ª Hora

| ANOVA summary | |
|---|--------|
| F | 3.982 |
| P value | 0.0049 |
| P value summary | ** |
| Significant diff. among means (P < 0.05)? | Yes |
| R squared | 0.3269 |

Nota: P > 0,05 = não significativo (“ns”); 0,05 - 0,01 = significativo (“**”); 0,01 - 0,001 = bastante significativo (“***”) e < 0,001 = altamente significativo (“****”).

Principalmente entre a concentração C1 (concentração de $7,90 \times 10^6$ spz) e a concentração C5 (40×10^6 spz), e a concentração C1 e a C6 (concentração 60×10^6 spz). Pode-se notar que quanto maior for a concentração de células por poço, maior será também a viabilidade celular (figura 27).

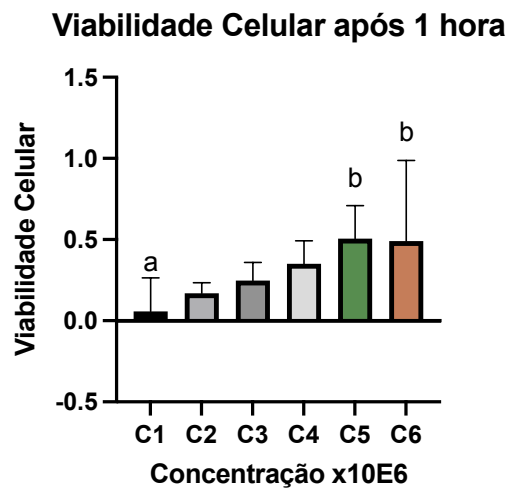


Figura 27- Viabilidade Celular após 1 hora de incubação

Viabilidade celular após 2 horas de incubação, com um grau altamente significativo (***) . P value= 0,0003 entre os valores médios de cada garanhão. A concentração utilizada que apresenta maior viabilidade é a C6 (60×10^6 spz),

Após normalização dos valores, como descrito no ponto 3.6, análise estatística, foi realizada uma tabela com todos os valores médios obtidos de cada ganhão, para cada concentração na hora 2 (tabela 4).

Tabela 4- Resultados obtidos após normalização dos valores por concentração na hora 2

| | Group A | Group B | Group C | Group D | Group E | Group F |
|---|----------|----------|---------|---------|---------|---------|
| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
| 1 | 0.14294 | 0.19088 | 0.19756 | 0.23732 | 0.48140 | 1.01758 |
| 2 | 0.18388 | 0.23662 | 0.25406 | 0.27188 | 0.31624 | 0.35468 |
| 3 | 0.19024 | 0.26350 | 0.41606 | 0.54308 | 0.75276 | 0.80370 |
| 4 | 0.18170 | 0.22272 | 0.37288 | 0.54344 | 0.80984 | 1.03694 |
| 5 | 0.18326 | 0.26270 | 0.38484 | 0.53210 | 0.69868 | 1.12218 |
| 6 | 0.13962 | 0.19992 | 0.28180 | 0.38078 | 0.53392 | 0.95172 |
| 7 | -0.04110 | -0.01372 | 0.04464 | 0.11368 | 0.18098 | 0.18242 |
| 8 | | 0.01324 | 0.04036 | 0.07058 | 0.10916 | 0.02976 |

Na segunda hora, também existe uma diferença estatisticamente significativa e quando comparada com a primeira hora, significativamente maior. O $P=0,0003$ trata-se de um valor altamente significativo (tabela 5).

Tabela 5- Sumário ANOVA 2aHora

| | |
|---|--------|
| ANOVA summary | |
| F | 6.003 |
| P value | 0.0003 |
| P value summary | *** |
| Significant diff. among means ($P < 0.05$)? | Yes |
| R squared | 0.4227 |

Nota: $P > 0,05$ = não significativo (“ns”); $0,05 - 0,01$ = significativo (“**”); $0,01 - 0,001$ = bastante significativo (“***”) e $< 0,001$ = altamente significativo (“****”).

Existe também diferenças notáveis entre a C1 (concentração de $7,90 \times 10^6$ spz) e a C6 (60×10^6 spz), com uma maior diferença significativa. Entre a C2 ($11,8 \times$

10^6 spz) e a C6 (60×10^6 spz), e por fim a C3 (concentração $17,7 \times 10^6$ spz) e a C6, (figura 28).

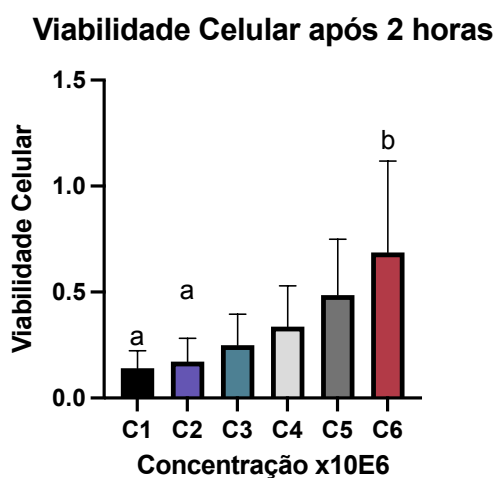


Figura 28-Viabilidade Celular após 2 horas de incubação

Viabilidade celular após 1 hora de incubação, com um grau bastante significativo (**). P value= 0,0049 entre os valores médios de cada garanhão. A concentração utilizada que apresenta maior viabilidade é a C5 (40×10^6 spz),

Após normalização dos valores, como descrito no ponto 3.6, análise estatística, foi realizada uma tabela com todos os valores médios obtidos de cada garanhão, para cada concentração na hora 3 (tabela 6).

Tabela 6- Resultados obtidos após normalização dos valores por concentração na hora 3

| | Group A | Group B | Group C | Group D | Group E | Group F |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
| 1 | 0.14644 | 0.20656 | 0.20868 | 0.25280 | 0.49930 | 1.00358 |
| 2 | 0.18126 | 0.23724 | 0.26558 | 0.29462 | 0.35782 | 0.40310 |
| 3 | 0.21542 | 0.29410 | 0.45254 | 0.58652 | 0.78892 | 0.83272 |
| 4 | 0.21086 | 0.25908 | 0.42070 | 0.59100 | 0.84718 | 1.05410 |
| 5 | 0.20054 | 0.28852 | 0.42504 | 0.58056 | 0.74792 | 1.14614 |
| 6 | 0.16892 | 0.24040 | 0.33584 | 0.44516 | 0.59926 | 0.99330 |
| 7 | 0.08104 | 0.16612 | 0.30314 | 0.48458 | 0.63722 | 0.62552 |
| 8 | | 0.08956 | 0.14836 | 0.23098 | 0.33190 | 0.30064 |

Após a terceira e última hora de incubação, observou-se uma diferença altamente significativa, quando comparado com as anteriores, o valor de P é menor que 0,0001, tabela 7.

Tabela 7- Sumário ANOVA 3ª Hora

| ANOVA summary | |
|---|---------|
| F | 14.39 |
| P value | <0.0001 |
| P value summary | **** |
| Significant diff. among means (P < 0.05)? | Yes |
| R squared | 0.6369 |

Nota: P > 0,05 = não significativo (“ns”); 0,05 - 0,01 = significativo (“**”); 0,01 - 0,001 = bastante significativo (“***”) e < 0,001 = altamente significativo (“****”).

Existem diversas diferenças significativas em praticamente todas as concentrações, mas as diferenças estatisticamente mais importantes existem entre a concentração C1 (concentração de $7,90 \times 10^6$ spz) e a concentração C6 (60×10^6 spz), a concentração C2 ($11,8 \times 10^6$ spz) e C6 e por fim entre C3 (concentração $17,7 \times 10^6$ spz) com a C6 (figura 29).

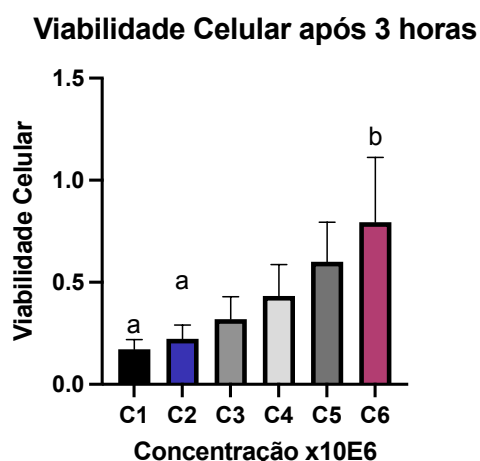


Figura 29- Viabilidade Celular após 3 horas de incubação

Viabilidade celular após 3 horas de incubação, com um grau altamente significativo (****). P value <0,0001 entre os valores médios de cada ganhão. A concentração utilizada que apresenta maior viabilidade é a C6 (60×10^6 spz),

Como é possível observar pelos gráficos obtidos, a hora que apresentou maior viabilidade celular foi a terceira, após três horas na incubadora. Reunidos os meios para uma boa proliferação celular, esta foi aumentando com o passar do tempo. Esta última hora de observação mostrou também as maiores diferenças estatisticamente significativa entre as concentrações utilizadas, sendo que a concentração C6 (60×10^6 spz) apresenta maior viabilidade celular em todas as horas, com maior valor na última.

Após normalização dos valores, como descrito no ponto 3.6, análise estatística, foi realizada uma tabela com todos os valores médios obtidos de cada ganhão, separado por concentrações de células para cada hora de observação, ou seja, para as três horas (Figura 30).

Concentração $7,90 \times 10^6$

| | Group A | Group B | Group C |
|---|----------|----------|---------|
| | 1H | 2H | 3H |
| 1 | 0.12324 | 0.14294 | 0.14644 |
| 2 | 0.03676 | 0.18388 | 0.18126 |
| 3 | 0.16320 | 0.19024 | 0.21542 |
| 4 | 0.16002 | 0.18170 | 0.21086 |
| 5 | 0.19514 | 0.18326 | 0.20054 |
| 6 | 0.11926 | 0.13962 | 0.16892 |
| 7 | -0.39750 | -0.04110 | 0.08104 |

Concentração $11,8 \times 10^6$

| | Group A | Group B | Group C |
|---|---------|----------|---------|
| | 1H | 2H | 3H |
| 1 | 0.17048 | 0.19088 | 0.20656 |
| 2 | 0.05474 | 0.23662 | 0.23724 |
| 3 | 0.22446 | 0.26350 | 0.29410 |
| 4 | 0.19136 | 0.22272 | 0.25908 |
| 5 | 0.26470 | 0.26270 | 0.28852 |
| 6 | 0.17116 | 0.19992 | 0.24040 |
| 7 | 0.16294 | -0.01372 | 0.16612 |
| 8 | 0.11834 | 0.01324 | 0.08956 |

Concentração $17,7 \times 10^6$

| | Group A | Group B | Group C |
|---|---------|---------|---------|
| | 1H | 2H | 3H |
| 1 | 0.16208 | 0.19756 | 0.20868 |
| 2 | 0.06492 | 0.25406 | 0.26558 |
| 3 | 0.36290 | 0.41606 | 0.45254 |
| 4 | 0.33006 | 0.37288 | 0.42070 |
| 5 | 0.37606 | 0.38484 | 0.42504 |
| 6 | 0.24538 | 0.28180 | 0.33584 |
| 7 | 0.28274 | 0.04464 | 0.30314 |
| 8 | 0.16118 | 0.04036 | 0.14836 |

Concentração $26,6 \times 10^6$

| | Group A | Group B | Group C |
|---|---------|---------|---------|
| | 1H | 2H | 3H |
| 1 | 0.19332 | 0.23732 | 0.25280 |
| 2 | 0.14862 | 0.27188 | 0.29462 |
| 3 | 0.48012 | 0.54308 | 0.58652 |
| 4 | 0.48222 | 0.54344 | 0.59100 |
| 5 | 0.48742 | 0.53210 | 0.58056 |
| 6 | 0.33516 | 0.38078 | 0.44516 |
| 7 | 0.44684 | 0.11368 | 0.48458 |
| 8 | 0.23162 | 0.07058 | 0.23098 |

Concentração 40×10^6

| | Group A | Group B | Group C |
|---|---------|---------|---------|
| | 1H | 2H | 3H |
| 1 | 0.42478 | 0.48140 | 0.49930 |
| 2 | 0.14862 | 0.31624 | 0.35782 |
| 3 | 0.68334 | 0.75276 | 0.78892 |
| 4 | 0.73906 | 0.80984 | 0.84718 |
| 5 | 0.64590 | 0.69868 | 0.74792 |
| 6 | 0.47492 | 0.53392 | 0.59926 |
| 7 | 0.61196 | 0.18098 | 0.63722 |
| 8 | 0.32380 | 0.10916 | 0.33190 |

Concentração 60×10^6

| | Group A | Group B | Group C |
|---|----------|---------|---------|
| | 1H | 2H | 3H |
| 1 | 0.94300 | 1.01758 | 1.00358 |
| 2 | -0.42900 | 0.35468 | 0.40310 |
| 3 | 0.45450 | 0.80370 | 0.83272 |
| 4 | 0.09608 | 1.03694 | 1.05410 |
| 5 | 1.05220 | 1.12218 | 1.14614 |
| 6 | 0.87080 | 0.95172 | 0.99330 |
| 7 | 0.62980 | 0.18242 | 0.62552 |

Figura 30-Layout com as tabelas de cada concentração, para as três horas de observação.

Após analisar quais as concentrações que apresentavam maior diferença significativa e conseqüentemente, maior viabilidade celular, analisou-se por cada concentração qual a hora que apresenta maior viabilidade celular, mas sem diferenças estatisticamente significativas. De uma forma geral em todas as concentrações realizadas, a 3ª hora apresenta uma maior viabilidade espermática, quando comparada com a 1ª e 2ª hora de incubadora.

Os maiores valores são observados na concentração de 60×10^6 spz e 40×10^6 spz por poço, as maiores concentrações também. Após as diluições seriadas de 1/1,5, a viabilidade celular também não foi significativa. Portanto, é possível afirmar que a concentração menos viável será a concentração de $7,90 \times 10^6$ spz por poço, figura 31.

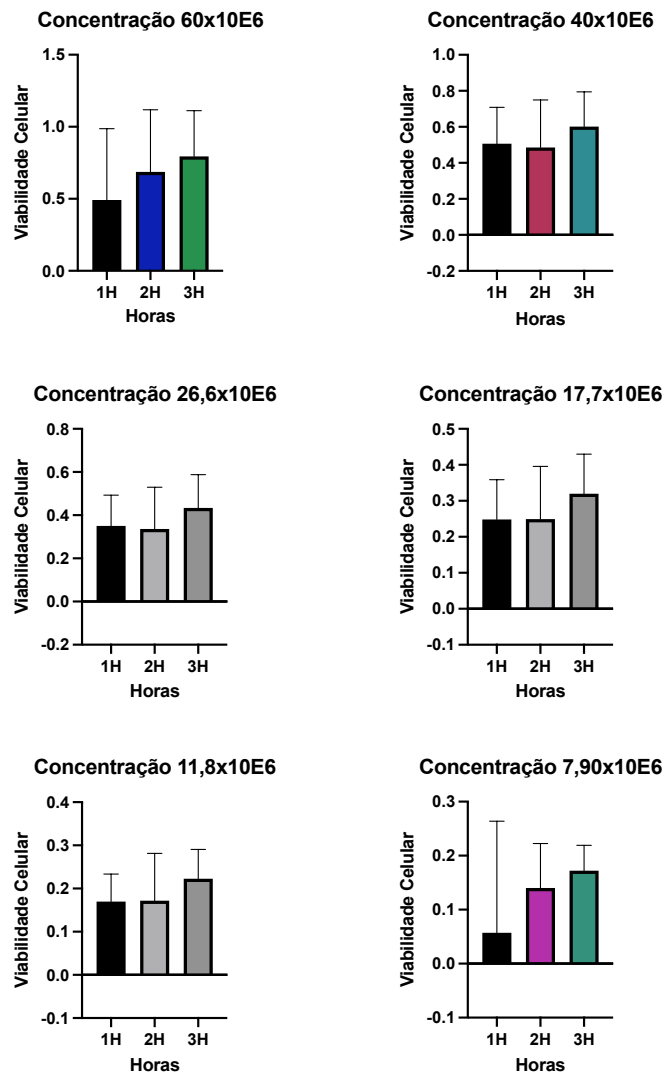


Figura 31-Diferenças obtidas em cada concentração, nas 3 horas de observação.

Análise por cada concentração, sem diferenças estatisticamente significativas. 3ª hora de incubação com maior viabilidade espermática. Concentração C5 (40×10^6 spz) e C6 (40×10^6 spz) com maior valor de viabilidade.

O reagente usado para a determinação da viabilidade celular, o PrestoBlue, que apesar de ser relativamente recente no mercado e não existir muita bibliografia disponível sobre o mesmo, é reconhecido como um reagente de ação rápida, requerendo apenas um período de incubação de 10 minutos, quando comparado com um reagente do mesmo tipo, como o Alamar Blue, que necessita num máximo de 4 horas. Embora apresente algumas limitações, como por exemplo a sensibilidade à luz e o tempo variado para que desenvolva cor, que está diretamente relacionado com as taxas metabólicas das células na cultura, o PrestoBlue demonstra ser um grande potencial como indicador de viabilidade celular (Boncler, 2013).

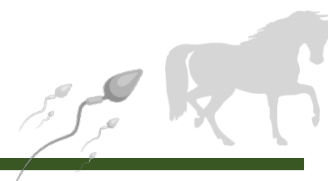
Apesar de ter um período curto de incubação, a maior viabilidade atingida era visível após as três horas de incubação em todas as concentrações testadas, mas, quanto maior foi a concentração de células por poço maior viabilidade celular foi atingida.

No entanto, existe uma desvantagem no armazenamento de placas com células em teste. A atividade metabólica das células reduz a resazurina durante o processo de armazenamento. Com um grande número de células e armazenamento prolongado, a super-redução da resazurina pode ocorrer e produzir um resultado incolor e consequentemente, não fluorescente (Xu et al, 2015).

Abdelkader (2013) realizou um estudo em abelhas, utilizando PrestoBlue como indicador de viabilidade celular na qualidade do sêmen destes insetos e concluiu que este reagente pode ser uma boa ferramenta a ser utilizada quando se fala em estudos de viabilidade espermática, pois é um reagente de ação rápida. Neste estudo de Abdelkader (2013), a microplaca foi mantida no escuro durante 10 minutos.

Akcha et al (2011), realizou um estudo que se concentrou nos efeitos genotóxicos de dois herbicidas utilizados, em gametas e embriões de ostras e avaliou a viabilidade espermática das mesmas com o reagente PrestoBlue. O autor afirma que a viabilidade espermática também pode ser avaliada medindo a sua capacidade de reduzir a resazurina, podendo assim comprovar que nenhum dos herbicidas utilizados teve impacto negativo na viabilidade das células espermáticas.

5. Conclusão



Com o avançar dos tempos modernos, o recurso à inseminação artificial em equinos também tem aumentado. Como tal, é importante recorrer a testes confiáveis para determinar a qualidade do sémen. A capacidade de determinar com algum rigor a qualidade do sémen irá permitir a previsão da fertilidade esperada de determinado garanhão. A realização deste trabalho permitiu-me a aquisição de novas competências e o aperfeiçoamento de outras:

- Recolha de sémen de equinos
- Avaliação sumária de sémen – espermograma;
- Preparação de sémen refrigerado;
- Recolha de sémen de epidídimo;
- Congelamento de sémen;
- Avaliação da viabilidade celular pela técnica do PrestoBlue.

Além disso, através deste trabalho foi ainda possível concluir:

- A congelação de sémen a partir do epidídimo equino parece ser de facto uma técnica com bastante utilidade para se recuperar potencial genético de equinos, nos quais não foi possível essa intervenção previamente.
- A castração química apesar de induzir uma redução do volume escrotal e uma melhoria comportamental nos garanhões, possivelmente não compromete definitivamente o seu potencial reprodutivo.
- O *PrestoBlue* aparenta ser uma técnica fiável para avaliar a viabilidade de sémen equino em condições de refrigeração e portanto, poderá vir a ser bastante útil em futuros ensaios de viabilidade celular, sendo que a avaliação da viabilidade celular do sémen equino refrigerado é, e continuará a ser um ponto importante na utilização da técnica da IA em países mais remotos e onde não seja possível a expedição e entrega de encomendas num curto espaço de tempo.

6. Referências Bibliográficas



Ben Abdelkader, F., Kairo, G., Tchamitchian, S., Cousin, M., Senechal, J., Crauser, D., ... Brunet, J.-L. (2013). Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie*, 45(2), 215–223. DOI:10.1007/s13592-013-0240-7

Abou-Khalil, N.S., Ali, M.F., Ali, M.M. et al. Surgical castration versus chemical castration in donkeys: response of stress, lipid profile and redox potential biomarkers. *BMC Vet Res* 16, 310 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02530-0>

Aidar, N. B. (2013). *Criopreservação de Sêmen Equino*. (Monografia). UnB-Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Veterinária. Brasília.

Akcha, F., Spagnol, C., & Rouxel, J. (2012). Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 106-107, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.018>

Antunes, I. C. (2017). *A utilização do Improvac na Imunocastração de Frangos: Efeito de diferentes protocolos de Imunocastração na Composição e Qualidade da Carne*. (Dissertação de mestrado). Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.

Bettencourt, e. M. V., Antunes, L., Gonçalves, A. R., Branco, S., Rocha, A. (2018) – Reprodução em Equinos- Manual Prático. ISBN: 978-989-8550-75-0

Bergstein-Galan, T.G. et al. Viability of ovine spermatozoa collected from epididymides stored at 18°-25°C for 48 hours post mortem. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* [online]. 2018, v. 70, n. 04 [Accessed 19 January 2022] , pp. 1023-1028. Available from: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10058>

Boncler, M., Różalski, M., Krajewska, U., Podsędek, A., & Watala, C. (2014). Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-

proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 69(1), 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.09.003>

Brito, Leonardo. (2007). Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 6. 249-264. 10.1053/j.ctep.2007.09.004.

Bruemmer, J. E. (2006). Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 22(3), 677–682.
doi:10.1016/j.cveq.2006.08.007

Como é realizada a contagem de células? (21 de Dezembro de 2017). Obtido de Kasvi:
<https://kasvi.com.br/como-e-realizada-contagem-de-celulas/>

Dowsett, K. F., & Knott, L. M. (1996). The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology*, 46(3), 397–412. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)00162-8](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)00162-8)

Felício, L. C., Pereira, J. F., Penso, W. F., & Penso, W. F. (maio.-ago. de 2017). Orquiectomia de Equinos a Campo- Relato de Caso. *Biociências, Biotecnologia e Saúde*, pp. 108-109.

Gamboa, S., Machado-Faria, M., & Ramalho-Santos, J. (2009). Seminal traits, suitability for semen preservation and fertility in the native Portuguese horse breeds Puro Sangue Lusitano and Sorraia: Implications for stallion classification and assisted reproduction. *Animal reproduction science*, 113(1-4), 102–113.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.06.004>

Guimarães T, Lopes G , Ferreira P, Leal I, Rocha A. 2012. Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. *Animal Reproduction Science*, 136: 85-89)

Ibrahim, A., Ali, M.M., Abou-Khalil, N.S. *et al.* Evaluation of chemical castration with calcium chloride versus surgical castration in donkeys: testosterone as an endpoint marker. *BMC Vet Res* 12, 46 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0670-3>

Invitrogen, “PrestoBlue cell viability reagent protocol,” Product information sheet by Life Technologies, 2012, http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/PrestoBlue_Reagent_PIS_15Oct10.pdf.

Jana, K., & Samanta, P. K. (2006). Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization in adult albino rats. *Contraception*, 73(3), 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2005.07.011>

Jana, K., Samanta, P. K., & Ghosh, D. (2002). Dose-dependent response to an intratesticular injection of calcium chloride for induction of chemosterilization in adult albino rats. *Veterinary research communications*, 26(8), 651–673. <https://doi.org/10.1023/a:1020976905746>

Jana, K., Samanta, P. K., & Ghosh, D. (2005). Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization of male Black Bengal goats (*Capra hircus*): a dose-dependent study. *Animal reproduction science*, 86(1-2), 89–108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.021>

Lall, N., Henley-Smith, C. J., De Canha, M. N., Oosthuizen, C. B., & Berrington, D. (2013). Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. *International journal of microbiology*, 2013, 420601. <https://doi.org/10.1155/2013/420601>

Leoci, R., Aiudi, G., Cicirelli, V., Brent, L., Iaria, C., & Lacalandra, G. M. (2019). Effects of intratesticular vs intraepididymal calcium chloride sterilant on testicular morphology and fertility in dogs. *Theriogenology*, 127, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.006>

Loomis, P. R., & Graham, J. K. (2008). Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal reproduction science*, 105(1-2), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.010>

Love, C. C. (2016). Modern techniques for semen evaluation. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 32(3), 531-546. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.006>

Love, C. C., Thompson, J. A., Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Blanchard, T. L., Lowry, V. K., & Varner, D. D. (2003). Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*, 60(6), 1127–1138. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00122-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00122-5)

Melo-Maciel, M. A., Salmito-Vanderley, C. B., Leite, L. V., Oliveira, C. E., Oliveira, M. S., Lopes, J. T., & Nunes, J. F. (27 de Junho de 2012). Métodos de Avaliação da Qualidade do Sêmen Criopreservado de Characiformes Brasileiros. *Ciência Animal*, pp. 269-283.

Monteiro, G. A., Papa, F. O., Zahn, F. S., Dellaqua, J. A., Jr, Melo, C. M., Maziero, R. R., Avanzi, B. R., Alvarenga, M. A., & Guasti, P. N. (2011). Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal reproduction science*, 127(3-4), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.08.002>

Monteiro, G. A., & Sancler-Silva, Y. F. R. (2018). Equine Semen Biotechnology. *Reproduction Biotechnology in Farm Animals*, 223.

Morris L. (2002). The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology* 58, 643.

Nowak A, Zakłós-Szyda M, Żyżelewicz D, Koszucka A, Motyl I. Acrylamide Decreases Cell Viability, and Provides Oxidative Stress, DNA Damage, and Apoptosis in Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Caco-2. *Molecules*. 2020; 25(2):368. <https://doi.org/10.3390/molecules25020368>

Papa, F. O., Melo, C. M., Fioratti, E. G., Dell'aqua, J. A., Jr, Zahn, F. S., & Alvarenga, M. A. (2008). Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal reproduction science*, 107(3-4), 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.003>

Peña, F. J., Ball, B. A., & Squires, E. L. (2018). A New Method for Evaluating Stallion Sperm Viability and Mitochondrial Membrane Potential in Fixed Semen Samples. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 94(2), 302–311. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21506>

Oliveira, Valquíria & Morelli, Karine & Coutinho, Giancarlo. (2019). Princípios básicos da manipulação, análise, e envio do sêmen equino. *Pubvet*. 13. 1-9. [10.31533/pubvet.v13n10a430.1-9](https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n10a430.1-9).

Otoni, M. H. F. (2017). *Indução de fluorescência interferente em culturas de linfócitos humanos pelo tratamento com três extratos vegetais* (Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal dos Valds de Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

Rebello, G. B., Costa, J. C., Gonçalves, M. B., & Silva, R. C. (2017). *Espectrofotometria UV-VIS*. Belém-PA: Universidade Federal do Pará- Instituto de Ciências Exatas e Naturais .

Rodrigues, P. R. (2019). *Clínica e Cirurgia de Equinos* . (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de Évora- Escola de Ciências e Tecnologia. Évora.

Rodrigues, A. (21 de Junho de 2018). *Puro Sangue Lusitano. O cavalo mais belo do mundo que vale um milhão*. Obtido de Rádio Renascença: <https://rr.sapo.pt/artigo/o-mundo-em-tres-dimensoes/2018/06/21/puro-sangue-lusitano-o-cavalo-mais-belo-do-mundo-que-vale-um-milhao/116526/>

Roels, K., Leemans, B., Ververs, C., Govaere, J., Hoogewijs, M., & Van Soom, A. (2014). Collection and freezing of equine epididymal spermatozoa. *VLAAMS DIERGENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT*, 83(6), 321–325.

Samper, J., Gomez, I., Sanchez, R. (2009) - Artificial Insemination with Frozen Semen. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Saunders Elsevier: 2a edição. p. 175-183.)

Samper, J. (2009) - Artificial Insemination with Fresh and Cooled Semen. Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Saunders Elsevier: 2a edição. p. 165-174.

Sepulveda, M. G., & Pequito, M. (31 de Janeiro de 2017). *Maneio Reprodutivo de Equinos*. Obtido de Equitação Magazine : <https://www.equitacao.com/artigos/38/10/maneio-reprodutivo-de-equinos>

Silva, A. T. (2009). *Hipologia- Guia para o Estudo do Cavalo*. Lisboa: Lidel-Edições técnicas, lda.

Spermac stain kit. (s.d.). Obtido de Minitube: <https://www.minitube.com/catalog/en/spermac-stain-kit-p1747/>

Soares, A. S. (2009). *Estudo de uma Técnica de Castração de Cavalos por Laparoscopia* (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa- Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa.

Xu, M., McCanna, D. J., & Sivak, J. G. (2015). Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 71, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.11.003>

7. Anexos



7.1. Anexo nº 1

BotuCrio®

Intended Use: summary and explanation

BotuCrio® is a freezing extender optimized for freezing of equine sperm. It is suitable for both fresh as well as for **EquiPure™** treated sperm.

Components

| | |
|----------------------|------------------|
| Egg yolk | Excipients |
| Carbo hydrates | Cryo protectants |
| Amino acids | Ultra Pure Water |
| Preservatives | |
| Gentamicin (0.5 g/l) | |

Bottles and screw caps are M.E.A. tested

Storage and Stability

The temperature of the product should be below +10°C upon arrival. If not to be used immediately, store at -20°C. After opening, store at 2-8°C for up to 3 days.

Precautions and Warnings

- Do not use any solution which shows evidence of bacterial contamination or if screw cork accidentally comes in contact with unsterile surfaces
- Do not use contents if tamper-evident seal is broken

Ordering Information

| Description | Volume | Article No. |
|--------------------------|--------|-------------|
| BotuCrio® | 25mL* | BTC-025 |
| BotuSemen® (no water) | 100mL | BTSP-100 |
| BotuSemen® (incl. water) | 100mL | BTS-100 |
| SpermFilter® | 1 pcs | BTF-001 |
| EquiPure™ | 100mL | EPB-100 |

*minimum order 10 x 25mL

For further technical information or assistance, please contact your distributor or the manufacturer.



www.nidacon.com

Manufacturer:

Nidacon, Flöjelbergsgatan 16 B, SE-431 37 Mölndal, Sweden
Tel: +46-31-703 06 30, Fax: +46-31-40 54 15
E-mail: contact@nidacon.com, www.nidacon.com

Procedures for using BotuCrio®

1. Thaw BotuCrio in 37°C water bath.
2. Shake well.
3. Let the BotuCrio rest for 5 minutes, then shake again before use.

Freezing EquiPure™ treated sperm

1. Process the sperm according to the instructions for EquiPure™
2. Transfer the pellet to a new tube containing BotuCrio®
3. Continue from instruction no. 3 below. Be careful not to dilute the sperm pellet too much. The ratio should be 1/3 sperm pellet and 2/3 BotuCrio®

Freezing untreated sperm

1. Dilute raw semen 1:1 with BotuSemen® (room temperature)
2. Concentrate sperm
 - a. by using BotuPharma SpermFilter® or;
 - b. by using a cushion-Centrifugation for 10 minutes (room temperature) at 500 x g and then remove the supernatant
3. Resuspend (room temperature) with sufficient amount of BotuCrio® to achieve the number of straws to be frozen. (The final concentration should be 200-400 million per ml depending on the number of straws, usually 4-6 per dose. The total number of sperm per dose should be 250 million motile and normal sperm after thawing)
4. Load the 0.5 ml straws (room temperature)
5. Place the straws directly at 4-6°C for 20-30 minutes (refrigerator)
6. Freeze in Nitrogen vapor (3-6 cm above the surface) for 15-20 minutes or if machine is used: 20-40°C per minute until minus 120°C
7. Plunge in Liquid Nitrogen
8. Thaw in water bath at 46°C for 20 seconds or 37°C for 1 minute.
9. Check survival 10 minutes after thawing



INS-BTC-XI/08

PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent

Catalog Numbers P50200 and P50201

Pub. No. MAN0018371 Rev. B.0

WARNING! Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from thermofisher.com/support.

Contents and storage

Sufficient material is supplied for 1,000 × 96-well assays (Cat. No. P50200) or 10,000 × 96-well assays (Cat. No. P50201) based on the protocol that is described in this document.

| Component | Cat. No. P50200 | Cat. No. P50201 | Storage ^[1] |
|---------------------------------------|-----------------|------------------|--|
| PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent | 1 × 25 mL (10X) | 1 × 100 mL (10X) | <ul style="list-style-type: none"> Store at 2–8°C. Protect from light. |

^[1] When stored as directed, the kit is stable for 6 months from date of receipt.

- Fluorescence excitation and emission ranges: 540–570 nm and 580–610 nm.
Fluorescence excitation/emission maxima: 560/590 nm
- Absorbance: Monitor the absorbance of the cell viability reagent at 570 nm, using 600 nm as a reference wavelength (normalized to the 600-nm value).

Product description

Measuring changes in cell viability is a fundamental method for evaluating cell health, determining genotoxicity, and evaluating anti-cancer drugs. Cell health can be monitored by detecting changes in several key indicators. These include changes to plasma membrane integrity, DNA synthesis, DNA content, enzyme activity, presence of ATP, and cellular reducing environment.

Monitoring changes to the cellular reducing environment or metabolic activity by using resazurin-based reagents is a well-established and reliable indicator of cell viability or death. On entering live cells, the cellular reducing environment reduces resazurin to resorufin, a compound that is red and highly fluorescent. Viable cells continuously convert resazurin to resorufin, increasing the overall fluorescence and color of the media surrounding the cells. Also, the conversion of resazurin to resorufin results in a pronounced color change, therefore cell viability can be detected using absorbance-based plate readers.

As a consequence of the synthesis and manufacturing processes, all resazurin-based reagents contain a detectable amount of highly fluorescent resorufin contamination. The amount of the resorufin contamination can vary greatly between sources of the material and manufacturing conditions. The varying amounts of resorufin contribute to differences in detectable background fluorescence. More importantly, the contaminating resorufin and the resulting higher background signal significantly reduces the signal to background ratio and dynamic range of the assay.

To improve the performance of the resazurin-based reagents, an innovative process was developed and on implementation removes the contaminating resorufin resulting in highly purified resazurin. To create PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent, the highly purified resazurin has been formulated with a proprietary buffering system.

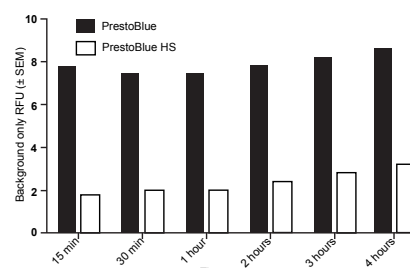


Figure 1 Reduction of background fluorescence displayed with PrestoBlue™ HS reagent compared to PrestoBlue™ reagent

100 µL of complete growth media was added to several wells of a 96-well plate. 10 µL of either PrestoBlue™ HS or PrestoBlue™ reagent was added to the wells containing complete growth media and the fluorescence was detected at various times post-addition. The PrestoBlue™ HS consistently displays a >50% reduction in background fluorescence.

On comparison, PrestoBlue™ HS reagent displays a significant reduction in background fluorescence (Figure 1) and a greatly increased signal to background ratio (Figure 2).

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

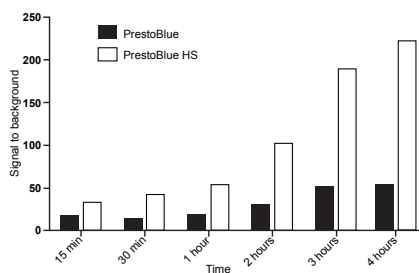


Figure 2 PrestoBlue™ HS displays a significant increase in the signal to background ratio

A549 cells were seeded at 5,000 cell/well and incubated overnight to allow for attachment. 10 µL of PrestoBlue™ HS or PrestoBlue™ reagent was added to the wells containing 100 µL of complete growth media and the attached cells. At various time points post-addition the fluorescence was measured. The results show the >100% increase in the signal to background ratio for the PrestoBlue™ HS versus the PrestoBlue™ reagent.

Unlike other resazurin-based reagents, the PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent has been formulated with a proprietary buffering system that resulted in a reagent with a physiological pH range optimal for the fast determination of mammalian cell viability. Cell viability can be detected with a short 10-minute incubation with the PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent.

The PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent is a complete add and read, nontoxic reagent that does not require cell lysis. The highly purified resazurin that is used for PrestoBlue™ HS results in a reagent with a >50% decrease in background fluorescence and a >100% increase in the signal to background ratio. Since no lysis is required the diluted PrestoBlue™ HS solution can be removed, then replaced with complete growth media and the cells cultured further.

Seed and treat cells

- One day before your experiment, seed cells into a 96-well plate containing 100 µL/well of cell culture medium.
Note: If you are using a 384-well plate, use 50 µL/well of cell culture medium.
- Incubate the cells overnight in a 37°C incubator using the appropriate CO₂ percentage.
- (Optional) Treat cells with the test compound 24–72 hours before performing the viability with the cell viability reagent.

Determine cell viability

- Warm the cell viability reagent to room temperature before use.
- Add 1/10th volume of cell viability reagent directly to cells in culture medium according to the following table.

| Format | Volume of cells + medium | Volume of 10X cell viability reagent to add |
|----------------|--------------------------|---|
| Cuvette | 900 µL | 100 µL |
| 96-well plate | 90 µL | 10 µL |
| 384-well plate | 36 µL | 4 µL |

- Incubate for ≥10 minutes at 37°C in a cell culture incubator, **protected from direct light**.

Note: Longer incubation times increase the sensitivity of detection. We recommend using up to a 3-hour incubation time to increase sensitivity. As this is a live cell assay, readings can be taken at multiple time points.

- Record results using the following fluorescence or absorbance values:
 - Fluorescence:** Read fluorescence using a fluorescence excitation wavelength of 560 nm (excitation range is 540–570 nm) and an emission of 590 nm (emission range is 580–610-nm).
 - Absorbance:** Monitor the absorbance of reagent at 570 nm, using 600 nm as a reference wavelength (normalized to the 600-nm value).
- (Optional) Add 50 µL of 3% SDS directly to 100 µL of cells in cell viability reagent to stop the reaction.

Note: Assay plates or tubes can be wrapped in foil, stored at 4°C, then read in 1–3 days without affecting the fluorescence or absorbance values.

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.



Life Technologies Corporation | 29851 Willow Creek | Eugene, OR 97402

For descriptions of symbols on product labels or product documents, go to thermofisher.com/symbols-definition.

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2019 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion
thermofisher.com

7 January 2019

ThermoFisher
SCIENTIFIC

7.3. Anexo nº 3

- 11 de Maio: Puro Sangue Lusitano #4 – 6 anos

1º- Concentração de Espermatozoides:

Ao observar a câmara de Neubauer ao microscópio, contaram-se 311 espermatozoides.

$$311 : 6 = 51,83 \text{ spz}'s$$

$$51,83 \times 16 \times 10 \times 10^4 = 829,28 \times 10^5 =$$
$$[] = 82,93 \times 10^6 \text{ spz}'s / \text{ml}$$

2ª- Número total de spz por ejaculado:

O volume total do ejaculado foi de 20 ml.

$$[] \times \text{ml do ejaculado} = 82,93 \times 10^6 \times 20 = 1658,6 \times 10^6$$
$$= 16,59 \times 10^8 \text{ células /ejaculado}$$

3º Plaqueamento:

Concentração Inicial: $C_i = 82,93 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Concentração final: $C_f = 60 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Volume final: $V_f = 2 \text{ ml}$

Volume inicial: $v_i = ??$

$$C_i v_i = C_f V_f \approx 82,93 \times 10^6 \times v_i = 60 \times 2 \approx 82,93 \times 10^6 v_i = 120 \times 10^6 \approx$$

$$\approx Vi = \frac{120}{82,93} = 1,45 \text{ ml de semen para o plaqueamento}$$

$$2 \text{ ml} - 1,45 \text{ semen} = 0,55 \text{ ml de meio}$$

- 13 de Maio: Puro Sangue Lusitano #5 – 15 anos

1º- Concentração de Espermatozoides:

Ao observar a câmara de Neubauer ao microscópio, contaram-se 120 espermatozoides.

$$120 : 6 = 20 \text{ spz}'s$$

$$20 \times 16 \times 5 \times 10^4 =$$

$$[] = 16,00 \times 10^6 \text{ spz}'s / \text{ml}$$

2ª- Número total de spz por ejaculado:

O volume total do ejaculado foi de 55 ml.

$$\begin{aligned} [] \times \text{ml do ejaculado} &= 16,00 \times 10^6 \times 55 = 800 \times 10^6 \\ &= 8,8 \times 10^8 \text{ células /ejaculado} \end{aligned}$$

3º Plaqueamento:

Nota: Como a concentração inicial é menor que os $60 \times 10^6 \text{ spz/ml}$, deve-se considerar os 6 ml nos cálculos.

Concentração Inicial: $C_i = 16 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Concentração final: $C_f = 60 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Volume final: $V_f = ??$

Volume inicial: $v_i = 6 \text{ ml}$

$$C_i v_i = C_f V_f \approx 16 \times 10^6 \times 6 = 60 \times 10^6 \times v_f \approx$$

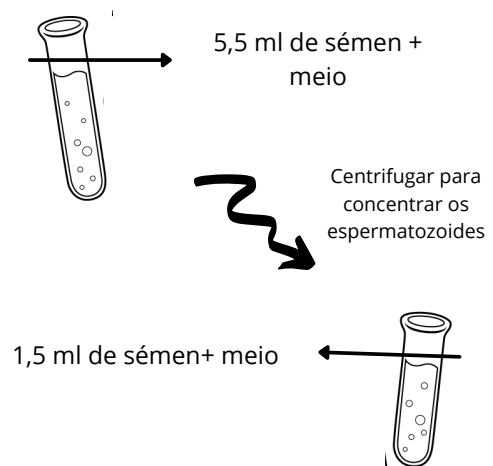
$$\approx V_f = \frac{96}{60} = 1,6 \text{ ml de semen para o plaqueamento}$$

-Número de espermatozoides em 6ml:

$$16 \times 10^6 \times 6 = 96 \times 10^6 \text{ spz em 6 ml}$$

- Para confirmar se existem células suficientes para a placa:

$$1,5 \text{ ml} \times 60 \times 10^6 = 96 \times 10^6$$



- 18 de Maio: WB #1 – 5 anos

1º- Concentração de Espermatozoides:

Ao observar a câmara de Neubauer ao microscópio, contaram-se 426 espermatozoides.

$$426 : 6 = 71 \text{ spz}'s$$

$$71 \times 16 \times 10 \times 10^4 = 1136,6 \times 10^5 =$$

$$[] = 113,6 \times 10^6 \text{ spz}'s / \text{ml}$$

2ª- Número total de spz por ejaculado:

O volume total do ejaculado foi de 25 ml.

$$\begin{aligned} [] \times \text{ml do ejaculado} &= 113,6 \times 10^6 \times 25 = 2840 \times 10^6 \\ &= 28,40 \times 10^8 \text{ células /ejaculado} \end{aligned}$$

3º Plaqueamento:

Concentração Inicial: $C_i = 113,6 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Concentração final: $C_f = 60 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Volume final: $V_f = 2 \text{ ml}$

Volume inicial: $v_i = ??$

$$C_i v_i = C_f V_f \approx 113,6 \times 10^6 \times v_i = 60 \times 2 \approx$$

$$\approx v_i = \frac{120}{113,6} = 1,06 \text{ ml de semen para o plaqueamento}$$

$$2 \text{ ml} - 1,06 \text{ semen} = 0,94 \text{ ml de meio}$$

18 de Maio: WB #2 – 8 anos

1º- Concentração de Espermatozoides:

Ao observar a câmara de Neubauer ao microscópio, contaram-se 350 espermatozoides.

$$350 : 6 = 58,33 \text{ spz}'s$$

$$58,33 \times 16 \times 10 \times 10^4 = 933,28 \times 10^5 =$$
$$[] = 93,33 \times 10^6 \text{ spz}'s / \text{ml}$$

2ª- Número total de spz por ejaculado:

O volume total do ejaculado foi de 50 ml.

$$[] \times \text{ml do ejaculado} = 93,33 \times 10^6 \times 50 = 4666,5 \times 10^6$$
$$= 46,665 \times 10^8 \text{ células /ejaculado}$$

3º Plaqueamento:

Concentração Inicial: $C_i = 93,33 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Concentração final: $C_f = 60 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Volume final: $V_f = 2 \text{ ml}$

Volume inicial: $v_i = ??$

$$C_i v_i = C_f V_f \approx 93,33 \times 10^6 \times v_i = 60 \times 2 \approx$$
$$\approx v_i = \frac{120}{93,33} = 1,29 \text{ ml de semen para o plaqueamento}$$

$$2 \text{ ml} - 1,29 \text{ semen} = 0,71 \text{ ml de meio}$$

6 de Julho: Puro Sangue Lusitano #6 – 17 anos

1º- Concentração de Espermatozoides:

Ao observar a câmara de Neubauer ao microscópio, contaram-se 758 espermatozoides.

$$758 : 6 = 126,3 \text{ spz's}$$

$$126,3 \times 16 \times 10 \times 10^4 = 2016 \times 10^5 =$$
$$[] = 201,6 \times 10^6 \text{ spz's / ml}$$

2ª- Número total de spz por ejaculado:

O volume total do ejaculado foi de 16 ml.

$$[] \times \text{ml do ejaculado} = 201,6 \times 10^6 \times 16 = 3225,6 \times 10^6$$
$$= 32,26 \times 10^8 \text{ células /ejaculado}$$

3º Plaqueamento:

Concentração Inicial: $C_i = 201,6 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Concentração final: $C_f = 60 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Volume final: $V_f = 2 \text{ ml}$

Volume inicial: $v_i = ??$

$$C_i v_i = C_f V_f \approx 201,6 \times 10^6 \times v_i = 60 \times 2 \approx$$
$$\approx v_i = \frac{120}{201,6} = 0,59 \text{ ml de semen para o plaqueamento}$$

$2 \text{ ml} - 0,59 \text{ sémen} = 1,41 \text{ ml de meio}$

6 de Julho: Puro Sangue Lusitano #7 – 19 anos

1º- Concentração de Espermatozoides:

Ao observar a câmara de Neubauer ao microscópio, contaram-se 408 espermatozoides.

$$408 : 6 = 68 \text{ spz}'s$$

$$68 \times 16 \times 10 \times 10^4 = 1088 \times 10^5 =$$

$$[] = 108,8 \times 10^6 \text{ spz}'s / \text{ml}$$

2ª- Número total de spz por ejaculado:

O volume total do ejaculado foi de 40 ml.

$$[] \times \text{ml do ejaculado} = 108,8 \times 10^6 \times 40 = 4352 \times 10^6 \\ = 43,52 \times 10^8 \text{ células /ejaculado}$$

3º Plaqueamento:

Concentração Inicial: $C_i = 108,8 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Concentração final: $C_f = 60 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Volume final: $V_f = 2 \text{ ml}$

Volume inicial: $v_i = ??$

$$C_i v_i = C_f V_f \approx 108,8 \times 10^6 \times v_i = 60 \times 2 \approx$$

$$\approx v_i = \frac{120}{108,8} = 1,10 \text{ ml de semen para o plaqueamento}$$

$2 \text{ ml} - 1,10 \text{ sémen} = 0,9 \text{ ml de meio}$

-14 de Setembro: Puro Sangue Lusitano #8 – 16 anos

1º- Concentração de Espermatozoides:

Ao observar a câmara de Neubauer ao microscópio, contaram-se 404,5 espermatozoides.

$$404,5 : 6 = 67,3 \text{ spz}'s$$

$$67,3 \times 16 \times 10 \times 10^4 = 1076,8 \times 10^5 =$$
$$[] = 107,7 \times 10^6 \text{ spz}'s / \text{ml}$$

2ª- Número total de spz por ejaculado:

O volume total do ejaculado foi de 25 ml.

$$[] \times \text{ml do ejaculado} = 107,7 \times 10^6 \times 25 = 2692,5 \times 10^6$$
$$= 26,93 \times 10^8 \text{ células /ejaculado}$$

3º Plaqueamento:

Concentração Inicial: $C_i = 107,7 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Concentração final: $C_f = 60 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Volume final: $V_f = 2 \text{ ml}$

Volume inicial: $v_i = ??$

$$C_i v_i = C_f V_f \approx 107,7 \times 10^6 \times V_i = 60 \times 2 \approx$$

$$\approx V_i = \frac{120}{107,7} = 1,11 \text{ ml de semen para o plaqueamento}$$

$$2 \text{ ml} - 1,11 \text{ sémen} = 0,89 \text{ ml de meio}$$

-14 de Setembro: Puro Sangue Lusitano #9 – 21 anos

1º- Concentração de Espermatozoides:

Ao observar a câmara de Neubauer ao microscópio, contaram-se 288,5 espermatozoides.

$$288,5 : 6 = 48,08 \text{ spz's}$$

$$48,08 \times 16 \times 15 \times 10^4 = 11539,2 \times 10^4 =$$

$$[] = 115,4 \times 10^6 \text{ spz's / ml}$$

2ª- Número total de spz por ejaculado:

O volume total do ejaculado foi de 30 ml.

$$[] \times \text{ml do ejaculado} = 115,4 \times 10^6 \times 30 = 3462 \times 10^6$$

$$= 34,62 \times 10^8 \text{ células /ejaculado}$$

3º Plaqueamento:

Concentração Inicial: $C_i = 115,4 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Concentração final: $C_f = 60 \times 10^6 \text{ spz/ml}$

Volume final: $V_f = 2 \text{ ml}$

Volume inicial: $v_i = ??$

$$C_i v_i = C_f V_f \approx 115,4 \times 10^6 \times V_i = 60 \times 2 \approx$$
$$\approx V_i = \frac{120}{115,4} = 1,04 \text{ ml de semen para o plaqueamento}$$

$$2 \text{ ml} - 1,04 \text{ semen} = 0,96 \text{ ml de meio}$$