



INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

ENSAIO DE METODOLOGIAS DE CONGELAÇÃO DE SÉMEN DE GARANHÃO

A INFLUÊNCIA DE DILUIDORES E PROTOCOLOS NA QUALIDADE DO SÉMEN CONGELADO DE GARANHÃO

Pedro Eduardo Marques Figueira

Relatório de Estágio Profissionalizante para Obtenção de Grau
de **Mestre em Engenharia Agro-Pecuária**

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Isabel Rosa M. Lima Brito Viana Andrade

Arguente: Doutora Maria Rosa Rebordão C. Simões Crisóstomo

Co-orientador: Doutor Pedro Nuno D'Almeida Monteiro Pinto Bravo

Co-orientador: Prof. Doutor Fernando José dos Santos Delgado



INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

ENSAIO DE METODOLOGIAS DE CONGELAÇÃO DE SÉMEN DE GARANHÃO

A INFLUÊNCIA DE DILUIDORES E PROTOCOLOS NA QUALIDADE DO SÉMEN CONGELADO DE GARANHÃO

Pedro Eduardo Marques Figueira

Relatório de Estágio Profissionalizante para Obtenção de Grau
de **Mestre em Engenharia Agro-Pecuária**

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Isabel Rosa M. Lima Brito Viana Andrade

Arguente: Doutora Maria Rosa Rebordão C. Simões Crisóstomo

Co-orientador: Doutor Pedro Nuno D'Almeida Monteiro Pinto Bravo

Co-orientador: Prof. Doutor Fernando José dos Santos Delgado

Agradecimentos

O resultado do que somos e do que fazemos ao longo da nossa existência não é, de forma alguma, um trajeto solitário nem produto exclusivo de nós próprios. Os nossos feitos contam sempre com a ajuda de interpostas pessoas, muitas vezes nem sabendo elas que o fazem, quanto mais não seja porque das suas funções advém a atuação que proporciona a efetivação do nosso propósito. Para Vós, que neste grupo se enquadram um grande “Bem Hajam”.

Esta página é demasiado pequena, para me permitir agradecer a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que fosse possível a conclusão de mais uma etapa na minha formação académica e profissional. Pois só assim é possível a concretização de um sonho...

Assim, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas com um sentido profundo de reconhecimento e agradecimento:

Ao Professor Pedro Pinto Bravo que sempre me incentivou na autonomia e no desejo de superar objetivos, pela disponibilidade, orientação e planeamento do meu estágio e formação ao longo do meu percurso académico e sem qualquer dúvida uma das pessoas mais marcantes da minha vida académica e que guardarei SEMPRE com muito carinho;

Ao Professor Dr. Fernando Delgado por constituir para mim uma referência, modelo profissional por competência ética e modelo pessoal pela boa disposição e prestabilidade em todas e quaisquer ocasiões, pelo apoio constante, encorajamento e compreensão e por todos os conhecimentos que me transmitiu;

À Dr.^a Rosa Rebordão excelente profissional, pela partilha de conhecimentos e por contribuir para a minha aprendizagem e tornar possível a realização do meu estágio;

À D. Conceição Cravo pelo carinho, atenção, simpatia e sobretudo pela paciência e que em muito contribuiu para o meu sucesso;

Ao Manuel Vaz de Castro e ao Miguel Moura pela disponibilidade e compreensão ao longo do meu estágio;

Aos meus colegas de Mestrado um agradecimento especial que não cabe nas palavras, pela prestimosa colaboração, amizade, espírito de entre ajuda e relação pessoal;

A todos os Professores, Técnicos, Funcionários da Escola Superior Agrária de Coimbra por todos os ensinamentos e contributo para a minha futura vida profissional;

A todos os meus Amigos, cujos nomes, não vou citar, porque felizmente, não são muitos, mas já são alguns, e eles sabem quem são... porque “um amigo é fundamental!”;

A toda a minha família que me é próxima, e que sempre me encorajaram a seguir com os meus objetivos;

E por fim, porque os últimos são sempre os primeiros...

Aos meus Pais sempre presentes uma vez mais nesta etapa da minha vida, pela compreensão e apoio incondicional, sem os quais nada disto seria possível, e sem os quais eu não seria a pessoa que sou hoje. Obrigada, pelos valores que me transmitiram, pelos princípios inculcados e pela incondicional disponibilidade SEMPRE...

E por último aos meus filhos Pedro Diogo e Bernardo Figueira pelo carinho, incentivo e compreensão demonstrada ao longo destes mais dois anos ...

A todos os que contribuíram também de uma forma ou de outra para o meu trabalho e para a pessoa que sou e que por ventura me tenho esquecido de salientar.

A toda a COMUNIDADE AGRÁRIA e a todos vós os meus sinceros “AGRADECIMENTOS”!

“Ao alto, ao alto, ao alto... CHARRUA!”

Resumo

Este trabalho visou contribuir para a influência de diluidores e protocolos na qualidade do sémen congelado de garanhão.

O meu estágio foi totalmente realizado no Laboratório de Reprodução Animal Dr. França Martins da Escola Superior Agrária de Coimbra de 15 de outubro de 2016 a 15 de setembro de 2017, tendo como co-orientadores o Professor Pedro Pinto Bravo e o Professor Doutor Fernando Delgado.

Durante o estágio foram realizadas várias tarefas relacionadas com a recolha de sémen aos garanhões a fim de melhorar a sua qualidade seminal, congelação de sémen segundo diferentes protocolos, análises e avaliação de sémen congelado e análise dos resultados obtidos. com especial destaque à tecnologia de sémen, avaliação da fertilidade do garanhão; exame, valorização, conservação e sua manipulação; processamento de doses inseminantes de sémen congelado.

Para o ensaio foram usados três garanhões PSL (Puro Sangue Lusitano), dois pertencentes à Escola Superior Agrária de Coimbra com 5 e 18 anos de idade e um outro de 8 anos gentilmente cedido pela coudelaria Monte de Portugal.

Foram ainda usados para os ensaios três diluidores diferentes especificamente para congelamento de sémen e três protocolos de congelação de sémen de garanhão também diferentes.

Para maior fiabilidade foram realizadas três repetições para cada ensaio.

A avaliação de resultados evidencia a influência do fator *indivíduo* sobre os parâmetros seminais, o que reforça a importância do conhecimento individual do garanhão para a correta aplicação do manejo reprodutivo e da tecnologia que sobre o sémen seja aplicada e ainda um efeito significativo da *idade* sobre a generalidade das características espermáticas analisadas.

Palavras-chave: Equinos, Recolha, Sémen, Diluidores, Crioconservação.

Abstract

This work aimed to contribute to the influence of extenders and protocols on the quality of frozen stallion semen.

My internship was fully carried out at the Dr. França Martins Animal Reproduction Laboratory of the Coimbra Agrarian High School from October 15, 2016 to September 15, 2017, with co-supervisors Professor Pedro Pinto Bravo and Professor Dr. Fernando Delgado.

During the internship, several tasks related to the collection of semen from the stallions were carried out in order to improve their seminal quality, freezing of semen according to different protocols, analysis and evaluation of frozen semen and analysis of the results obtained, with special emphasis on semen technology, assessment of stallion fertility, examination, recovery, preservation and manipulation thereof, processing of inseminating doses of frozen semen.

Three PSL stallions (Puro Sangue Lusitano) were used for the test, two belonging to the Coimbra Agrarian School of 5 and 18 years of age and another one of 8 years, kindly provided by the Monte de Portugal stud farm.

Three different extenders specifically for freezing semen and three different stallion freezing protocols were also used for the tests.

For reliability three replications were performed for each assay.

The evaluation of results evidences the influence of the individual factor on the seminal parameters, which reinforces the importance of the individual knowledge of the stallion for the correct application of the reproductive management and the technology that is applied on the semen and also a significant effect of the age on the sperm characteristics analyzed.

Key words: Equines, Collection, Semen, Extenders, Cryopreservation.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS	X
ÍNDICE DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. Aparelho Reprodutor Masculino	2
2.1.1. Anatomia	2
2.1.2. O Sémen Equino	2
2.1.3. Estrutura do Espermatozóide Equino	3
2.1.4. Produção Espermática	4
2.2. Recolha de Sémen	4
2.2.1. Procedimento de Recolha de Sémen.....	6
2.2.2. Manipulação de Sémen	8
2.2.3. Avaliação do Sémen.....	9
2.2.3.1. Volume	9
2.2.3.2. Cor	10
2.2.3.3. Densidade	10
2.2.3.4. Motilidade.....	10
2.2.3.5. Concentração	11
2.2.3.6. Morfologia.....	12
2.2.3.7. Vitalidade	12
2.2.4. Registos.....	12
2.2.5. Valorização do Sémen	13
2.2.6. Crioconservação do Sémen	13
2.2.6.1. A Importância da Crioconservação	15
2.2.6.2. Os Crio-danos e o Papel dos Agentes Crioprotectores	15
2.2.6.3. Tipos de Crioconservação	17
2.2.6.4. Técnicas de Crioconservação	17
2.2.6.4.1. Congelação Lenta	17
2.2.6.4.2. Vitrificação	18

2.2.6.5.	Desvantagens da Crioconservação.....	19
2.2.6.6.	Vantagens da Crioconservação	19
2.2.7.	Diluidores.....	19
3.	Materiais e Métodos.....	23
3.1.	Materiais de Laboratório.....	23
3.2.	Delineamento Experimental.....	24
4.	Resultados e Discussão	34
5.	Conclusão.....	39
6.	Considerações Finais.....	41
7.	Referências Bibliográficas	42
	ANEXOS	50

Índice de Figuras

FIGURA 1 - ÓRGÃOS REPRODUTORES DO GARANHÃO.	2
FIGURA 2 - MORFOLOGIA DE UM ESPERMATOZÓIDE.	4
FIGURA 3 - VAGINA ARTIFICIAL MODELO “CAMBRIDGE”	5
FIGURA 4 - RECOLHA DE SÉMEN UTILIZANDO VA EM MANEQUIM NA ESAC.	6
FIGURA 5 - LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DR. FRANÇA MARTINS DA ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE COIMBRA.	8
FIGURA 6 - DIVERSO MATERIAL PARA MANIPULAÇÃO DO SÉMEN.	8
FIGURA 7 - SÉMEN PREVIAMENTE FILTRADO.	9
FIGURA 8 - ASPECTO DO SÉMEN EM PROVETA.	10
FIGURA 9 - FITA MEDIDORA DE PH.	10
FIGURA 10 - MICROSCÓPIO COM PLATINA DE AQUECIMENTO.	11
FIGURA 11 - ESPECTROFOTÓMETRO E TABELA DE CONVERSÃO DE ABSORVÂNCIA (EM ANEXO).	11
FIGURA 12 - ESFREGAÇOS DE SÉMEN PARA ANÁLISE EM PLACA AQUECIDA.	12
FIGURA 13 - REGISTO DE TAREFAS E MODELO DE FICHA PARA EXAME ANDROLÓGICO DE GARANHÕES (EM ANEXO).	12
FIGURA 14 - DILUIDORES DE SÉMEN E CENTRIFUGA.	13
FIGURA 15 - DIFERENTES DILUIDORES UTILIZADOS NO ENSAIO DE CONGELAÇÃO DE SÉMEN.	21
FIGURA 16 - PALHETAS DE SÉMEN CONGELADO E CONTENTOR DE AZOTO LÍQUIDO PARA ARMAZENAMENTO.	22
FIGURA 17 - TIPOS DE MOVIMENTOS OBSERVÁVEIS NAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS.	26
FIGURA 18 - ESFREGAÇO DE ESPERMA EQUINO CORADO COM EOSINA-NIGROSINA.	26
FIGURA 19 - ESFREGAÇO DE ESPERMA EQUINO CORADO COM TINTA DA CHINA OBSERVADO AO MICROSCÓPIO ÓPTICO.	27
FIGURA 20 - MORFOLOGIA DE ESPERMATOZÓIDES EQUINOS (EM ANEXO).	28
FIGURA 21 - APRECIÇÃO MORFOLÓGICA DE ESPERMATOZÓIDES EQUINOS (EM ANEXO).	28
FIGURA 22 - MATERIAL NECESSÁRIO AO ENCHIMENTO DAS PALHETAS DE SÉMEN.	31
FIGURA 23 - MATERIAL NECESSÁRIO AO CONGELAMENTO DO SÉMEN.	32
FIGURA 24 - MATERIAL NECESSÁRIO AO DESCONGELAMENTO DO SÉMEN.	33
FIGURA 25 - ENSAIO DE CONGELAÇÃO DE SÉMEN HEL-REI (PSL) (EM ANEXO).	34
FIGURA 26 - ENSAIO DE CONGELAÇÃO DE SÉMEN ESPORÃO (PSL) (EM ANEXO).	35
FIGURA 27 - ENSAIO DE CONGELAÇÃO DE SÉMEN SINO (PSL) (EM ANEXO).	35

Índice de Gráficos

GRÁFICO 1 - AVALIAÇÃO DA MOBILIDADE (MOB2) PÓS-DESCONGELAÇÃO.	36
GRÁFICO 2 - AVALIAÇÃO DA VITALIDADE (VIT2) PÓS-DESCONGELAÇÃO.....	36
GRÁFICO 3 - AVALIAÇÃO DA PERDA DE MOBILIDADE (PERDA) PÓS-DESCONGELAÇÃO.	37

Índice de Tabelas

TABELA 1 - ANOVA: EFEITO DO DILUIDOR E CURVA DE ARREFECIMENTO.	37
TABELA 2 - MÉDIAS POR DILUIDOR E POR CURVA DE ARREFECIMENTO.	37

Lista de Abreviaturas

ADN - Ácido Desoxirribonucleico
ART - Tecnologias Reprodução Assistida
BSA - Ácido Linoleico-Albunina Sérica Bovina
°C - Centígrados
cm - Centímetro
CPAs - Crioprotectores
DMSO - Dimetilsulfóxido
EG - Etilenoglicol
GLY - Glicerol
h - Horas
IA - Inseminação Artificial
INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
L - Litro
min. - Minuto
ml - Mililitro
mm - Milímetro
MP - Membrana Plasmática
NTE - N° Total Espermatozóides
Osm - Osmolalidade
PI - Peça Intermédia
PMS - Movimentos Progressivos SPZ
PROH - 1,2 - Propanediol
PSL - Puro Sangue Lusitano
Kg - Quilograma
SPZ - Espermatozóides
UI - Unidades Internacionais
VA - Vagina Artificial
µl - Microlitro

1. Introdução

A reprodução é um processo complexo, que no macho envolve à *priori*, a produção pelas gónadas, de espermatozóides.

Uma das principais razões para que se proceda a colheitas de sêmen tem como objetivo a avaliação do potencial de fertilidade dos machos.

A avaliação de parâmetros quantitativos (volume de sêmen e concentração espermática) e qualitativos (mobilidade, vitalidade e morfologia dos espermatozóides), consignados pela “Society for Theriogenology”, tem sido considerada como via de acesso à fertilidade potencial de um macho. Não obstante a concentração espermática funcionar como um indicador da capacidade testicular para produzir espermatozóides, a mobilidade espermática dar indicação da integridade do axonema e estruturas associadas, assim como do metabolismo celular, e a morfologia da célula ser um reflexo da qualidade da espermatogénese, verifica-se uma dissociação entre o avaliado à *priori* e a fecundidade à *posteriori*.

Na raça autóctone portuguesa nomeadamente o Puro Sangue Lusitano (PSL), estudos conducentes ao conhecimento do padrão espermático são escassos e inexistentes quanto à eficiência do espermatozóide, pois assenta numa intrincada, e pouco compreendida, rede de relações organizacionais entre os diversos componentes dos seus macro e micro-domínios estruturais.

As implicações que estes aspetos assumem na fertilidade dos equinos são sem dúvida potencializados aquando da crioconservação do sêmen para futuras utilizações.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Aparelho Reprodutor Masculino

O período reprodutivo dos garanhões não é restrito e é possível recolher sêmen todo o ano.

A sazonalidade é menos marcada no macho, mas apesar disso o ejaculado é mais volumoso, concentrado e há ainda maior produção de testosterona durante o período reprodutivo da fêmea (Ferreira Dias *et al.*, 1998).

2.1.1. Anatomia

O aparelho reprodutor masculino consiste em: pênis, testículos (nos quais são produzidos os espermatozóides), escroto (bolsa de pele contendo os testículos), canal deferente (um em cada testículo, que liga o canal deferente ao testículo) e glândulas anexas: ampolas, vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais (Figura1) (Clayton e Flood, 1997).

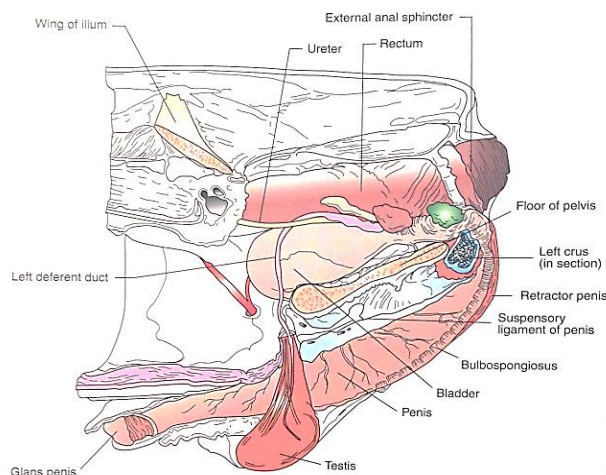


Figura 1 - Órgãos reprodutores do garanhão.

Fonte: Samper, 2009.

2.1.2. O Sêmen Equino

O sêmen, ou esperma, é o fluido que, em condições normais, é expelido pela uretra durante a ejaculação. É constituído por uma fração figurada, os espermatozóides produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos e por uma fração líquida, o plasma seminal, resultante da atividade das vias espermáticas e glândulas anexas.

De aspeto branco leitoso, tanto mais acentuado quanto maior a concentração espermática, apresenta pH neutro (6,2 e 7,8) e osmolalidade entre 300 a 334 mOsm/Kg (Simões 1984).

2.1.3. Estrutura do Espermatozóide Equino

Os espermatozoides são células altamente regionalizadas e especializadas, com um número haplóide de cromossomas (32 no garanhão). Estruturalmente (Figura 2) apresentam duas regiões maiores, a cabeça e o flagelo.

A cabeça exibe forma ligeiramente ovalada (5,33 mm a 6,62 mm de comprimento por 2,75 mm a 3,26 mm de largura) (Brito, 2007), determinada pela forma do seu núcleo, subestrutura celular que contém o ácido desoxirribonucleico (ADN) complexado maioritariamente com protaminas, proteínas carregadas positivamente e ricas em resíduos de arginina e cisteína, que substituem as histonas em cerca de 85% do ADN durante a espermiogénese (Oliva, 2006 e Miller, Brinkworth e Iles, 2010), e que possibilitam a densa compactação do ADN, conferindo ao núcleo uma forma hidrodinâmica, permissiva da mobilidade do espermatozóide. Ainda na região da cabeça e recobrando o núcleo na sua porção apical, até cerca de 2/3 da sua extensão, encontra-se o acrossoma, estrutura vesicular derivada do complexo de Golgi (Hermo *et al.*, 2010), rica em enzimas hidrolíticas, proteases e recetores celulares necessários para a interação entre o espermatozóide e a zona pelúcida do oócito durante a fertilização. No espermatozóide equino, o acrossoma é ligeiramente espesso na sua porção apical, mas acentuadamente fino na sua porção caudal (distal).

O flagelo ou cauda, com um comprimento de 33 a 54 mm no espermatozóide equino, é o elemento propulsor do espermatozóide e apresenta-se adelgado de diante para trás.

A peça intermédia ou segmento intermédio (PI; com 8 mm a 10,5 mm de comprimento), região mais espessa do flagelo, estende-se por cerca de 1/3 do seu comprimento (Dott, 1975; Bielanski e Kaczmarek, 1979).

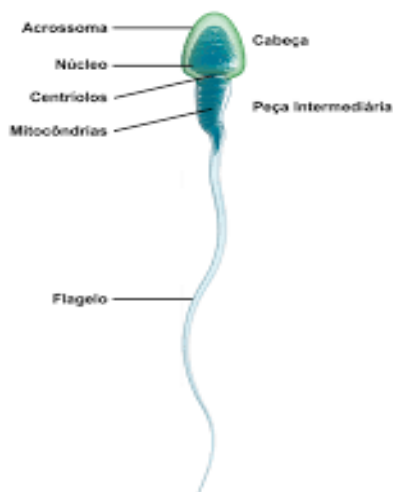


Figura 2 - Morfologia de um espermatozôide.

Fonte: <http://fertilidadedohomem.com.br/exames-iniciais.html>

2.1.4. Produção Espermática

Os testículos são considerados os órgãos principais do sistema reprodutor uma vez que neles se produzem os espermatozoides (via espermatogênese) e algumas das hormonas que governam as funções reprodutivas.

Os espermatozoides desenvolvem-se no interior dos túbulos seminíferos, cordões testiculares primários que se dispõem no interior de lóbulos coniformes formados por lamelas que divergem do corpo de Highmore, ou mediastino testicular (Simões, 1984).

Os túbulos seminíferos representam cerca de 72% do parênquima testicular e o seu epitélio é constituído por células da linha germinal (as espermatogénicas) e pelas células de Sertoli (Johnson *et al.*, 2000).

Às células de Sertoli é também marcadamente reconhecida uma função de suporte e de nutrição das células germinais, garantindo o ambiente ótimo para o seu desenvolvimento e diferenciação, estando também envolvidas no movimento dos espermátócitos (libertação dos espermátóides no lúmen dos túbulos seminíferos) (Nakanishi e Shiratsuchi, 2004) e de corpos citoplasmáticos residuais.

2.2. Recolha de Sêmen

Alguns dos métodos de recolha de sêmen em garanhões incluem o uso de uma vagina artificial (VA), uso de preservativo, ejaculação farmacologicamente induzida, estimulação manual, recolha através do epidídimo e electro ejaculação, este último com várias complicações como contaminações com urina, motilidade baixa e perfuração rectal

sendo necessário recorrer a anestesia geral e não considerado um método desejável e de resultados inconsistentes (Brinsko *et al.*, 2011).

A VA (Figura 3) é o método mais utilizado no mundo para a recolha de sêmen e consiste numa bolsa / cilindro em borracha cheia com água quente à temperatura interna de aproximadamente 48°C (temperatura intravaginal) e a uma determinada pressão (Brinsko *et al.*, 2011).

A temperatura e a pressão devem ser escolhidas tendo-se sempre em atenção o conhecimento prévio do garanhão em questão (Hurtgen, 2009).

Neste método, são os estímulos térmicos e mecânicos que incentivam a ejaculação do macho (Faria, 1991).

As bainhas sanitárias de plástico estéril reduzem o risco de contaminação do sêmen no caso de uma VA mal lavada, ou com resíduos biológicos ou químicos para além de que permitem que a VA seja usada por vários garanhões (Hurtgen, 2009).



Figura 3 - Vagina artificial modelo “Cambridge”.

Fonte: Própria, 2017.

A recolha de sêmen utilizando uma VA é realizada enquanto o garanhão monta uma égua em cio ou um manequim.

No caso de se utilizar uma égua esta deve ser calma, ter alguma experiência se possível, demonstrar sinais evidentes de cio e como forma de precaução dos seus movimentos devemos recorrer ao uso de peias.

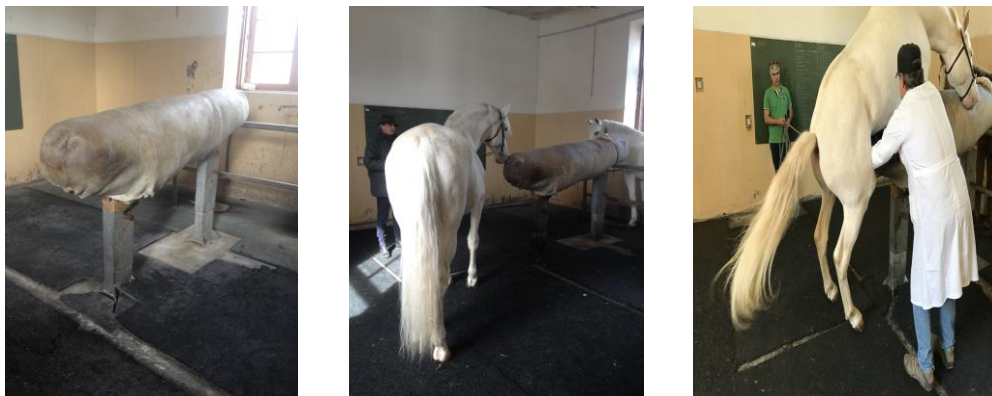


Figura 4 - Recolha de sêmen utilizando VA em manequim na ESAC.

Fonte: Própria, 2017.

O uso de um manequim (Figura 4) requer que o garanhão tenha sido ensinado a usá-lo e por essa mesma razão em muitos dos garanhões não é utilizado.

O manequim permite ainda que a colheita seja mais fácil em garanhões com limitações físicas reduzindo assim riscos de ferimentos tanto a eles próprios como nas éguas (Blanchard *et al.*, 1988).

A recolha de sêmen em manequim deve ser efetuada numa sala de recolha onde é importante ter em atenção o piso, que não deve ser escorregadio (tipo borracha), de drenagem fácil e de fácil limpeza. Em termos de acesso à sala de recolha, este deve ser fácil tanto para a égua como para o garanhão, com dimensões amplas que permitam ao garanhão mover-se sem se sentir restringido (Chenier, 2009).

2.2.1. Procedimento de Recolha de Sêmen

O garanhão deve ser conduzido com um cabeção e uma guia de maneira a facilitar o maneio do mesmo. A estimulação do macho é um requisito importante para que este ejacule com sucesso; ao macho é apresentado uma égua em estro que desencadeia a ereção.

Após o período de excitação do garanhão é permitido que este se aproxime da égua e tal como na cobrição natural, todos os operadores incluindo o responsável pela recolha devem colocar-se do mesmo lado; este posicionamento permite que caso ocorra algum problema, a cabeça da égua e do garanhão possam ser puxados para o lado em que se encontram os operadores, o que implica que os posteriores sejam afastados dos mesmos (Umphenour e Steiner, 2009).

Assim que o garanhão monta a égua é permitido que este estabilize em cima da mesma e só depois o operador pode avançar; o pénis deve ser desviado da entrada da vagina e direcionado para a abertura da vagina artificial (Umphenour e Steiner, 2009).

Após a introdução do pênis a temperatura e a pressão estimulam a ejaculação (pode por vezes ser necessário aliviar a pressão permitindo a saída de ar e/ou água) (Hurtgen, 2009).

A vagina artificial deve ser inclinada ligeiramente (cerca de 25° na horizontal) o que é equivalente ao ângulo natural da vagina, a cerca de meia altura da anca da égua segurando o operador com uma das mãos na pega da vagina artificial e outra na base do pênis do garanhão o que garante e impede a saída do pênis da vagina bem como estimula a ereção e dando sinal ao operador da saída do ejaculado (Hurtgen, 2009).

A ejaculação é normalmente assinalada pela contração do músculo retrator do pênis (movimento da cauda sincrónica com os movimentos ejaculatórios).

Após a ejaculação, a vagina artificial deve ser lentamente inclinada para baixo para que o sêmen seja coletado no recipiente colocado na extremidade da saída da vagina artificial (Hurtgen, 2009).

Durante esta fase o garanhão pode desmontar a égua sendo que a vagina artificial deve ser mantida no pênis se este continuar ereto o que pode não ser possível em todos os garanhões, porém é aconselhável para a recolha de maior volume do ejaculado (McDonnell, 2009).

Assim que a recolha termina a VA deve ser removida da proximidade do garanhão (Hurtgen, 2009).

2.2.2. Manipulação de Sêmen

Logo após a colheita o sêmen deve ser transportado de imediato para o laboratório (Figura 5) minimizando os riscos de choque térmico, exposição à luz, trauma físico e contaminação.



Figura 5 - Laboratório de Reprodução Animal Dr. França Martins da Escola Superior Agrária de Coimbra.

Fonte: Própria, 2017.

Todo e qualquer material que entrar em contacto com o sêmen deve estar desinfetado ou esterilizado e ser previamente aquecido a uma temperatura de 37°C e caso não tenha sido usado um filtro de colheita o sêmen deve ser filtrado de forma a retirar a fração do gel e impurezas (McKinnon e Voss, 1993).

Quando se pousa a VA a remoção da válvula de entrada de água alivia a pressão o que também auxilia o escoamento do sêmen para o copo coletor e impede o sobreaquecimento dos SPZ. Após estes procedimentos o copo coletor pode ser removido para que se processem os passos seguintes de análise, sendo mantido o sêmen “em banho maria” a 37°C.

Antes do início da avaliação, todo o material necessário (Figura 6) deve ser previamente lavado (apenas com água) e seco numa estufa onde é mantido a 38°C (copo coletor, filtro, pipetas, lâminas, lamelas) e devidamente preparado (microscópio de platina aquecida, espectrofotómetro, corante vital (eosina - nigrosina) (McKinnon e Voss, 1993).

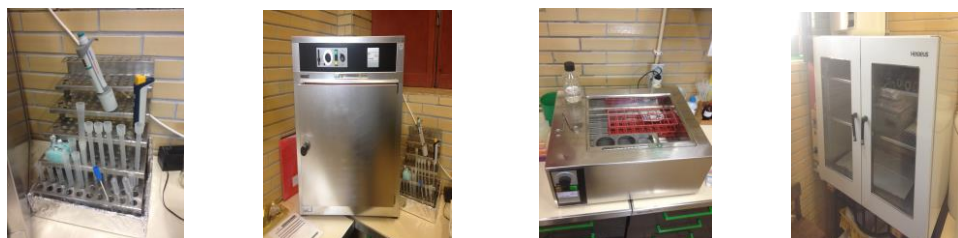


Figura 6 - Diverso material para manipulação do sêmen.

Fonte: Própria, 2017.

2.2.3. Avaliação do Sêmen

O ejaculado do garanhão consiste em 4 frações (Samper, 2009):

- Fração pré-espermática - fluido pouco denso e translúcido;
- Fração rica em SPZ - fluido espesso e cremoso sem gel;
- Fração pós-espermática - fração de gel que pode ou não ser rica em SPZ;
- Fração final - pouco gel e sem SPZ e que pode conter substâncias prejudiciais aos SPZ.

O sêmen deverá então ser avaliado quanto aos seguintes parâmetros:

2.2.3.1. Volume

O volume do ejaculado é medido num copo coletor após filtração da fração gelatinosa e impurezas para uma determinação correta do volume sendo a média de 25 a 50 ml (Figura 7) (Samper, 2009).

As variações nos volumes podem ser devido a diversos fatores como a variabilidade individual, frequência da ejaculação, idade, grau de excitação e patologias (Samper, 2009).



Figura 7 - Sêmen previamente filtrado.

Fonte: Própria, 2017.

2.2.3.2. Cor

A aparência normal é branco acinzentado a branco leitoso (Figura 8) sendo os fatores que alteram essa aparência a presença de sangue, urina, pus e sujidade (Samper, 2009).



Figura 8 - Aspeto do sêmen em proveta.

Fonte: Própria, 2017.

2.2.3.3. Densidade

A consistência normal é aquosa, não tem cheiro e apresenta um pH neutro avaliado através de fita indicadora (Figura 9) (Samper, 2009).



Figura 9 - Fita medidora de pH.

Fonte: Própria, 2017.

2.2.3.4. Motilidade

A presença de SPZ móveis, em particular os que apresentam mobilidade progressiva é um bom indicador de viabilidade espermática observada em microscópio de platina aquecida (Figura 10) dependendo também de alguns fatores como a concentração no campo de visão, grau de contaminação, grau de aglutinação e temperatura (Samper, 2009).

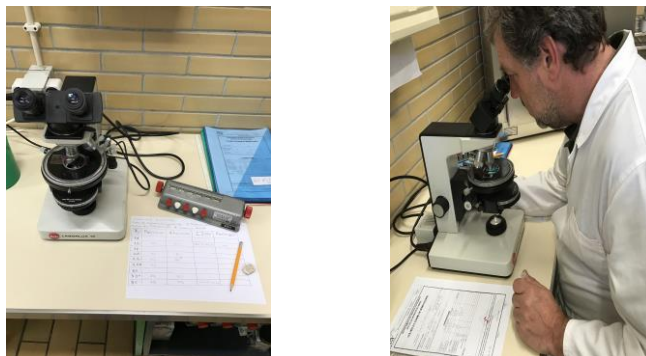


Figura 10 - Microscópio com platina de aquecimento.
 Fonte: Própria, 2017.

2.2.3.5. Concentração

É um dos parâmetros mais importantes após a determinação da viabilidade particularmente quando se pretende determinar se o sêmen tem qualidade para ser utilizado na IA com sêmen fresco (e se pode ser refrigerado e/ou congelado); e quantas éguas poderão por este meio vir a beneficiar apenas com um ejaculado.

A sua medição é feita em espectrofotômetros (Figura 11), fotocolorímetros ou câmara de Neubauer (Samper, 2009).

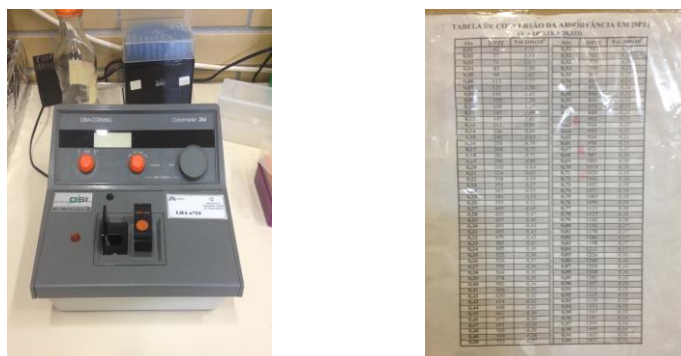


Figura 11 - Espectrofotômetro e tabela de conversão de absorvância (em anexo).
 Fonte: Própria, 2017.

Os valores de concentração variam num grande intervalo (entre 100 a 400 x 10⁶ SPZ/ml) onde também alguns fatores afetam a concentração como a frequência de ejaculação, volume testicular e idade do garanhão (Samper, 2009).

2.2.3.6. Morfologia

A análise morfológica é efetuada através de observação microscópica de um esfregaço de amostra corado com tinta da China (Figura 12) (Samper, 2009).

2.2.3.7. Vitalidade

A análise da vitalidade é efectuada através de observação microscópica de um esfregaço de amostra corado com eosina-nigrosina (Figura 12) (Samper, 2009).

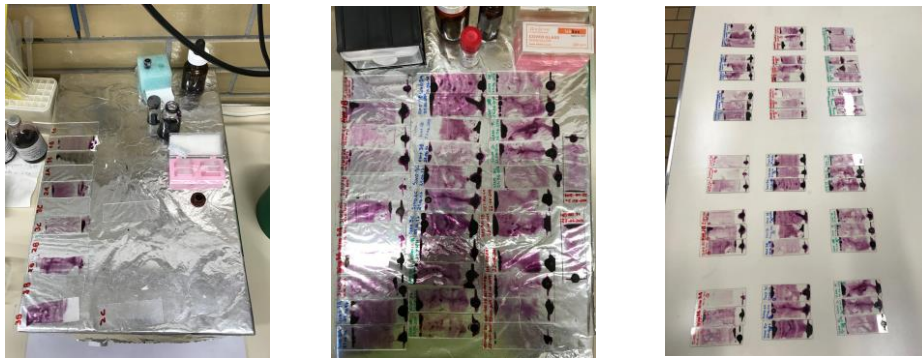


Figura 12 - Esfregaços de sêmen para análise em placa aquecida.
Fonte: Própria, 2017.

2.2.4. Registos

O registo de todas as tarefas efetuadas diariamente (Figura 13) é fundamental para um bom funcionamento dos ensaios e sem dúvida uma ferramenta importante em todo o trabalho de laboratório.

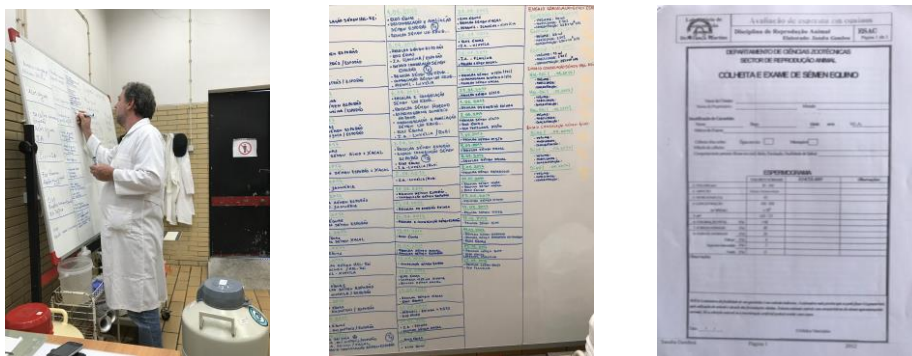


Figura 13 - Registo de tarefas e modelo de ficha para exame andrológico de garanhões (em anexo).
Fonte: Própria, 2017.

2.2.5. Valorização do Sêmen

Um método de valorização muito utilizado é o da lavagem do sêmen. Tal método consiste na substituição do plasma seminal do ejaculado por um diluidor que contenha os produtos tampão, de proteção e nutrientes necessários à viabilidade dos espermatozoides (Barrisco, 1984).

Um diluidor (Figura 14) é adicionado ao sêmen em partes iguais e depois de bem homogeneizado, a mistura é centrifugada; o sedimento, fase figurada do sêmen é rediluído, reconstituindo o volume inicial do ejaculado (Barrisco, 1984).



Figura 14 - Diluidores de sêmen e centrifuga.

Fonte: Própria, 2017.

Este método utiliza-se para valorizar ejaculados de garanhões com baixa mobilidade dos seus espermatozoides e com deficiências nos produtos responsáveis pela manutenção da integridade da célula.

No entanto não se deverá menosprezar a hipótese de estes caracteres serem transmissíveis (Barrisco, 1984).

2.2.6. Crioconservação do Sêmen

Crioconservação deriva da palavra grega “kryos“, que significa “frio ou geada”, conjugada com a palavra conservação. Representa o armazenamento de células ou tecidos a uma temperatura abaixo dos -130°C , geralmente em nitrogénio líquido a -196°C (Jain e Paulson, 2006).

Ao longo das últimas décadas, as técnicas de crioconservação tem progredido rapidamente, apresentando um impacto significativo em diversas áreas tais como, a medicina reprodutiva, que é possivelmente a mais significativa.

Do sucesso na crioconservação de esperma, é agora também vulgarmente usado na crioconservação de ovócitos e embriões e tecnologias de reprodução assistida (ART) em

seres humanos (Mandavala *et al.*, 2016), como é o caso do Banco Português de Germoplasma Animal, pertencente ao INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, localizado em Santarém, e que assegura a recolha e manutenção de germoplasma, nomeadamente de sêmen, embriões, células somáticas e ADN de todas as raças nacionais de animais domésticos (BPGA, 2016).

Esta técnica tem como objetivo principal prolongar a viabilidade das células através da interrupção das suas reações metabólicas, devido à utilização de temperaturas extremamente baixas (Shaw e Jones, 2003; Jain e Paulson, 2006; Santos *et al.*, 2008).

Por outras palavras, a utilização da crioconservação permite a interrupção do relógio biológico por tempo ilimitado (Kawayama, 2007). Porém, os mecanismos de criodanos e de regeneração não são totalmente conhecidos, apenas sabendo que as células sofrem danos morfológicos e funcionais quando submetidos a crioconservação, mas a extensão dessas lesões, assim como as diferenças na sobrevivência pós-descongelação e taxas de desenvolvimento podem ser altamente variáveis consoante a espécie, fase de desenvolvimento e origem, o que coloca alguns obstáculos na melhoria dos métodos de crioconservação (Pereira e Marques, 2008).

O sêmen pode ser conservado em estado de pureza desde que se retardem os processos que o fazem envelhecer (Mies Filho, 1987).

Barrisco (1984) refere que o abaixamento gradual da temperatura produz letargia nos SPZ, por supressão do metabolismo do gâmeta e que tal fenómeno é reversível pelo aquecimento desde que não ultrapasse os 50°C (acima deste valor ocorre a imobilização definitiva da célula).

Na prática, os princípios gerais de conservação do sêmen incidem em dois pontos seguintes (Mies Filho, 1987):

- a) Inibição da atividade celular - conseguida por abaixamento controlado da temperatura visando não só a restrição da atividade metabólica da célula mas também a prevenção do choque térmico.
- b) Nutrição do espermatozóide - sendo a manipulação do sêmen para efeitos de avaliação e/ou aplicação algo demorada acontecerá a deterioração progressiva da mobilidade dos SPZ pela convergência (Barrisco, 1984).

2.2.6.1. A Importância da Crioconservação

A preservação de material biológico é uma das principais prioridades atuais nas áreas da biotecnologia, agricultura e ciências biomédicas, originando a criação de bancos de armazenamento de células e tecidos para possíveis transplantes e transferências em caso de necessidade (Tobergte e Curtis, 2013). É hoje possível repor o nível inicial de diversidade genética de uma população em vias de extinção, originária de ação humana, desastre ambiental, desequilíbrios entre sexos ou agentes patogénicos (Machado, 2011).

Ao longo das últimas décadas, ocorreu uma rápida progressão das técnicas de crioconservação com um impacto significativo em muitas áreas, tais como a medicina reprodutiva tanto em humanos como animais. O sucesso inicial na crioconservação de espermatozóides, rapidamente se propagou para a preservação de embriões e mais tarde de ovócitos, utilizados frequentemente na tecnologia de reprodução assistida (ART) (Mandawala *et al.*, 2016). No caso particular da crioconservação de gâmetas e embriões, deverá ter um papel fundamental ao contribuir para a manutenção das raças autóctones (Machado, 2011). Dado que nos últimos 100 anos tem ocorrido um aumento da extinção de espécies de mamíferos selvagens e uma perda de diversidade genética nas raças de animais domésticos, tal como referido anteriormente, tornaram-se também vitais os programas de conservação de espécies com base na crioconservação de germoplasma (Santos *et al.*, 2010; Tobergte e Curtis, 2013).

2.2.6.2. Os Crio-danos e o Papel dos Agentes Crioprotectores

Embora as técnicas de crioconservação tenham evoluído ao longo do tempo, persiste o problema dos possíveis crio-danos causados pelas baixas temperaturas necessárias para a interrupção das reações biológicas da célula, que por sua vez, podem levar à formação de gelo intracelular, ao "efeito de solução" e ao stress osmótico (Machado, 2011; Lai *et al.*, 2015)

Outro desafio relaciona-se com a técnica de vitrificação que utiliza altas concentrações de certos crioprotetores (CPAs) e a aplicação de taxas de arrefecimento ultra rápidas ($> 106^{\circ}\text{C}/\text{min.}$), induzindo o citoplasma da célula a ficar vítreo ao invés de cristalizar. No entanto, ocorre um aumento de toxicidade devido aos agentes crioprotetores, bem como uma maior fragilidade do órgão/tecido vitrificado que o torna mais suscetível a um possível stress térmico (Brockbank e Taylor, 2007).

Os CPAs são produtos químicos adicionais utilizados na crioconservação, que têm como principal função aumentar a concentração total dos solutos no sistema, reduzindo assim a quantidade de gelo formado, isto é, protegem as células contra a desidratação, arrefecimento e danos causados pela redução extrema de temperatura, evitando ainda choques osmóticos (Pereira e Marques, 2008; Santos *et al.*, 2008). Em resumo, estas substâncias atuam ao nível da estabilização das membranas celulares, estimulando a saída de água do meio intracelular e diminuindo a concentração de eletrólitos do meio extracelular (Silva, 2015).

Posto isto, os CPAs podem ser agrupados em dois grupos de acordo com a sua capacidade de penetrar nas células: penetrantes ou intracelulares e não-penetrantes ou extracelulares (Pereira e Marques, 2008).

Os CPAs penetrantes são moléculas pequenas, não-iónicas, com baixa toxicidade e alta solubilidade em água, isto é, formam ligações de hidrogénio com as moléculas de água, nos quais a taxa de permeabilidade e diluição é determinada pela espécie, pelo tipo de célula, estágio de desenvolvimento, composição da solução, temperatura e pressão hidrostática (Liebermann, 2002; Shaw e Jones, 2003).

Por outro lado, os CPAs não penetrantes são polímeros solúveis e não-tóxicos, que têm capacidade de aumentar a pressão osmótica da solução contribuindo para a desidratação da célula, e diminuição da toxicidade dos CPAs penetrantes (Liebermann, 2002; Shaw e Jones, 2003). O etilenoglicol (EG), o glicerol (GLY), o dimetilsulfóxido (DMSO) e o 1,2-propanediol (PROH) são os CPAs penetrantes mais utilizados nos protocolos de crioconservação, dadas as suas características de rápida penetração no citoplasma das células e formação de ligações de hidrogénio com as moléculas de água, evitando a formação de cristais de gelo (Pereira e Marques, 2008; Silva, 2015).

Estes CPAs apresentam como propriedades semelhantes, a solubilidade em água a baixas temperaturas, permeabilidade celular e toxicidade relativamente baixa. Contudo diferem nos graus de permeabilidade na membrana e características específicas (Swain e Smith, 2010).

No âmbito dos CPAs não penetrantes os mais utilizados são a sucrose, a galactose, a trealose, a glicose, sorbitol e a BSA. Estas substâncias atuam como um tampão osmótico que restringe a permeabilidade à água, dado que aumentam a sua concentração no meio exterior promovendo um gradiente osmótico através da membrana celular, que conduz à remoção da água do interior da célula e conseqüentemente à desidratação para a entrada dos CPAs antes do processo de congelação (Ambrosini *et al.*, 2006).

Apesar da importância da penetração dos CPAs na inibição de formação de cristais de gelo intracelulares, concentrações elevadas de CPAs nas soluções de vitrificação podem ser tóxicas. De forma a combater este obstáculo deve-se tentar a minimização da toxicidade das soluções de vitrificação recorrendo a substâncias menos tóxicas, à associação de diferentes CPAs e à redução do tempo de exposição das células às soluções de vitrificação. Contudo ainda não são suficientemente claros os seus mecanismos de ação em relação ao seu papel na congelação ou vitrificação (Swain e Smith, 2010; Silva, 2015).

2.2.6.3. Tipos de Crioconservação

Existe 3 tipos de crioconservação:

- de esperma (espermatozóides);
- de oócitos II;
- de embriões.

2.2.6.4. Técnicas de Crioconservação

Na crioconservação distinguem-se duas técnicas: a congelação lenta e a vitrificação, as quais envolvem quatro etapas comuns: exposição das amostras aos CPAs e arrefecimento até à temperatura de armazenamento (-196°C), descongelação/aquecimento e remoção dos CPAs (Milenkovic, 2011).

Atualmente, a congelação lenta é o método mais utilizado para a crioconservação de espermatozóides e embriões, contudo, a técnica de vitrificação permite um arrefecimento ultra rápido minimizando ao máximo o volume através da utilização de altas concentrações de CPAs, permitindo que os espermatozóides e embriões alcancem o estado vítreo. Esta técnica tem vindo a tornar-se cada vez mais popular entre embriologistas, dadas as suas vantagens a nível de custos e tempo despendido em relação à congelação lenta, sendo já praticamente exclusiva para os ovócitos (Pereira e Marques, 2008; Edris *et al.*, 2014).

2.2.6.4.1. Congelação Lenta

A congelação lenta é descrita como a exposição das células ou tecidos a baixas concentrações de CPAs (Paynter, 2000), por um período que pode variar de 20 a 60 minutos (Candy *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2004). O material é arrefecido lentamente a uma velocidade de 2°C/min. até atingir os -4 a -9°C, mantendo-se nesta temperatura por um

curto período até alcançar a estabilização térmica e evitando o super arrefecimento e a extrema desidratação celular. Quando a desidratação celular é atingida (entre -30 a -80°C), o material é então colocado em nitrogénio líquido (-196°C) (Santos *et al.*, 2008).

Este é um método que tem como principal objetivo alcançar o equilíbrio ideal entre as taxas de desidratação celular e a formação de gelo extracelular, bem como o equilíbrio na rutura, toxicidade e danos osmóticos (Milenkovic, 2011). Esta técnica permite a troca entre fluidos extracelulares e intracelulares, sem a ocorrência de efeitos osmóticos e deformações celulares graves. O CPA é adicionado à solução e a taxa de arrefecimento depende do tamanho e da permeabilidade do tecido/células que serão crioconservadas. Esta técnica apresenta como característica principal a formação de cristais de gelo, e requer a utilização de equipamentos bastante dispendiosos, dado a sua complexidade (Machado, 2011; Milenkovic, 2011).

2.2.6.4.2. Vitrificação

A vitrificação (formação de estado vítreo) foi concebida por Luyet em 1937, tornando-se ao longo do tempo, uma alternativa ao processo de congelação lenta. No INIAV foram realizados estudos comparativos de ambas as técnicas concluindo-se que a vitrificação era a alternativa mais viável e promissora para abordagens tradicionais, em particular para a crioconservação de embriões micromanipulados e ovócitos (Carvalhais *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2007).

Ao contrário da congelação lenta, a vitrificação implica a exposição do material biológico a altas concentrações de CPAs, durante um curto período de tempo (25 segundos a 5 minutos), normalmente à temperatura ambiente. Posteriormente, o arrefecimento ultrarápido em nitrogénio líquido, que evita a formação de cristais de gelo e promove o desenvolvimento de um sólido, é a etapa seguinte, não implicando a utilização de equipamentos sofisticados e de alto custo (Pereira e Marques, 2008). Contudo, segundo Stachecki e Cohen (2004), as altas concentrações de CPAs aplicadas aumentam os efeitos tóxicos mas também aumentam as taxas de sobrevivência dada a rapidez do processo (Santos *et al.*, 2008).

A adição dos CPAs realiza-se na fase que antecede a vitrificação, expondo as células a um ambiente hipertónico e aumentando a concentração do soluto extracelular promovendo um gradiente osmótico através da membrana, que causa a saída da água da célula induzindo a sua desidratação (Ambrosini *et al.*, 2006). Após a descongelação ou

durante o aquecimento, é feita a remoção dos CPAs das células que recuperam o volume devido ao influxo de água extracelular até à estabilização atingindo o volume isotônico.

O processo de vitrificação é ainda considerado um processo experimental, existindo ainda muitas questões por responder e por compreender no âmbito dos mecanismos celulares que estão envolvidos na crioconservação, sendo necessários estudos mais aprofundados que permitam desenvolver protocolos mais eficientes e aumentar as taxas de sucesso desta técnica (Silva, 2015). É preciso ainda sublinhar que ambos os processos de crioconservação tendem a variar a sua precisão consoante a espécie e raça em estudo, dadas as variações na permeabilidade da membrana e sensibilidade do material biológico aos CPAs e às taxas de congelação/aquecimento (Machado, 2011; Matos *et al.*, 2015).

2.2.6.5. Desvantagens da Crioconservação

- ✘ Estudos controversos indicam que estes processos poderão levar a alteração cromossômica;
- ✘ A qualidade dos gâmetas ou dos embriões pode estar condicionada com a rigorosidade do processo.

2.2.6.6. Vantagens da Crioconservação

- ✓ Melhoramento genético de animais de produção;
- ✓ Controle de doenças;
- ✓ Otimização da criação e exploração de macho através de programas de IA;
- ✓ Conservação de material genético de animais em vias de extinção.

2.2.7. Diluidores

Torna-se assim necessário manter os espermatozóides num nível metabólico compatível com a sua sobrevivência o que implica a adição de diluidores que garantem o suprimento energético e protejam as estruturas vitais e funcionais da célula, ajudando na prevenção do choque térmico e mantendo o equilíbrio osmótico e ácido-básico do meio (Burns e Douglas, 1975).

Os diluidores podem ser classificados da seguinte forma (Burns e Douglas, 1975):

- **Diluidores químicos** - formados por soluções isotónicas de sais tendo como principal função aumentar o volume do ejaculado; p.e. a solução isotónica de NaCl;

- **Diluidores à base de gema de ovo** - as proteínas e os lípidos presentes na gema do ovo são responsáveis pela proteção do SPZ contra o abaixamento rápido da temperatura e contra as variações de osmolaridade ou do pH do meio, contendo ainda glicose, proteínas e vitaminas que servem de fonte metabólica dos SPZ;
- **Diluidores à base de leite** - o leite tratado pelo calor também exerce as mesmas ações descritas para a gema de ovo; utilizando-se preferencialmente o leite desnatado pois facilita a observação dos SPZ. Por ser um meio de mais fácil preparação e de menor custo tem vindo a substituir o diluidor de gema de ovo em muitos centros de inseminação artificial.

Segundo Burns e Gouglas (1975), o grande mérito dos diluidores é poderem veicular antibióticos quando a técnica de conservação não requer temperaturas muito baixas, impedindo a proliferação de agentes microbianos, evitando a competição entre estes e os espermatozóides na utilização do mesmo substrato nutritivo aumentando-se o índice de concepção das fêmeas com defesas uterinas diminuídas.

Os diluidores (Figura 15) utilizados para este ensaio foram:

- **Para centrifugação:**

INRA 96 200 ml - contém apenas a fração purificada de proteínas micelares do leite. Contém antibióticos: (Penicilina 27 mg / L - Gentamicina 76 mg / L) e antifúngico (Anfotericina).

- **Para congelação:**

GENT 45 ml - diluidor de congelação pronto a usar contendo gema de ovo, glicerol e antibióticos;

INRA FREEZE 120 ml - associação do INRA 96 e do plasma de gema de ovo e antibióticos;

BOTUCRIO 25 ml - menor concentração de glicerol em combinação com uma das várias amidas.



Figura 15 - Diferentes diluidores utilizados no ensaio de congelação de sêmen.

Fonte: Própria, 2017.

A conservação do sêmen pode ser conseguida por:

- **Refrigeração** - os diluidores utilizados estão na dependência da espécie animal assim como as temperaturas de refrigeração que regra geral se situam entre 1°C e 5°C e o tempo de utilização do sêmen refrigerado não deverá ultrapassar as 24 horas (Samper *et al.*, 2009).
- **Congelação** - esta técnica é a que permite conservar o material fecundante por largos anos e a sua utilização nos mais variados e longínquos pontos do globo. A adição de glicerol ao meio diluidor é indispensável quando se pretende congelar sêmen pois impede a formação de cristais no interior da célula espermática durante a congelação evitando ao mesmo tempo a saída de água intracelular para o meio fortemente salino que lhe serve de suporte. A congelação processa-se por arrefecimento gradual em vapores de azoto líquido e posterior imersão no azoto líquido cuja temperatura é de -196°C (Samper *et al.*, 2009).

O sêmen pode ser então:

- **Sêmen fresco**: o sêmen é recolhido como referido anteriormente e é aplicado diretamente na égua: poupa o garanhão e o doseamento do sêmen dá para um maior número de éguas, contudo este tem que estar perto da égua (Samper *et al.*, 2009).
- **Sêmen refrigerado**: ao sêmen é adicionado com um diluidor próprio, é refrigerado a 4°C e tem que ser aplicado na égua entre 24 a 48 horas devendo a IA ser efetuada o mais próximo possível do momento da ovulação (Samper *et al.*, 2009).
- **Sêmen congelado**: o sêmen é adicionado com um diluidor próprio e é criopreservado em azoto líquido (Figura 16), recomendando-se inseminar num período compreendido entre as 12 horas antes da ovulação e 6 horas

pós ovulação de forma a não haver um decréscimo da capacidade fertilizante (Samper *et al.*, 2009).

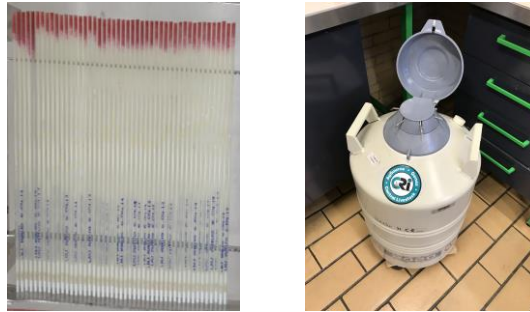


Figura 16 - Palhetas de sêmen congelado e contentor de azoto líquido para armazenamento.
Fonte: Própria, 2017.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais de Laboratório

- Diluidores INRA 96, GENT, INRA FREEZE e BOTUCRIO
- Vagina artificial para equinos
- Microscópio com platina aquecida
- Microscópio ótico
- Placa de aquecimento
- Lâminas
- Lamelas
- Micropipetas
- Eosina - nigrosina
- Tinta da China
- Água destilada
- Fotocolorímetro
- Câmara de Newbauer
- Amostras de sêmen equino
- Centrifuga
- Fita medidora de pH
- Banho Maria
- Frigorífico
- Provetas
- Micropipetas
- Pompets
- Eppendorffs
- Tubos falcon
- Tubos de ensaio
- Espectofotómetro
- Estufa
- Solução de formaldeído
- Gase esterilizada
- Luvas
- Máscara

- Óculos
- Funil
- Contador de laboratório
- Tina de congelação
- Rac de congelação
- Azoto líquido
- Contentor de transporte de azoto líquido
- Contentor de azoto líquido com canisteres devidamente identificados
- Pinças
- Goblets
- Palhetas
- Marcador de palhetas
- Relógio
- Aspirador manual de sêmen
- Selante de palhetas
- Protocolos de congelação de sêmen

3.2. Delineamento Experimental

Para este ensaio de metodologias de congelação de sêmen de garanhão foram escolhidos três garanhões da raça Puro Sangue Lusitano (PSL), dois deles pertencentes à Escola Superior Agrária de Coimbra, Hel-Rei e Sino, respetivamente com 5 e 18 anos de idade e outro gentilmente cedido pela coudelaria Monte de Portugal, Esporão com 8 anos de idade, para efetuar três ensaios de congelamento de sêmen com três repetições cada (tempos 1,2 e 3).

Todos os garanhões estiveram sujeitos às mesmas condições de alimentação e alojamento e de salientar que foram ainda efetuadas algumas recolhas de limpeza de sêmen antes deste ensaio com vista a uma melhor qualidade seminal aquando dos ensaios.

Houve ainda a preocupação de que as repetições dos ensaios fossem efetuadas na mesma semana para cada garanhão.

No processo de congelamento foi usado o diluidor INRA 96 como diluidor de centrifugação do sêmen e os diluidores de congelação utilizados foram o GENT (1), o INRA FREEZE (2) e o BOTUCRIO (3) sendo seguidos três protocolos de congelação com três curvas de arrefecimento diferentes:

Curva A - 30 minutos de frio a 4°C e 10 minutos em vapores de azoto

Curva B - 60 minutos de frio a 4°C e 10 minutos em vapores de azoto

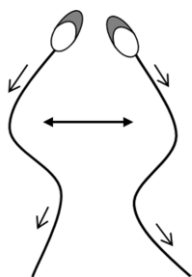
Curva C - 30 minutos de frio a 4°C e 20 minutos em vapores de azoto.

Microscopicamente foram avaliados os parâmetros da mobilidade e da vitalidade do sêmen sendo que a concentração espermática permite a observação da mobilidade individual. A percentagem de espermatozóides móveis em cada ejaculado foi estimada em duas gotas de sêmen (5,5 µl) em natureza, entre lâmina e lamela (18x18 mm), sobre a platina aquecida de um microscópio com contraste de fase (Laborlux, Leica). Com uma ampliação de 100x foi possível observar vários campos óticos (5 a 10) em cada gota e estimar o tipo de movimento prevalecte (Figura 17) fazendo-se, assim, uma estimativa média da mobilidade, traduzindo-se o resultado em percentagem (%) de espermatozóides com movimentos progressivos (PMS).

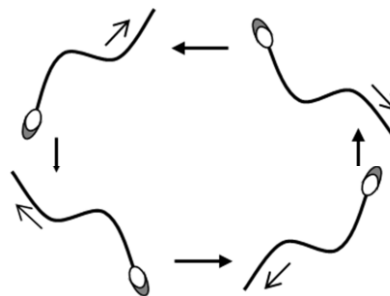
Importa referir que é comum observar-se, no sêmen equino, uma certa percentagem de espermatozóides com movimentos circulares amplos, que conferem à célula um deslocamento em progressão. Este tipo de movimento pode dever-se à inserção do flagelo em posição abaxial.

A mobilidade espermática é considerada um teste fundamental para estimar a proporção de células viáveis (e funcionais) num ejaculado. Contudo, nos equinos, o movimento das células é intercalado por períodos de repouso ou imobilidade. Assim, alguns dos espermatozóides que se apresentarem imóveis podem não estar necessariamente mortos (Davis-Morel, 1999). Adicionalmente, na maior parte das amostras de esperma, a percentagem de mobilidade é sempre inferior à percentagem de células vivas indicando que células vivas mas imóveis estão presentes no ejaculado (Casey *et al.*, 1993). Por estas razões, testes de avaliação da vitalidade (% de espermatozóides vivos) são utilizados como complemento à avaliação da mobilidade.

Movimentos Não Progressivos dos Espermatozóides



Movimento sem sair do lugar



Movimento circular fechado

Movimentos Progressivos dos Espermatozóides

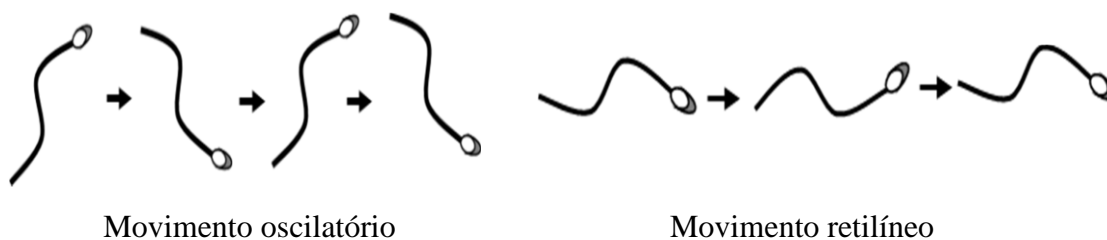


Figura 17 - Tipos de movimentos observáveis nas células espermáticas.

Fonte: (Adaptado de MAPA, 1996)

Contrariamente à maioria das células vivas, em que a vitalidade não é definida exclusivamente em termos de uma propriedade fisiológica ou morfológica (Nebe-Voncaron *et al.*, 2000), nos espermatozóides a vitalidade é sinónimo de integridade do plasmalema. Assim, os testes de vitalidade assentam nas propriedades de exclusão de corantes vitais por parte da membrana plasmática (MP) intacta (íntegra).

A eosina é o corante celular que mais se utiliza (Bloom, 1950), associado a outros corantes de fundo como a nigrosina, o azul de bromofenol e o azul de opala.

Espermatozóides com membranas danificadas permeiam a eosina e coram de vermelho rosado (“mortos”, Figura 18a), ao passo que os espermatozóides com membranas estruturalmente intactas (“vivos”, Figura 18b) permanecem incolores.

Esfregaços de sêmen foram preparados (diluição 1:1) com uma solução de eosina-nigrosina (eosina Y 0,014M e nigrosina 0,1M, numa solução de citrato de sódio 0,1M), sobre uma placa de aquecimento, à mesma temperatura que a do esperma (35°C) de forma a evitarem-se alterações morfológicas (caudas enroladas, por exemplo) induzidas por choque térmico.

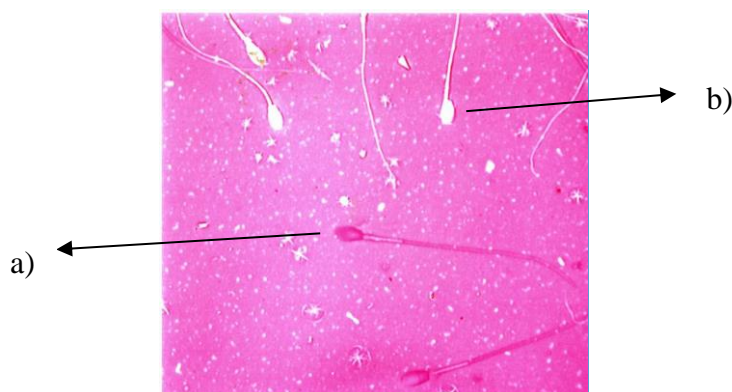


Figura 18 - Esfregaço de esperma equino corado com eosina-nigrosina.

a) espermatozóide morto e b) espermatozóide vivo, na altura da execução do esfregaço.

Fonte: Própria, 2017.

Após secagem, contaram-se 200 células em campos não contíguos (20 a 50) com recurso a microscopia de campo claro (ampliação de 1000x, Laborlux, Leica). Os resultados foram traduzidos em percentagem de espermatozóides vivos.

A tinta da China facultava uma imagem incolor dos espermatozóides em fundo negro (coloração negativa) (Barrisco, 1984), por microscopia de campo claro (Figura 19) e foi o método escolhido para as avaliações da morfologia espermática (Figura 21) uma vez que nos esfregaços de eosina-nigrosina não é possível distinguir com rigor, nos espermatozóides incolores, determinado tipo de anomalias como peças intermédias com fibras isoladas, colos anormais, etc, registando-se as anomalias, de acordo com a classificação da Figura 20.

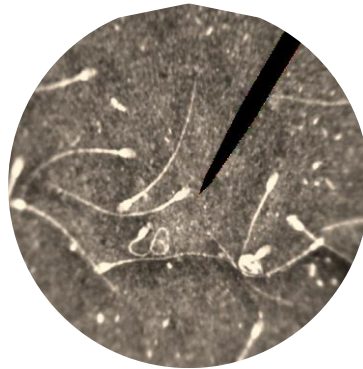


Figura 19 - Esfregaço de esperma equino corado com tinta da China observado ao microscópio ótico.

Fonte: Própria, 2017.

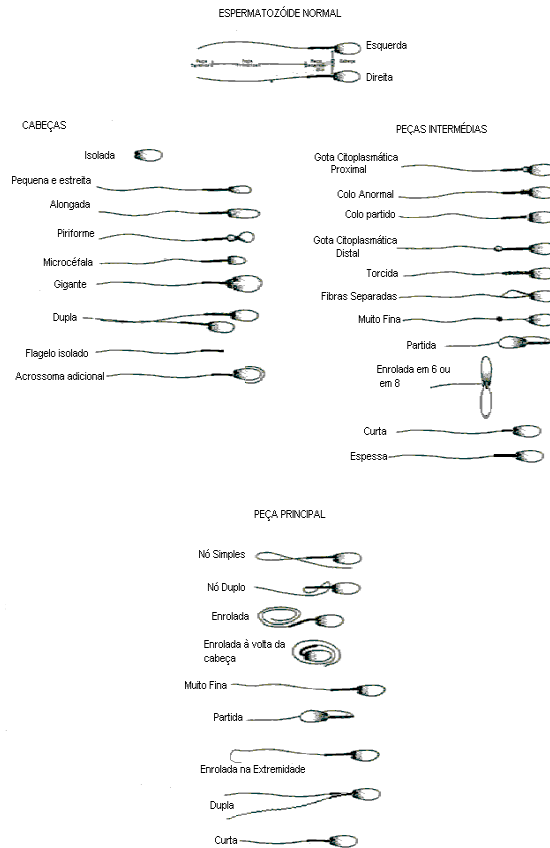


Figura 20 - Morfologia de espermatozoides equinos (em anexo).

Fonte: (Adaptado de Barrisco, 1984 e Mapa, 1996)

Laboratório de Reprodução Animal
 DFM Façanha Martins

Avaliação de esperma em equinos
 Disciplina de Reprodução Animal
 Elaborado: Sandra Gamboa

ESAC
 Página 3 de 3

Apreciação da morfologia dos espermatozoides

Nome Garanhão: _____

	Data	Data	Data
A - Cabeça			
Isolada (2)			
Pequena e estreita (1)			
Alongada (1)			
Piriforme (1)			
Microcéfala (1)			
Dupla (1)			
Gigante (1)			
Flagelo isolado (2)			
TOTAL:			
B - Peça Intermédia			
Muito fina (1)			
Fibras separadas (5)			
Colo anormal (4)			
Torcida (7)			
Colo partido (5)			
Partida (5)			
Isolada (7)			
Dupla (7)			
Espessa (2)			
Curta (3)			
Gota cit. proximal (1)			
Gota cit. distal (6)			
Enrolada em 6 ou 8 (5)			
TOTAL:			
C - Peça Principal			
Nó simples (2)			
Nó duplo (2)			
Enrolada (2)			
Enrolada à volta da cabeça (2)			
Muito fina (3)			
Partida (1)			
Enrolada na extremidade (1)			
Dupla (1)			
Curta (3)			
TOTAL:			
Acrossoma			
A>B>C			
1>2>3>4... etc			

Sandra Gamboa
 Página 3
 2012

Figura 21 - Apreciação morfológica de espermatozoides equinos (em anexo).

Fonte: Própria, 2017.

Procedimento Geral

Antes da recolha de sêmen:

- ✓ Ligar o banho maria a 37°C;
- ✓ Ligar o microscópio, platina, placa de aquecimento e fotocolorímetro;
- ✓ Descongelar os três diluidores de congelação (1, 2 e 3) à temperatura ambiente;
- ✓ Todo o material que entrará em contacto com o sêmen deverá ser mantido em estufa a 40°C;
- ✓ Etiquetar 3 tubos falcon de 10 ml, colocar em cada um deles 3 ml de cada diluidor e pô-los em banho maria a 37°C.

Após a recolha de sêmen:

- ✓ Processamento do sêmen: remover a porção gelatinosa do sêmen, filtrar o sêmen num filtro de celulose ou gase esterilizada e determinação do volume do ejaculado, mobilidade e concentração espermática no fotocolorímetro.

Diluição do sêmen:

- ✓ Mantendo o sêmen em banho maria, fracionar o ejaculado em 2 tubos falcon de 20 ml e adicionar em cada um deles 10 ml de diluidor de centrifugação INRA 96 e 10 ml de sêmen de maneira a se obter uma concentração de 200×10^6 SPZ/ml;
- ✓ Fechar os tubos, homogeneizar o seu conteúdo e centrifugar.

Centrifugação do sêmen:

- ✓ Na centrífuga de 50 ml, centrifugar a 542 G durante 10 minutos, à temperatura ambiente, tendo a preocupação da colocação em posição oposta dos tubos de modo a ficarem equilibrados;
 N° de G = $1,118 \times R \times (\text{rpm})^2$, com R = raio, em mm, entre o eixo de rotação e o fundo do tubo;
- ✓ Eliminar o sobrenadante que não deve conter espermatozóides, pois caso aconteça deve voltar-se a centrifugar após observação, deixando apenas ± 5 % e ressuspender o pellet de SPZ com 3 ml de diluidor de congelação, juntando todo o conteúdo em apenas um falcon;

- ✓ Voltar a determinar a concentração em câmara de Newbauer.

Adição de diluidor de congelação:

- ✓ O nº total de SPZ por palheta deve ser de 100×10^6 SPZ/ml;
- ✓ O volume depois da ressuspensão é de 10 ml;
- ✓ A concentração através da câmara de Newbauer é de “ $y \times 10^6$ SPZ/ml “;
- ✓ O nº total de SPZ na diluição ressuspendida é de $10 \times “ y \times 10^6$ SPZ/ml “;
- ✓ O nº total de palhetas é igual ao nº total de SPZ / 0,1;
- ✓ O volume final é igual ao nº total de palhetas x 0,5;
- ✓ O volume de diluidor a adicionar é igual ao volume final - 10 ml;
- ✓ Fechar cada um dos tubos, devidamente identificados e homogeneizar manualmente à temperatura ambiente, colocando-os num porta-tubos que permita um fácil manuseamento;
- ✓ Preparar o material de enchimento manual de palhetas à temperatura ambiente: relógio, pinças, máquina de enchimento, palhetas devidamente etiquetadas, selante de palhetas, funil, goblets, identificadores e rac de congelação;
- ✓ Preparar os contentores de armazenamento e transporte de azoto líquido, tina de congelação tendo em atenção o uso de luvas, máscara e óculos de proteção;
- ✓ Ter a preocupação de o azoto líquido estar a uma distância de aproximadamente 4 cm da rac de congelação.

Enchimento das palhetas de sêmen (Figura 22):

- ✓ Identificar as palhetas de modo manual;
- ✓ Com a máquina manual de enchimento das palhetas aspirar o sêmen para o interior das palhetas;
- ✓ Deixar uma bolha de ar dentro de cada palheta durante o enchimento;
- ✓ Selar as palhetas, mergulhando a extremidade livre da palheta no pó vedante;
- ✓ Retirar o excesso do selante, limpando por fora a palheta;
- ✓ Colocar as palhetas na rac de congelação.



Figura 22 - Material necessário ao enchimento das palhetas de sêmen.

Fonte: Própria, 2017.

Arrefecimento de sêmen:

No frigorífico:

- ✓ Colocar as palhetas no frigorífico a 4°C seguindo as curvas frio previamente estipulados para cada ensaio de modo a que a descida de temperatura seja gradual:
 - Curva A - 30 minutos de frio a 4°C
 - Curva B - 60 minutos de frio a 4°C
 - Curva C - 30 minutos de frio a 4°C.

Em vapores de azoto:

- ✓ Depois de arrefecidas, colocar as palhetas em vapores de azoto seguindo as curvas de frio previamente estipulados para cada ensaio de modo a que a descida de temperatura seja gradual:
 - Curva A - 10 minutos em vapores de azoto
 - Curva B - 10 minutos em vapores de azoto
 - Curva C - 20 minutos em vapores de azoto.
- ✓ Colocar azoto líquido na tina de congelação;
- ✓ Colocar a rac de congelação a 4 cm acima do nível do azoto líquido;

Congelamento de sêmen de 4°C a - 196°C (Figura23):

- ✓ Ao fim dos tempos de arrefecimento nos vapores de azoto, as palhetas devem ser mergulhadas no azoto líquido;
- ✓ Depois de congeladas, colocar as palhetas nos goblets respetivos e imediatamente colocar estes nos canisteres com azoto liquido, ficando assim armazenado no contentor de sêmen;

- ✓ Ter em atenção de executar todas estas tarefas rapidamente, pois as alterações de temperatura podem ser fatais à sobrevivência dos espermatozóides;
- ✓ O registo do armazenamento é efetuado em ficha própria para cada contentor.

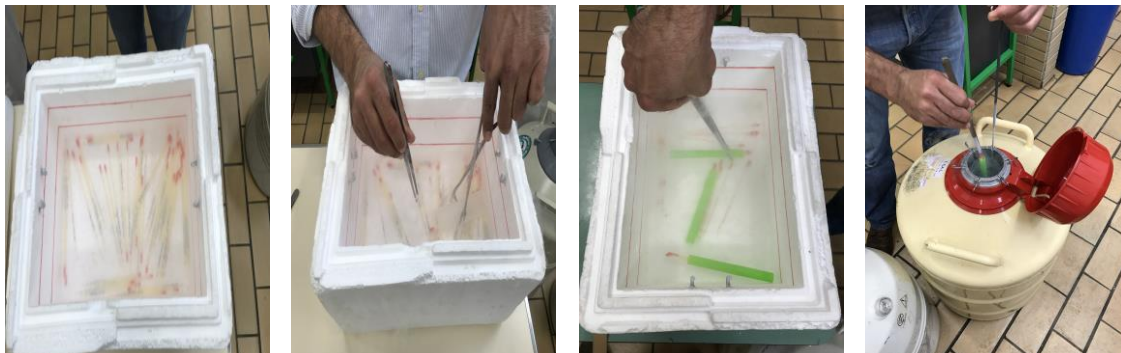


Figura 23 - Material necessário ao congelamento do sêmen.

Fonte: Própria, 2017.

Descongelção do sêmen (Figura 24):

- ✓ Houve a preocupação de que as repetições dos ensaios de descongelção de sêmen fossem efetuadas na mesma semana para cada garanhão;
- ✓ Ligar o banho maria a 37°C;
- ✓ Ligar o microscópio, a platina e o fotocolorímetro;
- ✓ Descongelar 3 palhetas de sêmen para cada diluidor e para cada curva de arrefecimento durante 30 segundos em banho maria;
- ✓ Todo o material que entrará em contacto com o sêmen deverá ser mantido em estufa a 40°C;
- ✓ À temperatura ambiente descarregar todo o conteúdo das palhetas para os eppendorffes devidamente etiquetados.

Avaliação do sêmen:

- ✓ Analisar 2 gotas de sêmen por palheta, segundo os parâmetros da mobilidade e vitalidade segundo os métodos já descritos anteriormente;
- ✓ Registrar dados para análise dos resultados obtidos e tratamento estatístico.



Figura 24 - Material necessário ao descongelamento do sêmen.
Fonte: Própria, 2017.

4. Resultados e Discussão

Para o referido ensaio foram usados três garanhões PSL (Puro Sangue Lusitano), dois pertencentes à Escola Superior Agrária de Coimbra com 5 e 18 anos de idade e um outro de 8 anos gentilmente cedido pela coudelaria Monte de Portugal.

Foram usados três diluidores diferentes especificamente para congelamento de sêmen e três protocolos de congelação de sêmen de garanhão também diferentes.

Para maior fiabilidade foram realizadas três repetições para cada ensaio, pelo que foram registados todos os dados referentes a cada um deles (Figuras 25,26 e 27).

Aquando da recolha foi feito um espermograma sumário e avaliados todos os parâmetros descritos anteriormente, contudo após descongelação foram avaliados apenas os parâmetros para a mobilidade e vitalidade.

Houve a preocupação de cada ensaio, tanto das recolhas efetuadas, congelamento e descongelamento do sêmen para cada um dos garanhões ser realizadas na mesma semana e sensivelmente às mesmas horas com vista a um maior rigor da sua avaliação.

ENSAIO CONGELAÇÃO DE SÊMEN HEL-REI (PSL)												
Garanhão: HEL - REI (H)			Data de Nascimento: 2012.04.19			Pelagem: Ruça						
T1 - Dia da Colheita / Congelação: 5.08.2017			Hora da Colheita: 10h.30m.			Hora da Congelação: 11h.30m.						
Data da Descongelação /Avaliação: 22.06.2017						Hora da Avaliação: 10h.30m.						
T2 - Dia da Colheita / Congelação: 7.08.2017			Hora da Colheita: 10h.30m.			Hora da Congelação: 11h.30m.						
Data da Descongelação /Avaliação: 22.06.2017						Hora da Avaliação: 14h.30m.						
T3 - Dia da Colheita / Congelação: 9.08.2017			Hora da Colheita: 10h.30m.			Hora da Congelação: 11h.30m.						
Data da Descongelação /Avaliação: 23.06.2017						Hora da Avaliação: 10h.30m.						
ENSAYO												
GARANHÃO	TEMPO	VOLUME	CONCENTRAÇÃO	DILUIDOR	CURVA	ANTES MOBILIDADE	DEPOIS MOBILIDADE VITALIDADE					
H	1	12 ml	141x10 ⁶ spz/ml	1	A	50%	20%	20%				
					B		10%	20%				
					C		20%	30%				
				2	A		30%	40%				
					B		50%	50%				
					C		40%	50%				
				3	A		30%	40%				
					B		30%	30%				
					C		30%	50%				
	2	50 ml	212x10 ⁶ spz/ml	1	A	70%	50%	50%				
					B		40%	50%				
					C		80%	50%				
				2	A		30%	50%				
					B		50%	50%				
					C		40%	50%				
				3	A		50%	70%				
					B		50%	80%				
					C		80%	70%				
				3	50 ml		183x10 ⁶ spz/ml	1	A	70%	40%	80%
									B		40%	50%
									C		50%	80%
								2	A		30%	80%
									B		50%	80%
									C		40%	80%
3	A	80%	70%									
	B	80%	80%									
	C	80%	80%									

Tempos:

T1: Tempo 1
T2: Tempo 2
T3: Tempo 3

Diluidores Congelação:

1 - GENT
2 - INRA FREEZE
3 - BOTUCRIO

Curvas de Arrefecimento:

A - 30' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto
B - 60' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto
C - 30' Frio 4°C + 20' Vapores Azoto

Observações:

Criador: Escola Superior Agrária de Coimbra
Proprietário: Escola Superior Agrária de Coimbra

Figura 25 - Ensaio de congelação de sêmen HEL-REI (PSL) (em anexo).

Fonte: Própria, 2017.

ENSAIO CONGELAÇÃO DE SÊMEN ESPORÃO (PSL)

Garanhão: **ESPORÃO (E)**

Data de Nascimento: 2009.04.00

Pelagem: Isabel

T1 - Dia da Colheita / Congelação: 3.04.2017
Data da Descongelação /Avaliação: 4.04.2017

Hora da Colheita: 10h.30m.

Hora da Congelação: 11h.30m.
Hora da Avaliação: 14h.30m.

T2 - Dia da Colheita / Congelação: 5.04.2017
Data da Descongelação /Avaliação: 24.05.2017

Hora da Colheita: 10h.30m.

Hora da Congelação: 11h.30m.
Hora da Avaliação: 16h.30m.

T3 - Dia da Colheita / Congelação: 7.04.2017
Data da Descongelação /Avaliação: 26.05.2017

Hora da Colheita: 10h.30m.

Hora da Congelação: 11h.30m.
Hora da Avaliação: 15h.30m.

GARANHÃO	TEMPO	ENSAIO			CURVA	ANTES MOBILIDADE	DEPOIS	
		VOLUME	CONCENTRAÇÃO	DILUIDOR			MOBILIDADE	VITALIDADE
E	1	30 ml	228x10 ⁶ spz/ml	1	A	70%	20%	30%
					B		10%	20%
					C		30%	40%
				2	A		15%	20%
					B		10%	10%
					C		20%	30%
	2	25 ml	226x10 ⁶ spz/ml	1	A	50%	30%	50%
					B		20%	40%
					C		40%	60%
				2	A		15%	25%
					B		10%	15%
					C		30%	40%
	3	45 ml	282x10 ⁶ spz/ml	1	A	70%	20%	20%
					B		10%	20%
					C		25%	40%
				2	A		10%	20%
					B		25%	40%
					C		30%	50%
3	45 ml	282x10 ⁶ spz/ml	2	A	70%	25%	30%	
				B		10%	25%	
				C		35%	45%	
			3	A		25%	25%	
				B		10%	20%	
				C		25%	40%	
3	45 ml	282x10 ⁶ spz/ml	3	A	70%	35%	50%	
				B		30%	35%	
				C		45%	70%	

Tempos:

T1: Tempo 1
T2: Tempo 2
T3: Tempo 3

Diluidores Congelação:

1 - GENT
2 - INRA FREEZE
3 - BOTUCRIO

Curvas de Arrefecimento:

A - 30' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto
B - 60' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto
C - 30' Frio 4°C + 20' Vapores Azoto

Observações:

Criador: Dr. João Inácio Barata Freixo
Proprietário: Coudelaria Monte de Portugal

Figura 26 - Ensaio de congelação de sêmen ESPORÃO (PSL) (em anexo).

Fonte: Própria, 2017.

ENSAIO CONGELAÇÃO DE SÊMEN SINO (PSL)

Garanhão: **SINO (S)**

Data de Nascimento: 1999.03.15

Pelagem: Ruça

T1 - Dia da Colheita / Congelação: 29.05.2017
Data da Descongelação /Avaliação: 19.06.2017

Hora da Colheita: 10h.30m.

Hora da Congelação: 11h.30m.
Hora da Avaliação: 16h.30m.

T2 - Dia da Colheita / Congelação: 31.05.2017
Data da Descongelação /Avaliação: 21.06.2017

Hora da Colheita: 10h.30m.

Hora da Congelação: 11h.30m.
Hora da Avaliação: 12h.30m.

T3 - Dia da Colheita / Congelação: 2.06.2017
Data da Descongelação /Avaliação: 21.06.2017

Hora da Colheita: 10h.30m.

Hora da Congelação: 11h.30m.
Hora da Avaliação: 16h.00m.

GARANHÃO	TEMPO	ENSAIO			CURVA	ANTES MOBILIDADE	DEPOIS	
		VOLUME	CONCENTRAÇÃO	DILUIDOR			MOBILIDADE	VITALIDADE
S	1	75 ml	254x10 ⁶ spz/ml	1	A	60%	10%	20%
					B		5%	10%
					C		15%	20%
				2	A		5%	10%
					B		5%	5%
					C		10%	20%
	2	35 ml	352x10 ⁶ spz/ml	1	A	60%	10%	20%
					B		5%	10%
					C		20%	20%
				2	A		10%	15%
					B		5%	5%
					C		15%	25%
	3	30 ml	127x10 ⁶ spz/ml	1	A	50%	20%	35%
					B		15%	25%
					C		30%	40%
				2	A		5%	15%
					B		5%	10%
					C		15%	20%
3	30 ml	127x10 ⁶ spz/ml	2	A	50%	5%	10%	
				B		5%	5%	
				C		10%	15%	
			3	A		15%	25%	
				B		10%	20%	
				C		20%	30%	

Tempos:

T1: Tempo 1
T2: Tempo 2
T3: Tempo 3

Diluidores Congelação:

1 - GENT
2 - INRA FREEZE
3 - BOTUCRIO

Curvas de Arrefecimento:

A - 30' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto
B - 60' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto
C - 30' Frio 4°C + 20' Vapores Azoto

Observações:

Criador: Estado Português - Coudelaria de Alter
Proprietário: Escola Superior Agrária de Coimbra

Figura 27 - Ensaio de congelação de sêmen SINO (PSL) (em anexo).

Fonte: Própria, 2017.

Fizeram-se colheitas aos 3 garanhões em 3 tempos diferentes (T1, T2 e T3) e de cada colheita produziram-se 3 alíquotas, sendo a cada uma delas aplicado um diluidor diferente (D1, D2 e D3) e, destas, outras 3 sub-alíquotas que foram submetidas a 3 diferentes curvas de arrefecimento (A, B e C), num total de 81 amostras (em anexo).

Espermogramas sumários pós-descongelação avaliaram a Mobilidade (Mob2), a Vitalidade (Vit2) e a Perda de Mobilidade ($Perda = \frac{Mob_2}{Mob_1}$).

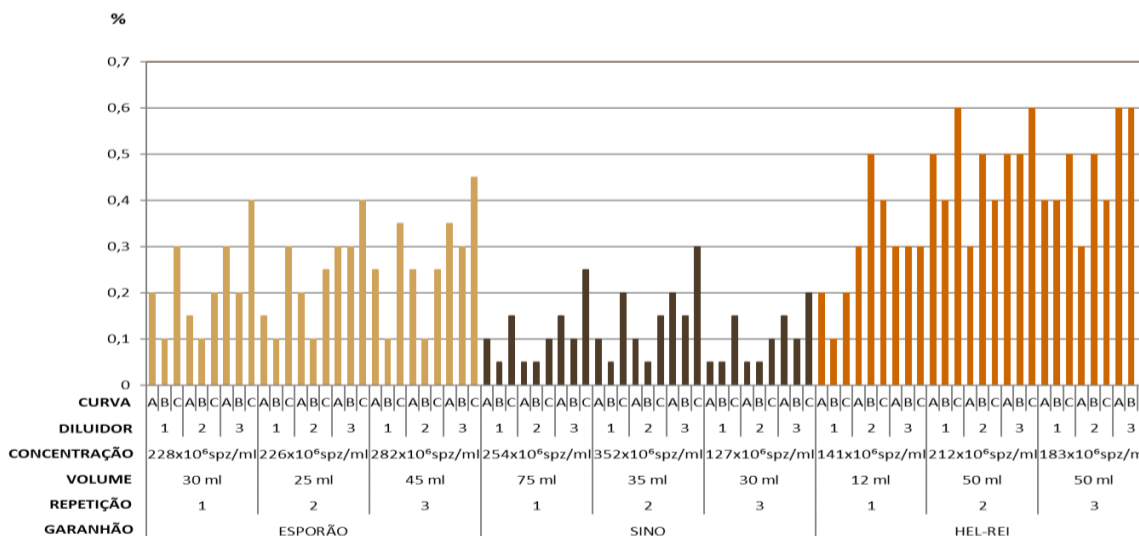


Gráfico 1 - Avaliação da Mobilidade (Mob2) pós-descongelação.

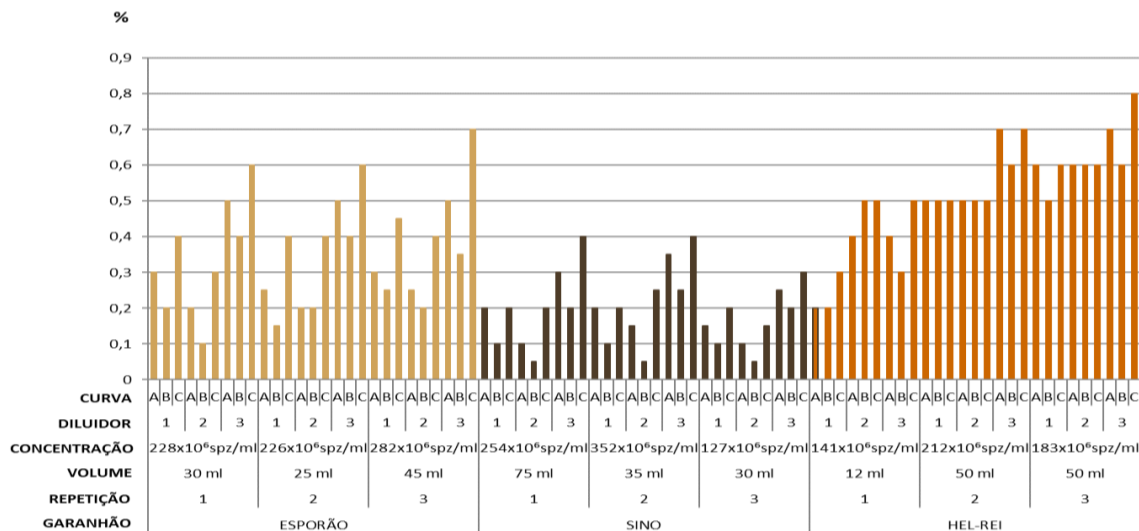


Gráfico 2 - Avaliação da Vitalidade (Vit2) pós-descongelação

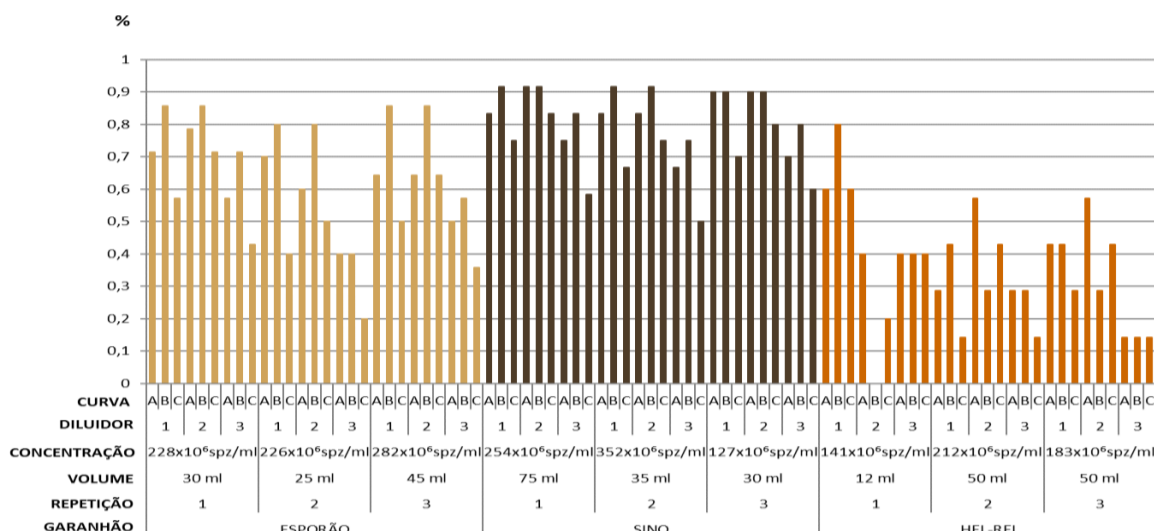


Gráfico 3 - Avaliação da Perda de Mobilidade (Perda) pós-descongelamento.

O diluidor influenciou a Mob2 ($P \leq 0,05$), Vit2 ($P \leq 0,001$) e a Perda de Mobilidade ($P \leq 0,01$) após descongelamento.

Tabela 1 - ANOVA: Efeito do diluidor e curva de arrefecimento.

Fonte	gl	Mob2	Vit2	Perda
Diluidor	2	0.21167 *	0.48895 ***	0.55263 **
Curva	2	0.14130 ?	0.28265 **	0.38238 *
Erro	76	1.74259	2.03012	3.73252

Notas: ? = 0,0517

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

A curva de arrefecimento influenciou a Mob2 ($P=0,052$), Vit2 ($P \leq 0,01$) e a Perda de Mobilidade ($P \leq 0,05$).

Tabela 2 - Médias por diluidor e por curva de arrefecimento.

	Mob2	Vit 2	Perda
D1	0.22407 a	0.29815 a	0.64665 a
D2	0.21852 a	0.29815 a	0.64215 a
D3	0.32963 b	0.46296 b	0.46922 b
C1	0.24074 ab	0.34815 ab	0.61393 a
C2	0.21667 b	0.28333 b	0.65265 a
C3	0.31481 a	0.42778 a	0.49145 b

Nota: médias ladeadas por letra igual não diferem entre si (Duncan, $\alpha=0,05$).

O diluidor 3 (D3) apresentou os melhores resultados, sendo diferentes dos outros dois diluidores que não diferiram entre si ($P < 0,05$).

A pior curva de arrefecimento foi a B (C2) que apresentou valores muito baixos de mobilidade e vitalidade, sendo que os melhores resultados verificaram-se para a curva C (C3) ($P < 0,05$).

As diferenças entre diluidores à base de gema de ovo ou à base de leite e seus crioprotectores (% de glicerol, DMSO, entre outros) podem estar na origem de tais resultados.

Os resultados obtidos relativamente aos parâmetros avaliados, apresentam-se melhores para o caso do D3 (nome comercial Botucrio[®]), o que está de acordo com os trabalhos de outros autores, nomeadamente Candeia (2010).

Em relação às curvas de arrefecimento, a curva C3 (30 minutos no frio a 4°C e 20 minutos em vapores de azoto), foi a que apresentou os melhores resultados para os parâmetros da mobilidade e vitalidade e que explica aparentemente o porquê dos SPZ não gostarem de estar muito tempo no frio (4°C). Em 1984, Cochran e colegas, também referem um protocolo de arrefecimento, no qual a fase inicial de arrefecimento é bastante rápida. Por outro lado, Salazar *et al.*, (2011), refere melhores resultados com um arrefecimento lento por comparação com um arrefecimento rápido. Um outro protocolo refere um tempo de arrefecimento a 5°C, de 2,5h, e só depois proceder ao enchimento das respetivas palhinhas (Heitland *et al.*, 1996).

O nosso estudo evidenciou também um efeito significativo da *idade* sobre a generalidade das características espermáticas analisadas. Squires, Picket e Amann (1979) verificaram que a idade do garanhão afeta o volume total do ejaculado, o volume de filtrado e o pH do esperma sem que ocorram variações na mobilidade e na concentração espermáticas. Para estes dois últimos parâmetros, os nossos resultados estão de acordo com o por ele descrito.

Observa-se, assim, na literatura falta de unanimidade quanto ao efeito da idade sobre os parâmetros seminais nos equinos. As dissemelhanças serão, naturalmente, resultado dos animais e respetivas raças utilizadas e das condições experimentais, incluindo a latitude onde os trabalhos são desenvolvidos. No entanto, é comumente aceite que o efeito da idade se prende com a ineficiência da espermatogénese ainda durante a puberdade e com a degenerescência testicular associada ao envelhecimento.

A relação inversa entre o volume e a concentração espermática afigura-se lógica uma vez que a produção total de espermatozoides é constante.

A relação direta entre a vitalidade e a morfologia normal das células parece sugerir uma qualidade global da espermatogénese. A relação direta entre a concentração e a mobilidade espermáticas e a relação inversa entre o volume e a mobilidade parecem traduzir meramente a subjetividade intra-observador inerente à avaliação da mobilidade por microscopia. Com efeito, mesmo mantendo constante o volume das gotas a observar, em espermias mais concentradas a mobilidade tende a ser sobrestimada relativamente aos menos concentrados.

As membranas (acrossómica e plasmática) do espermatozóide são sensíveis ao “choque térmico”, termo utilizado para designar uma combinação de danos celulares que afetam a integridade e funcionalidade da célula (Amann e Graham, 1993). Nos garanhões, a situação é crítica na gama de temperaturas entre os 19°C e os 8°C (Moran *et al.*, 1992), ocorrendo perda de integridade das membranas plasmática e acrossómica com consequente perda de componentes intra-celulares e redução da mobilidade.

Estudos conduzidos em esperma sujeito a congelação/descongelação (Samper, Hellander e Crabo, 1991; Wilhelm, Graham e Squires, 1996; Kirk, Squires e Graham, 2005) não evidenciaram correlações significativas entre a fertilidade e a mobilidade do esperma logo após descongelamento. No geral, a qualidade do esperma em garanhões Lusitanos é similar à de outras raças, sendo compatível com as técnicas de inseminação artificial a fresco e de refrigeração de sêmen. Contudo, é importante manipular o esperma de forma a preservar o seu poder fecundante.

Nos PSL, a mobilidade dos espermatozoides não se altera quando um, dois ou mais saltos são necessários para a ejaculação, verificando-se correlações elevadas e significativas entre a mobilidade do sêmen em natureza e o sêmen diluído, observaram-se correlações entre as mobilidades, nos diferentes períodos considerados, e os parâmetros vitalidade e morfologia espermáticas.

Contudo, pouco se sabe acerca das características espermáticas na raça Lusitana e da aptidão do esperma para suportar as baixas temperaturas de conservação utilizadas na tecnologia de sêmen congelado.

Em suma, os resultados obtidos evidenciam a influência do fator *indivíduo* sobre os parâmetros seminais, o que reforça a importância do conhecimento individual do garanhão para a correta aplicação do manejo reprodutivo e da tecnologia que sobre o sêmen seja aplicada. As variações observadas entre ejaculados de um mesmo indivíduo realçam a insuficiência da análise de um só ejaculado na avaliação do potencial de fertilidade de um

garanhão, apresentando valores médios distintos para a generalidade dos parâmetros espermáticos.

Os resultados obtidos mostraram claramente uma variabilidade entre ejaculados do mesmo indivíduo sendo importante, para a nossa latitude, diferenças sazonais na qualidade espermática. Estas diferenças poderão ter implicações não só na avaliação da qualidade do esperma de animais mas também quanto à recolha de sêmen em diferentes alturas do ano para crioconservação e posterior utilização em IA. De facto, em equinos (Janett *et al.*, 2003), assim como noutras espécies de reprodução sazonal (D'Alessandro e Martemucci, 2003), a resposta dos espermatozóides à congelação/descongelação apresenta variações com a sazão, possivelmente devido à qualidade inicial do sêmen.

Resultados preliminares obtidos por Agrícola *et al.* (2009) apontam para que a melhor época para congelar esperma de cavalos PSL seja o Inverno/Primavera.

Já Wrench *et al.*, (2010) ao estudarem os efeitos da sazonalidade (latitude 36-37°N) na qualidade do esperma fresco e congelado concluíram que os espermatozóides recolhidos entre Março e Junho apresentavam melhor qualidade pós descongelação do que os recolhidos na outra estação. No geral, a nossa experiência com congelamento de sêmen reitera o conhecimento de que a congelabilidade do sêmen de garanhão depende muito do indivíduo.

5. Conclusão

O padrão espermático da raça Puro Sangue Lusitano não se encontra definido pelo que os espermogramas efetuados são comparados com os valores estabelecidos para outras raças equinas. Apesar de estarem designados valores considerados normais para a espécie, parece-nos extremamente importante caracterizar o padrão espermático na medida em que diferenças significativas entre raças têm sido referidas por diversos autores (Dowset e Patie, 1987; Parlevliet e Colenbrander, 1999; Parlevliet, Kemp Colenbrander, 1994), nomeadamente quanto ao volume do ejaculado, mobilidade e concentração espermáticas (Dowset e Patie, 1982; Dowset e Knot, 1996; Paccamonti *et al.*, 1999), características estas de grande relevo nos programas de inseminação artificial e de conservação de esperma.

Em suma, reveste-se de importância não só avaliar a qualidade de um ejaculado, comparando os valores de cada parâmetro espermático com o padrão da raça, como também avaliar a capacidade de utilização em programas de inseminação artificial.

Os procedimentos a adotar para aceder ao potencial de fertilidade de um garanhão têm sido alvo de intenso debate não só entre a comunidade científica mas também entre técnicos e equinicultores pois nem sempre o desejável é compatível com o exequível. Se uns advogam a análise de um mínimo de dois ejaculados obtidos consecutivamente com uma hora de intervalo outros há que defendem que, a par da anterior, se deveria ainda recolher um ejaculado por dia, durante 6 a 7 dias. Esta última abordagem provê mais informação e permite inferir a produção diária de espermatozóides e, conseqüentemente, o número de fêmeas que poderão ser beneficiadas (Pickett, 1993).

Na espécie equina, a idade à puberdade é atingida entre as 56 e as 97 semanas de vida, sendo as 83 semanas apontadas como a idade mais comum (Naden, Amann e Squires, 1990). Já a maturidade sexual é atingida 2 a 4 anos mais tarde (Amann, 1993) e apesar de o tamanho testicular e de a produção diária de espermatozóides aumentar ainda depois da puberdade, segundo Johnson, Varner e Thompson (1991), a produção diária de espermatozóides permanece, para a maior parte dos garanhões, mais ou menos constante entre os 4 e os 20 anos de idade.

Já para Lopate, Le Blanc e Knottenbelt (2003), a produção espermática aumenta com a idade do macho no período pós-púbere até à maturidade sexual, vindo a diminuir em cerca de 35% a partir dos 13 anos de idade. Dowsett e Pattie (1987) também observaram um declínio no número total de espermatozóides (NTE) produzidos concomitantemente com um aumento no número de espermatozóides mortos e na percentagem de células

morfologicamente alteradas em animais com 14 anos de idade comparativamente com animais mais jovens (3 a 13 anos).

O objetivo do trabalho apresentado foi estudar as características espermáticas de garanhões da raça PSL. Com isto pretendemos contribuir para a definição dos parâmetros seminais nesta raça e para a avaliação da aptidão do esperma para congelação e utilização em programas de inseminação artificial.

6. Considerações Finais

Este meu estágio veio na continuidade do trabalho realizado aquando do estágio da minha licenciatura, mostrando-se uma vez mais de extrema importância, pois mais uma vez estagiei na área que realmente me fascina e à qual quero dedicar a minha vida profissional futura.

Terminada mais esta fase curricular, mas não a última ..., resta-me a certeza de que optei por o estágio certo sendo contudo necessário manter-me informado e atualizado através de uma formação contínua de modo a executar as minhas funções de forma mais adequada e cientificamente mais correta.

Aprender e trabalhar com o excelente profissional, colega e amigo, Prof. Pedro Pinto Bravo, foi aliciante e contribuiu para alargar os meus conhecimentos no Mundo da reprodução em equinos.

Estou certo de que utilizarei os conhecimentos adquiridos o melhor possível, pelo que me sinto capaz de intervir nesta área clínica de equinos.

7. Referências Bibliográficas

AGRÍCOLA, R., CHAVEIRO, A., ROBALO SILVA, J., LOPES DA COSTA, L.F., HORTA, A.E.M., MOREIRA DA SILVA, F. - Seasonal semen freezeability from Lusitano stallions using flow-citometry. In: 60th Annual Meeting of the European Association for Animal Production; 2009 Aug 24-29; Barcelona, Spain. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2009. pp. 307.

AMANN, R. P. - Physiology and Endocrinology. In: McKinnon, AO; Voss, JL, eds. Equine Reproduction. Philadelphia: Willians & Wilkins; 1993b. ISBN 0-8121-1427-2. pp.658-685.

AMANN, R. P., GRAHAM, J. K. - Spermatozoal function. In: McKinnon, AO; Voss, JL, eds. Equine Reproduction. Philadelphia: Willians & Wilkins; 1993. ISBN 0-8121-1427-2. 715-745.

AMBROSINI, G., ANDRISANI, A., PORCU, E., REBELLATO, E., REVELLI, A., CASERTA, D., ... MOSCARINI, M. (2006). Oocytes cryopreservation: State of art. *Reproductive Toxicology*, 22(2), 250-262.

BARRISCO, M. J. V. V. (1984) - O sêmen equino: obtenção, exame, valorização, conservação e utilização. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica - Equinocultura. Tese - Universidade de Évora: Departamento de Zootecnia Pecuária: Equinocultura - Reprodução animal.

BIELAŃSKI, W., KACZMARSKI, F. - Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*. ISSN 0449-3087. 27 (1979), 39-45.

BLANCHARD, T. L., VARNER, D. D., SCHUMACHER, J. (1998) - Manual of Equine Reproduction. Missouri: Mosby Publishing. ISBN 0-8151-4378-8.

BLOOM, E. - A one minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertility and Sterility*. ISSN 0015-0282. 1 (1950b), 176-177.

BPGA. (2007). Banco Português de Germoplasma Animal.

BRINSKO, S., VARNER, D. D., BLANCHARD, T. L. (2011) - "Transported Equine Semen", *Recent Advances in Equine Reproduction*, B. A. Ball Ed.

BROCKBANK, K., & TAYLOR, M. (2007). Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Advances in Biopreservation*, 5(3), 157-196.

BURNS, P. J., DOUGLAS, R. H. (1975) - Reproductive hormone concentrations in stallions with breeding problems: Case studies Original Research Article *Journal of Equine Veterinary Science*, Volume 5, Issue 1.

BRITO, L. F. C. - Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*. ISSN 1534-7516. 6:4 (2007), 249-264.

CANDY, C. J., WOOD, M. J., & WHITTINGHAM, D. G. (1997). Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J Reprod Fertil*, 110(1), 11-19.

CANDEIAS, M. L. (2010) - *Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Niteroi: Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense.

CARVALHAIS, I., MARQUES, C. C., BAPTISTA, M. C., VASQUES, M. I., HORTA, A., & PEREIRA, R. (2006). Effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) on post-thaw viability of biopsied bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(4), 334-335.

CASEY, P. J., HILLMAN, R. B., ROBERTSON, K. R., YUDIN, A. I., LIU, I. K., DROBNIS, E. Z. - Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *Journal of Andrology*. ISSN 0196-3635. 14:4 (1993), 289-297.

CHENIER, T. S. (2009) - *Anatomy and Physical Examination of the Stallion*. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Saunders Elsevier:2ª edição. p. 1-16.

CLAYTON, H. M.; FLOOD, P. F. (1997) - *Atlas Colorido de Anatomia Aplicada dos Grandes Animais*.

COCHRAN J. D., AMANN R. P., FROMAN D. P., PICKETT B. W. (1984) - Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, Volume 22, Issue 1, Pages 25-38.

D'ALESSANDRO, A. G., MARTEMUCCI, G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Animal Reproduction Science*. ISSN 0378-4320. 79 (2003), 93-102.

DAVIS-MOREL, M. C. G. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 1st edition, London: CABI International, 1999. ISBN 978-1-84593-450-7. pp. 82-87.

DOTT, H. M. - Morphology of stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. ISSN 0449-3087. 23 (1975), 41-6.

DOWSETT, K. F., PATTIE, W. A. - Variation in characteristics of stallion semen caused by breed, age, season of year and service frequency. *J. Reprod. Fertil.* 35 (1987), 645-647.

DOWSETT, K. F., PATTIE, W. A. - Characteristics and fertility of stallion semen. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. ISSN 0449-3087. 32 (1982), 1-8.

DOWSETT, K. F., KNOTT, L. M. - The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology*. ISSN 0093- 691X. 46 (1996), 397-412.

EDRIS, F., BAGHDADI, S., & FARES, A. (2014). Compared to Vitrification , Slow Freezing Technique is Associated With a Higher Post- Thawed Embryos Survival and Clinical Pregnancy Rates . Is This a Myth or a Fact ? *Med J Obstet Gynecol*, 2(4), 1047.

FARIA, M. M. (1991) - *Inseminação Artificial em Equinos*. Escola Superior Agrária de Coimbra. Coimbra. Portugal.

FERREIRA DIAS, G., CLAUDINO, F., CARVALHO, H., AGRICOLA, R., ALPOIM-MOREIRA, J., ROBALO SILVA, J. (1998) - "Transition from anestrus into the breeding season in lusitano mares". *Domestic Animal Endocrinology*.

HEITLAND A. V., JASKO D. J., SQUIRES E. L., GRAHAM J. K., PICKET B. W. and HAMILTON C. (1996) - *Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa*. *Equine Veterinary Journal*.

HERMO, L., PELLETIER, R. M., CYR, D. G., SMITH, C. E. - Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: changes in

spermatid organelles associated with development of spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*. ISSN 1097-0029. 73:4 (2010a), 279-319

HURTGEM, J. P. (2009) - Breeding Management of the Warmblood Stallion. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Saunders Elsevier: 2ª edição. p. 83-88.

HURTGEM J. P. (2009) - Semen Collection in Stallions. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Saunders Elsevier: 2ª edição. p. 33-40.

JAIN, J. K., & PAULSON, R. J. (2006). Oocyte cryopreservation. *Fertility and Sterility*, 86(4 SUPPL.), 1037-1046.

JANETT, F., THUN, R., NIEDERER, K., BURGER, D., HASSIG, M. - Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology*. ISSN 0093-691X. 60:3 (2003a), 453-461.

JOHNSON, L., VARNER, D. D., ROBERTS, M. E., SMITH, T. L., KEILLOR, G. E., SCRUTCHFIELD, W. L. - Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science*. ISSN 0378-4320. 60-61 (2000), 471-480.

JOHNSON, L., THOMPSON, D. L. - Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population. daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone. luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biology of Reproduction*. ISSN 0006-3363. 29:3 (1983), 777-789.

KIRK, E. S., SQUIRES, E. L., GRAHAM, J. K. - Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology*. ISSN 0093-691X. 64:6 (2005), 1422-1439.

LAI, D., DING, J., SMITH, G. W., SMITH, G. D., & TAKAYAMA, S. (2015). Slow and steady cell shrinkage reduces osmotic stress in bovine and murine oocyte and zygote vitrification. *Human Reproduction*, 30(1), 37-45.

LIEBERMANN, J. (2002). Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. *Biology of Reproduction*, 67(6), 1671-1680.

LOPATE, C., LE BLANC, M., KNOTTENBELT, D. - The stallion. In: *Equine stud farm medicine and surgery*. China: Elsevier Science Limited, 2003. ISBN 07020- 2130-X. pp. 43-112.

KUWAYAMA, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*, 67(1), 73-80.

MACHADO, S. (2011). Criopreservação de tecido ovárico no Banco Português de Germoplasma Animal : contributo para a recuperação de raças em risco de extinção

MANDAWALA, A. A., HARVEY, S. C., ROY, T. K., & FOWLER, K. E. (2016). Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*, 86(7), 1637–1644.

MARQUES, C. C., BAPTISTA, M. C., VASQUES, M. I., HORTA, A. E. M., & PEREIRA, R. M. (2007). Effect of Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) on Bovine Oocyte In Vitro Maturation and Subsequent Embryo Development and Freezability, 42, 2007.

MATOS, J. E., MARQUES, C. C., MOURA, T. F., BAPTISTA, M. C., HORTA, A. E. M., SOVERAL, G., & PEREIRA, R. M. L. N. (2015). Conjugated linoleic acid improves oocyte cryosurvival through modulation of the cryoprotectants influx rate. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 60.

MCDONNELL, Sue M. (2009) - Stallion Sexual Behavior. Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Saunders Elsevier: 2ª edição. p. 41-46.

MCKINNON, A. O., VOSS, J. L. - Equine Reproduction, Williams & Wilkins; 1993; USA.

MIES Filho A. - Reprodução dos animais domésticos e Inseminação Artificial. 6ªed. Porto Alegre: Sulina, 1987.

MILENKOVIC, M. (2011). *Experimental Studies on Ovarian Cryopreservation~ and Transplantation*.

MILLER, D., BRINKWORTH, M., ILES, D. - Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetic. *Reproduction*. ISSN 1470-1626. 139 (2010), 287-301.

MORAN, D. M., JASKO, D. J., SQUIRES, E. L., AMANN, R. P. - Determination of temperature and cooling rate which induce cold-shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*. ISSN 0093-691X. 38 (1992), 291-304.

NADEN, J., AMANN, R. P., SQUIRES, E. L. - Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*. ISSN 0022- 4251. 88:1 (1990), 167-176.

NAKANISHI, Y., SHIRATSUCHI, A. - Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. ISSN 0918-6158. 27:1 (2004), 13-16.

NEBE-VON-CARON, G., STEPHENS, P. J., HEWITT, C. J., POWELL, J. R., BADLEY, R. A. - Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*. ISSN 0167-7012. 42:1 (2000), 97-114.

OLIVIA, J. L. - Protaines and male infertility. *Human Reproduction Update*. ISSN 1355-4786. 12:4 (2006), 417-435

PACCAMONTI, D. L., BUITEN, A.V., PARLEVLIET, J.M., COLENBRANDER, B. - Reproductive parameters of miniature stallions. *Theriogenology*. ISSN 0093-691X. 51:7 (1999), 1343-1349.

PARLEVLIET, J. M., COLENBRANDER, B. - Prediction of first season stallion fertility of 3-year-old Dutch Warmbloods with prebreeding assessment of percentage of morphologically normal live sperm. *Equine Veterinary Journal*. ISSN 0737-0806. 31:3 (1999), 248-251.

PARLEVLIET, J. M., KEMP, B., COLENBRANDER, B. - Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*. ISSN 0022-4251. 101:1 (1994), 183-187.

PAYNTER, S. J. (2000). Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Human Reproduction Update*, 6(5), 449-56.

PEREIRA, R. M., & MARQUES, C. C. (2008). Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and Tissue Banking*, 9(4), 267-277.

PICKETT, B.W. - Factors affecting sperm production and output. In: McKinnon, AO; Voss, JL, eds. *Equine Reproduction*. 1st ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1993a. ISBN 0-8121-1427-2. pp. 689-704.

PICKETT, B.W. - Reproductive evaluation of the stallion. In: McKinnon, AO; Voss, JL, eds. Equine Reproduction. 1st ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1993b. ISBN 0-8121-1427-2. pp.755-768.

RODRIGUES, A. P. R., AMORIM, C. A., COSTA, S. H. F., MATOS, M. H. T., SANTOS, R. R., LUCCI, C. M., ... FIGUEIREDO, J. R. (2004). Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal Reproduction Science*, 84(1-2), 211-227.

SALAZAR JR J. L., TEAGUE S. R., LOVE C. C., BRINSKO S. P., BLANCHARD T. L., VARNER D. D. (2011) - Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm - *Theriogenology*, Volume 76, Issue 3, Pages 409-418.

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

SAMPER, J. (2009) - Uterine Edema in the Mare. Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Saunders Elsevier: 2ª edição. p. 133-138.

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. C., HELLANDER, J. C., CRABO, B. G. - Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion and semen quality. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. ISSN 0449-3087. 44 (1991), 107-114.

SANTOS, R. R., CELESTINO, J. J. D. H., LOPES, C. A. P., MELO, M. A. P., RODRIGUES, A. P. R., & FIGUEIREDO, J. R. (2008). Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32(1), 9-15.

SHAW, J. M., & JONES, G. M. (2003). Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 9(6), 583-605

SILVA, C. (2015). *Criopreservação de oócitos : efeito de diferentes protocolos na viabilidade pós-vitrificação.*

SIMÕES, J. M. C. - Fisiologia da Reprodução dos Ungulados Domésticos. ed. Lisboa: F. C. Gulbenkian; 1984. ISBN 9789723101478.

SQUIRES, E. L., PICKET, B. W., AMANN, R. P. - Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. ISSN 0449-3087. 27 (1979), 7-12.

STACHECKI, J. J., COHEN, J., SCHIMMEL, T., & WILLADSEN, S. M. (2002). Fetal development of mouse oocytes and zygotes cryopreserved in a nonconventional freezing medium. *Cryobiology*, 44(1), 5-13.

SWAIN, J. E., & SMITH, G. D. (2010). Fertility Cryopreservation. *Fertility Cryopreservation*, 24-38.

TOBERGTE, D. R., & CURTIS, S. (2013). *Cryopreservation. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).

UMPHENOUR, N. W.; STEINER, J. V. (2009) - Breeding Management of the Thoroughbred Stallion. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Saunders Elsevier: 2ª edição. p. 75-81.


WILHELM, K. M., GRAHAM, J. K., SQUIRES, E. L. - Comparison of the fertility of cryopreserved stallion sperm with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology*. ISSN 0093-691X. 46 (1996), 559-578.

WRENCH, N., PINTO, C. R., KLINEFELTER, G. R., DIX, D. J., FLOWERS, W. L., FARIN, C. E. - Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Animal Reproduction Science*. ISSN 0378-4320. 119:3-4 (2010), 219-227.

Anexos

TABELA DE CONVERSÃO DA ABSORVÂNCIA EM [SPZ]
 $(Y = 1409,1X + 28,333)$

Abs	[SPZ]	Vol 200x10 ⁶	Abs	[SPZ]	Vol 200x10 ⁶
0,01	42	4,71	0,51	747	0,27
0,02	57	3,54	0,52	761	0,26
0,03	71	2,83	0,53	775	0,26
0,04	85	2,36	0,54	789	0,25
0,05	99	2,02	0,55	803	0,25
0,06	113	1,77	0,56	817	0,24
0,07	127	1,58	0,57	832	0,24
0,08	141	1,42	0,58	846	0,24
0,09	155	1,29	0,59	860	0,23
0,10	169	1,18	0,60	874	0,23
0,11	183	1,09	0,61	888	0,23
0,12	197	1,01	0,62	902	0,22
0,13	212	0,95	0,63	916	0,22
0,14	226	0,89	0,64	930	0,22
0,15	240	0,83	0,65	944	0,21
0,16	254	0,79	0,66	958	0,21
0,17	268	0,75	0,67	972	0,21
0,18	282	0,71	0,68	987	0,20
0,19	296	0,68	0,69	1001	0,20
0,20	310	0,64	0,70	1015	0,20
0,21	324	0,62	0,71	1029	0,19
0,22	338	0,59	0,72	1043	0,19
0,23	352	0,57	0,73	1057	0,19
0,24	367	0,55	0,74	1071	0,19
0,25	381	0,53	0,75	1085	0,18
0,26	395	0,51	0,76	1099	0,18
0,27	409	0,49	0,77	1113	0,18
0,28	423	0,47	0,78	1127	0,18
0,29	437	0,46	0,79	1142	0,18
0,30	451	0,44	0,80	1156	0,17
0,31	465	0,43	0,81	1170	0,17
0,32	479	0,42	0,82	1184	0,17
0,33	493	0,41	0,83	1198	0,17
0,34	507	0,39	0,84	1212	0,17
0,35	522	0,38	0,85	1226	0,16
0,36	536	0,37	0,86	1240	0,16
0,37	550	0,36	0,87	1254	0,16
0,38	564	0,35	0,88	1268	0,16
0,39	578	0,35	0,89	1282	0,16
0,40	592	0,34	0,90	1297	0,15
0,41	606	0,33	0,91	1311	0,15
0,42	620	0,32	0,92	1325	0,15
0,43	634	0,32	0,93	1339	0,15
0,44	648	0,31	0,94	1353	0,15
0,45	662	0,30	0,95	1367	0,15
0,46	677	0,30	0,96	1381	0,14
0,47	691	0,29	0,97	1395	0,14
0,48	705	0,28	0,98	1409	0,14
0,49	719	0,28	0,99	1423	0,14
0,50	733	0,27	1,00	1437	0,14

	Avaliação de espermatozoides em equinos	
	Disciplina de Reprodução Animal Elaborado: Sandra Gamboa	ESAC Página 1 de 3

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ZOOTÉCNICAS
SECTOR DE REPRODUÇÃO ANIMAL

COLHEITA E EXAME DE SÊMEN EQUINO

Nome do Criador: _____
 Nome do Proprietário: _____ Morada: _____

Identificação do Garanhão:
 Nome: _____ Raça: _____ Idade: _____ anos N.L.A.: _____
 Motivo do Exame: _____

Colheita feita sobre: Égua em cio: Manequim
 Método de colheita: _____
 Comportamento perante fêmea em cio (Libido, Excitação, Facilidade de Salto): _____

ESPERMOGRAMA

	VALORES NORMAIS	EJACULADO	Observações
1- VOLUME (ml)	30 - 160		
2- ASPECTO	leitoso, branco-gizal		
3- MOBILIDADE (%)	60		
4- CONCENTRAÇÃO (nº SPZ/ml)	100 - 200 x 10 ⁶		
5- pH	6,8 - 7,5		
6- COLORAÇÃO VITAL (%)	> 60		
7- FORMAS NORMAIS (%)	80		
8- FORMAS ANORMAIS (%)	20		
Cabeça (%)	4		
Segmento Intermédio (%)	3		
Cauda (%)	13		

Observações: _____

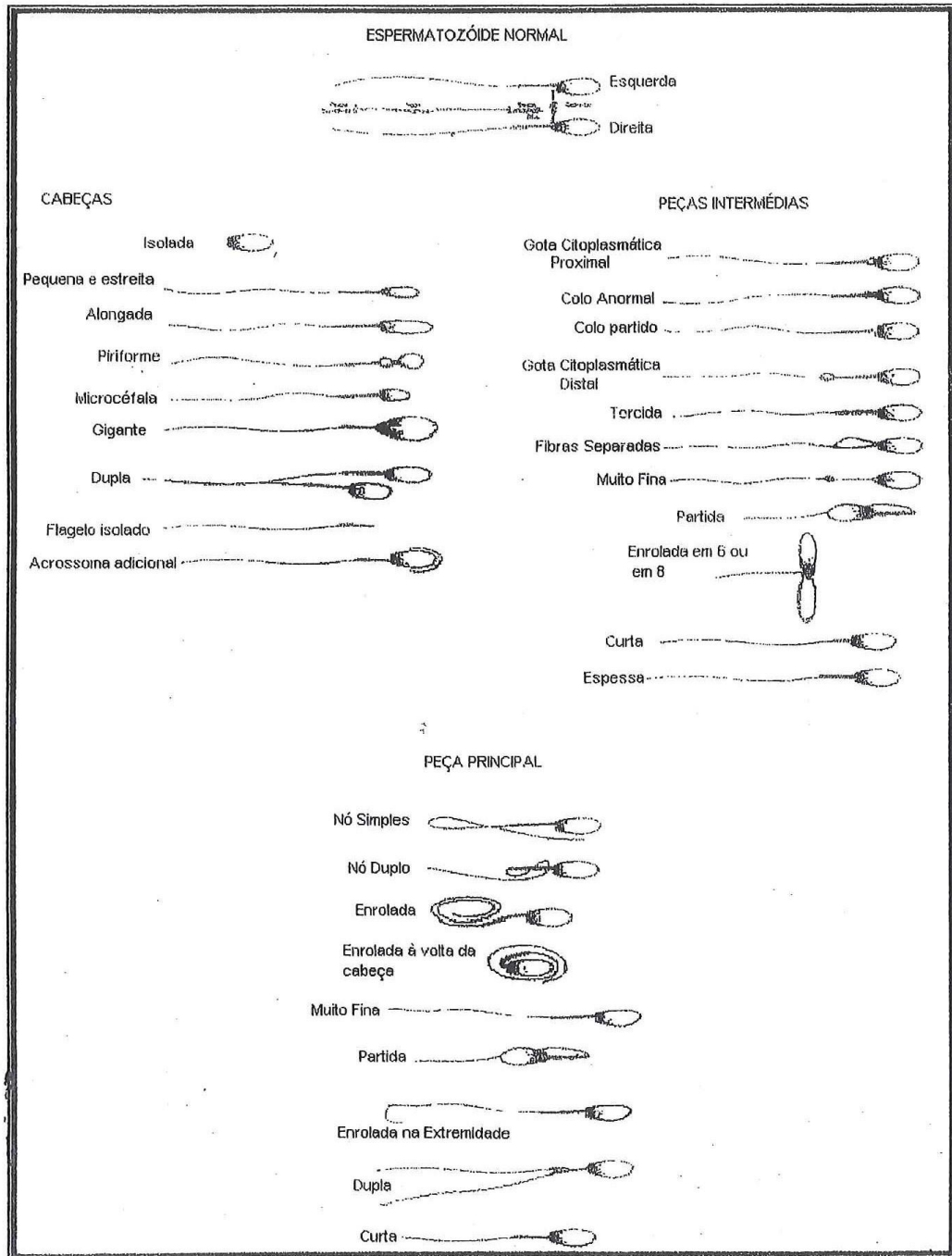
NOTA: A estimativa da fertilidade de um garanhão é um método indirecto. A estimativa mais precisa que se pode fazer é à posteriori, após utilização do animal e através das fecundações obtidas. Existem animais estéreis com características do sêmen aparentemente normais. Só a cobertura natural ou a inseminação artificial poderá revelar estes casos.


Data: ____ / ____ / ____

O Médico Veterinário

ESAC - EQUINICULTURA

CLASSIFICAÇÃO DAS FORMAS ANORMAIS DOS
ESPERMATOZÓIDES DO GARANHÃO



	Avaliação de esperma em equinos	
	Disciplina de Reprodução Animal Elaborado: <i>Sandra Gamboa</i>	ESAC Página 3 de 3

Apreciação da morfologia dos espermatozóides

Nome Garanhão: _____

	Data	Data	Data
A -Cabeça			
Isolada (2)			
Pequena e estreita (1)			
Alongada (1)			
Piriforme (1)			
Microcéfala (1)			
Dupla (1)			
Gigante (1)			
Flagelo isolado (2)			
TOTAL			
B -Peça Intermédia			
Muito fina (1)			
Fibras separadas (5)			
Colo anormal (4)			
Torcida (7)			
Colo partido (5)			
Partida (5)			
Isolada (7)			
Dupla (7)			
Espessa (2)			
Curta (3)			
Gota cit. proximal (1)			
Gota cit. distal (6)			
Enrolada em 6 ou 8 (5)			
TOTAL			
C -Peça Principal			
Nó simples (2)			
Nó duplo (2)			
Enrolada (2)			
Enrolada à volta da cabeça (2)			
Muito fina (3)			
Partida (1)			
Enrolada extremidade (1)			
Dupla (1)			
Curta (3)			
TOTAL			
Acrossoma			

A>B>C

1>2>3>4,...etc

ENSAIO CONGELAÇÃO DE SÊMEN HEL-REI (PSL)

Garanhão: HEL - REI (H)

Data de Nascimento: 2012.04.19

Pelagem: Ruça

T1 - Dia da Colheita / Congelação: 5.06.2017

Hora da Colheita: 10h.30m.

Hora da Congelação: 11h.30m.

Data da Descongelção /Avaliação: 22.06.2017

Hora da Avaliação: 10h.30m.

T2 - Dia da Colheita / Congelação: 7.06.2017

Hora da Colheita: 10h.30m.

Hora da Congelação: 11h.30m.

Data da Descongelção /Avaliação: 22.06.2017

Hora da Avaliação: 14h.30m.

T3 - Dia da Colheita / Congelação: 9.06.2017

Hora da Colheita: 10h.30m.

Hora da Congelação: 11h.30m.

Data da Descongelção /Avaliação: 23.06.2017

Hora da Avaliação: 10h.30m.

GARANHÃO	ENSAIO					ANTES		DEPOIS			
	TEMPO	VOLUME	CONCENTRAÇÃO	DILUIDOR	CURVA	MOBILIDADE	MOBILIDADE	VITALIDADE			
H	1	12 ml	141x10 ⁶ spz/ml	1	A	50%	20%	20%			
					B		10%	20%			
					C		20%	30%			
	2	A	70%	30%	40%						
		B		50%	50%						
		C		40%	50%						
	3	A		30%	30%		40%				
		B			30%		30%				
		C			30%		50%				
	2	50 ml			212x10 ⁶ spz/ml	1	A	70%	50%	50%	
							B		40%	50%	
							C		60%	50%	
			2				A		70%	30%	50%
							B			50%	50%
							C			40%	50%
3			A	50%			50%			70%	
			B				50%			60%	
			C				60%			70%	
3	50 ml	183x10 ⁶ spz/ml	2		A	70%	40%			60%	
					B		40%			50%	
					C		50%			60%	
					2		A		70%	30%	60%
							B			50%	60%
							C			40%	60%
				3	A		60%			60%	70%
					B					60%	60%
					C					60%	80%

Tempos:

T1: Tempo 1

T2: Tempo 2

T3: Tempo 3

Diluidores Congelação:

1 - GENT

2 - INRA FREEZE

3 - BOTUCRIO

Curvas de Arrefecimento:

A - 30' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto

B - 60' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto

C - 30' Frio 4°C + 20' Vapores Azoto

Observações:

Criador: Escola Superior Agrária de Coimbra

Proprietário: Escola Superior Agrária de Coimbra

ENSAIO CONGELAÇÃO DE SÊMEN ESPORÃO (PSL)

Garanhão: ESPORÃO (E)

Pelagem: Isabel

T1 - Dia da Colheita / Congelação: 3.04.2017

Hora da Congelação: 11h.30m.

Data da Descongelação /Avaliação: 4.04.2017

Hora da Avaliação: 14h.30m.

T2 - Dia da Colheita / Congelação: 5.04.2017

Hora da Congelação: 11h.30m.

Data da Descongelação /Avaliação: 24.05.2017

Hora da Avaliação: 16h.30m.

T3 - Dia da Colheita / Congelação: 7.04.2017

Hora da Congelação: 11h.30m.

Data da Descongelação /Avaliação: 26.05.2017

Hora da Avaliação: 15h.30m.

GARANHÃO	ENSAIO				ANTES		DEPOIS	
	TEMPO	VOLUME	CONCENTRAÇÃO	DILUIDOR	CURVA	MOBILIDADE	MOBILIDADE	VITALIDADE
E	1	30 ml	228x10 ⁶ spz/ml	1	A	70%	20%	30%
					B		10%	
					C		30%	
					A		15%	20%
					B		10%	10%
					C		20%	30%
					A		30%	50%
					B		20%	40%
					C		40%	60%
	2	25 ml	226x10 ⁶ spz/ml	1	A	50%	15%	25%
					B		10%	15%
					C		30%	40%
A					20%		20%	
B					10%		20%	
C					25%		40%	
3	45 ml	282x10 ⁶ spz/ml	1	A	70%	25%	30%	
				B		10%	20%	
				C		35%	45%	
				A		25%	25%	
				B		10%	20%	
				C		25%	40%	
3			3	A		35%	50%	
				B		30%	35%	
				C		45%	70%	
				A				
				B				
				C				

Tempos:

T1: Tempo 1

T2: Tempo 2

T3: Tempo 3

Diluidores Congelação:

1 - GENT

2 - INRA FREEZE

3 - BOTUCRIO

Curvas de Arrefecimento:

A - 30' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto

B - 60' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto

C - 30' Frio 4°C + 20' Vapores Azoto

Observações:

Criador: Dr. João Inácio Barata Freixo

Proprietário: Coudelaria Monte de Portugal

ENSAIO CONGELAÇÃO DE SÊMEN SINO (PSL)

Garanhão: SINO (S)

Pelagem: Ruça

T1 - Dia da Colheita / Congelação: 29.05.2017

Data de Nascimento: 1999.03.15

Data da Descongelação /Avaliação: 19.06.2017

Hora da Congelação: 11h.30m.

Hora da Avaliação: 16h.30m.

T2 - Dia da Colheita / Congelação: 31.05.2017

Hora da Colheita: 10h.30m.

Data da Descongelação /Avaliação: 21.06.2017

Hora da Congelação: 11h.30m.

Hora da Avaliação: 12h.30m.

T3 - Dia da Colheita / Congelação: 2.06.2017

Hora da Colheita: 10h.30m.

Data da Descongelação /Avaliação: 21.06.2017

Hora da Congelação: 11h.30m.

Hora da Avaliação: 16h.00m.

GARANHÃO	TEMPO	VOLUME	ENSAIO			ANTES		DEPOIS	
			CONCENTRAÇÃO	DILUIDOR	CURVA	MOBILIDADE	MOBILIDADE	VITALIDADE	
S	1	75 ml	254x10 ⁶ spz/ml	1	A	60%	10%	20%	
					B		5%	10%	
					C		15%	20%	
					A		5%	10%	
					B		5%	5%	
					C		10%	20%	
	2	A	60%	15%	30%				
		B		10%	20%				
		C		25%	40%				
	2	35 ml	352x10 ⁶ spz/ml	1	A	60%	10%	20%	
					B		5%	10%	
					C		20%	20%	
A					10%		15%		
B					5%		5%		
C					15%		25%		
3	A	60%	20%	35%					
	B		15%	25%					
	C		30%	40%					
3	30 ml	127x10 ⁶ spz/ml	1	A	50%	5%	15%		
				B		5%	10%		
				C		15%	20%		
				A		5%	10%		
				B		5%	5%		
				C		10%	15%		
3	A	50%	15%	25%					
	B		10%	20%					
	C		20%	30%					

Tempos:

- T1: Tempo 1
- T2: Tempo 2
- T3: Tempo 3

Diluidores Congelação:

- 1 - GENT
- 2 - INRA FREEZE
- 3 - BOTUCRIO

Curvas de Arrefecimento:

- A - 30' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto
- B - 60' Frio 4°C + 10' Vapores Azoto
- C - 30' Frio 4°C + 20' Vapores Azoto

Observações:

Criador: Estado Português - Coudelaria de Alter
Proprietário: Escola Superior Agrária de Coimbra

The SAS System

12:02 Saturday, September 21, 2017 20

Obs	GAR	REP	VOL	CONC	DIL	CRV	MOB1	MOB2	VIT	PERDA
1	E	1	30	228	1	A	0.7	0.20	0.30	0.71429
2	E	1	30	228	1	B	0.7	0.10	0.20	0.85714
3	E	1	30	228	1	C	0.7	0.30	0.40	0.57143
4	E	1	30	228	2	A	0.7	0.15	0.20	0.78571
5	E	1	30	228	2	B	0.7	0.10	0.10	0.85714
6	E	1	30	228	2	C	0.7	0.20	0.30	0.71429
7	E	1	30	228	3	A	0.7	0.30	0.50	0.57143
8	E	1	30	228	3	B	0.7	0.20	0.40	0.71429
9	E	1	30	228	3	C	0.7	0.40	0.60	0.42857
10	E	2	25	226	1	A	0.5	0.15	0.25	0.70000
11	E	2	25	226	1	B	0.5	0.10	0.15	0.80000
12	E	2	25	226	1	C	0.5	0.30	0.40	0.40000
13	E	2	25	226	2	A	0.5	0.20	0.20	0.60000
14	E	2	25	226	2	B	0.5	0.10	0.20	0.80000
15	E	2	25	226	2	C	0.5	0.25	0.40	0.50000
16	E	2	25	226	3	A	0.5	0.30	0.50	0.40000
17	E	2	25	226	3	B	0.5	0.30	0.40	0.40000
18	E	2	25	226	3	C	0.5	0.40	0.60	0.20000
19	E	3	45	282	1	A	0.7	0.25	0.30	0.64286
20	E	3	45	282	1	B	0.7	0.10	0.25	0.85714
21	E	3	45	282	1	C	0.7	0.35	0.45	0.50000
22	E	3	45	282	2	A	0.7	0.25	0.25	0.64286
23	E	3	45	282	2	B	0.7	0.10	0.20	0.85714
24	E	3	45	282	2	C	0.7	0.25	0.40	0.64286
25	E	3	45	282	3	A	0.7	0.35	0.50	0.50000
26	E	3	45	282	3	B	0.7	0.30	0.35	0.57143
27	E	3	45	282	3	C	0.7	0.45	0.70	0.35714
28	S	1	75	254	1	A	0.6	0.10	0.20	0.83333
29	S	1	75	254	1	B	0.6	0.05	0.10	0.91667
30	S	1	75	254	1	C	0.6	0.15	0.20	0.75000
31	S	1	75	254	2	A	0.6	0.05	0.10	0.91667
32	S	1	75	254	2	B	0.6	0.05	0.05	0.91667
33	S	1	75	254	2	C	0.6	0.10	0.20	0.83333
34	S	1	75	254	3	A	0.6	0.15	0.30	0.75000
35	S	1	75	254	3	B	0.6	0.10	0.20	0.83333
36	S	1	75	254	3	C	0.6	0.25	0.40	0.58333
37	S	2	35	352	1	A	0.6	0.10	0.20	0.83333
38	S	2	35	352	1	B	0.6	0.05	0.10	0.91667
39	S	2	35	352	1	C	0.6	0.20	0.20	0.66667
40	S	2	35	352	2	A	0.6	0.10	0.15	0.83333

The SAS System

12:02 Saturday, September 21, 2017 20

Obs	GAR	REP	VOL	CONC	DIL	CRV	MOB1	MOB2	VIT	PERDA
41	S	2	35	352	2	B	0.6	0.05	0.05	0.91667
42	S	2	35	352	2	C	0.6	0.15	0.25	0.75000
43	S	2	35	352	3	A	0.6	0.20	0.35	0.66667
44	S	2	35	352	3	B	0.6	0.15	0.25	0.75000
45	S	2	35	352	3	C	0.6	0.30	0.40	0.50000
46	S	3	30	127	1	A	0.5	0.05	0.15	0.90000
47	S	3	30	127	1	B	0.5	0.05	0.10	0.90000
48	S	3	30	127	1	C	0.5	0.15	0.20	0.70000
49	S	3	30	127	2	A	0.5	0.05	0.10	0.90000
50	S	3	30	127	2	B	0.5	0.05	0.05	0.90000
51	S	3	30	127	2	C	0.5	0.10	0.15	0.80000
52	S	3	30	127	3	A	0.5	0.15	0.25	0.70000
53	S	3	30	127	3	B	0.5	0.1	0.2	0.80000
54	S	3	30	127	3	C	0.5	0.2	0.3	0.60000
55	H	1	12	141	1	A	0.5	0.2	0.2	0.60000
56	H	1	12	141	1	B	0.5	0.1	0.2	0.80000
57	H	1	12	141	1	C	0.5	0.2	0.3	0.60000
58	H	1	12	141	2	A	0.5	0.3	0.4	0.40000
59	H	1	12	141	2	B	0.5	0.5	0.5	0.00000
60	H	1	12	141	2	C	0.5	0.4	0.5	0.20000
61	H	1	12	141	3	A	0.5	0.3	0.4	0.40000
62	H	1	12	141	3	B	0.5	0.3	0.3	0.40000
63	H	1	12	141	3	C	0.5	0.3	0.5	0.40000
64	H	2	50	212	1	A	0.7	0.5	0.5	0.28571
65	H	2	50	212	1	B	0.7	0.4	0.5	0.42857
66	H	2	50	212	1	C	0.7	0.6	0.5	0.14286
67	H	2	50	212	2	A	0.7	0.3	0.5	0.57143
68	H	2	50	212	2	B	0.7	0.5	0.5	0.28571
69	H	2	50	212	2	C	0.7	0.4	0.5	0.42857
70	H	2	50	212	3	A	0.7	0.5	0.7	0.28571
71	H	2	50	212	3	B	0.7	0.5	0.6	0.28571
72	H	2	50	212	3	C	0.7	0.6	0.7	0.14286
73	H	3	50	183	1	A	0.7	0.4	0.6	0.42857
74	H	3	50	183	1	B	0.7	0.4	0.5	0.42857
75	H	3	50	183	1	C	0.7	0.5	0.6	0.28571
76	H	3	50	183	2	A	0.7	0.3	0.6	0.57143
77	H	3	50	183	2	B	0.7	0.5	0.6	0.28571
78	H	3	50	183	2	C	0.7	0.4	0.6	0.42857
79	H	3	50	183	3	A	0.7	0.6	0.7	0.14286
80	H	3	50	183	3	B	0.7	0.6	0.6	0.14286
81	H	3	50	183	3	C	0.7	0.6	0.8	0.14286

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
GAR	3	E H S
REP	3	1 2 3
DIL	3	1 2 3
CRV	3	A B C
Number of Observations Read		81
Number of Observations Used		81

Nota:
Pr > F
 Se > 0,05 = não significativo ("ns")
 0,05 - 0,01 = significativo ("*")
 0,01 - 0,001 = bastante significativo ("**")
 < 0,001 = altamente significativo ("***")

Dependent Variable: MOB1 MOB1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.0000000	0.0000000	0.00	1.0000
Error	76	0.6200000	0.00815789		
Corrected Total	80	0.6200000			
R-Square		Coeff Var	Root MSE	MOB1 Mean	
0.00000		14.77981	0.090321	0.611111	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
DIL	2	0	0	0.00	1.0000
CRV	2	0	0	0.00	1.0000

Dependent Variable: MOB2 MOB2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.35296296	0.08824074	3.85	0.0067
Error	76	1.74259259	0.02292885		
Corrected Total	80	2.09555556			
R-Square		Coeff Var	Root MSE	MOB2 Mean	
0.168434		58.82611	0.151423	0.257407	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
DIL	2	0.21166667	0.10583333	4.62	0.0128
CRV	2	0.14129630	0.07064815	3.08	0.0517

Dependent Variable: VIT VIT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.77160494	0.19290123	7.22	<.0001
Error	76	2.03012346	0.02671215		
Corrected Total	80	2.80172840			
R-Square		Coeff Var	Root MSE	VIT Mean	
0.275403		46.28853	0.163439	0.353086	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
DIL	2	0.48895062	0.24447531	9.15	0.0003
CRV	2	0.28265432	0.14132716	5.29	0.0071

Dependent Variable: PERDA PERDA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	0.93501666	0.23375416	4.76	0.0018
Error	76	3.73251603	0.04911205		
Corrected Total	80	4.66753268			
R-Square		Coeff Var	Root MSE	PERDA Mean	
0.200324		37.81728	0.221612	0.586008	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
DIL	2	0.55263472	0.27631736	5.63	0.0053
CRV	2	0.38238193	0.19119097	3.89	0.0246

The ANOVA Procedure

Duncan's Multiple Range Test for

MOB1

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 76
 Error Mean Square 0.008158
 Number of Means 2 3
 Critical Range .04896 .05151

<u>Duncan Grouping</u>	<u>Mean</u>	<u>N</u>	<u>DIL</u>
A	0.61111	27	1
A	0.61111	27	2
A	0.61111	27	3

MOB2

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 76
 Error Mean Square 0.022929
 Number of Means 2 3
 Critical Range .08208 .08636

<u>Duncan Grouping</u>	<u>Mean</u>	<u>N</u>	<u>DIL</u>
A	0.32963	27	3
B	0.22407	27	1
B	0.21852	27	2

VIT

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 76
 Error Mean Square 0.026712
 Number of Means 2 3
 Critical Range .08859 .09322

<u>Duncan Grouping</u>	<u>Mean</u>	<u>N</u>	<u>DIL</u>
A	0.46296	27	3
B	0.29815	27	1
B	0.29815	27	2

PERDA

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 76
 Error Mean Square 0.049112
 Number of Means 2 3
 Critical Range .1201 .1264

<u>Duncan Grouping</u>	<u>Mean</u>	<u>N</u>	<u>DIL</u>
A	0.64665	27	1
A	0.64215	27	2
B	0.46922	27	3

Means with the same letter are not significantly different.

NOTE: This test controls the Type I comparison wise error rate, not the experiment wise error rate.

The ANOVA Procedure

Duncan's Multiple Range Test for

MOB1

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 76
 Error Mean Square 0.008158
 Number of Means 2 3
 Critical Range .04896 .05151

<u>Duncan Grouping</u>	<u>Mean</u>	<u>N</u>	<u>CRV</u>
A	0.61111	27	A
A	0.61111	27	B
A	0.61111	27	C

MOB2

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 76
 Error Mean Square 0.022929
 Number of Means 2 3
 Critical Range .08208 .08636

<u>Duncan Grouping</u>	<u>Mean</u>	<u>N</u>	<u>CRV</u>
A	0.31481	27	C
A	0.24074	27	A
B	0.21667	27	B

VIT

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 76
 Error Mean Square 0.026712
 Number of Means 2 3
 Critical Range .08859 .09322

<u>Duncan Grouping</u>	<u>Mean</u>	<u>N</u>	<u>CRV</u>
A	0.42778	27	C
A	0.34815	27	A
B	0.28333	27	B

PERDA

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 76
 Error Mean Square 0.049112
 Number of Means 2 3
 Critical Range .1201 .1264

<u>Duncan Grouping</u>	<u>Mean</u>	<u>N</u>	<u>CRV</u>
A	0.65265	27	B
A	0.61393	27	A
B	0.49145	27	C

Means with the same letter are not significantly different.

NOTE: This test controls the Type I comparison wise error rate, not the experiment wise error rate.