

**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**RELATÓRIO DA PROPOSTA DE UNIDADE CURRICULAR**

**TÉCNICAS REPRODUTIVAS EM RUMINANTES E EQUINOS 1: AVALIAÇÃO E  
PROCESSAMENTO DE SÉMEN (3 ECTS)**

**UNIDADE CURRICULAR OPTATIVA**

Elisa Maria Varela Bettencourt

Departamento de Medicina Veterinária

Elaborado como requisito parcial para a prestação de provas públicas de agregação, conforme o artigo 8<sup>a</sup> e a alínea b) do artigo 5<sup>º</sup>, do Decreto-Lei n.º 239/2007 de 19 de junho publicado no Diário da República I serie – N.º 116 – 19 de junho de 2007.

<b>1. Introdução e contextualização.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Enquadramento no plano de estudos.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Técnicas reprodutivas em equinos e ruminantes 1: avaliação e processamento de sémen: ficha da unidade curricular.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1 Resumo.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2 Objetivos .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2 Competências .....</b>	<b>6</b>
<b>3.3 Funcionamento da UC.....</b>	<b>7</b>
<b>3.4 Avaliação .....</b>	<b>7</b>
<b>3.5 Conteúdo programático.....</b>	<b>9</b>
<b>4. Bibliografia .....</b>	<b>38</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>i</b>
<b>Anexo 1 Estrutura curricular Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora .....</b>	<b>i</b>
<b>Anexo 2 Técnicas reprodutivas em ruminantes e equinos 2: Inseminação artificial, produção e criopreservação de embriões: distribuição dos temas.....</b>	<b>iii</b>
<b>Anexo 3: Modelo de ficha de avaliação de apresentação de artigo .....</b>	<b>iv</b>
<b>Anexo 4: Modelo de ficha de avaliação de realização de procedimento prático .....</b>	<b>v</b>

## **1. Introdução e contextualização**

O ensino da reprodução animal, no curso de medicina veterinária, engloba a compreensão da fisiologia reprodutiva nas várias espécies, avaliação de reprodutores, problemas de infertilidade e a obstetrícia. As tecnologias reprodutivas são lecionadas para todas as espécies dando, obviamente, relevo às particularidades de cada uma. Deste modo, observa-se que alunos que queiram aprofundar os seus conhecimentos sobre técnicas reprodutivas de rotina têm, muitas vezes, dificuldades em aprender a realizar tarefas práticas básicas, essenciais para a aplicação de programas de controlo reprodutivo, bem como, para a implementação de programas de melhoramento e conservação genética (Production, 2023; Morrell & Mayer, 2017).

Portugal, sendo um país com uma enorme biodiversidade genética, tem a decorrer programas de conservação e melhoramento genético para as várias raças autóctones, os quais implicam a aplicação de técnicas reprodutivas, ditas de rotina, como a criopreservação de sémen e embriões e a inseminação artificial (Direção Geral de Alimentação e Veterinária, 2017). No entanto, estas técnicas estão longe de se esgotar com a execução destes programas, já que, comercialmente, existem cada vez mais criadores, de raças autóctones e exóticas, que solicitam estes serviços. A Universidade de Évora, enquadrada num meio rural, tem, nos últimos anos, desenvolvido projetos de transferência de tecnologia na área das biotecnologias da reprodução em ruminantes e equinos, sendo perceptível a existência de lacunas na formação dos médicos veterinários nesta área. Assim, torna-se imperativo que esta competência seja transmitida aos alunos de medicina veterinária, não numa perspetiva meramente teórica, mas, efetivamente, num contexto prático de *“hands on”*: aprender fazendo.

Também no âmbito da formação pós-graduada, existem muitos estudantes e investigadores que desenvolvem trabalho de investigação na área das biotecnologias da reprodução, sendo também possíveis interessados na aquisição de competências nestas áreas, o que potencializará a sua capacidade de desenvolvimento de investigação em outras áreas relacionadas. Na universidade de Évora, atualmente, há, pelo menos, 4 doutorandos a realizar trabalho de investigação na área das biotecnologias reprodutivas.

A maior dificuldade no ensino destas matérias prende-se com a disponibilidade de animais para o ensino prático, sobretudo se pensarmos no n.º elevado de alunos em cada unidade curricular nos atuais cursos de medicina veterinária, o que dificulta a realização de aulas práticas em que os estudantes possam realmente realizar os procedimentos. Um exemplo evidente refere-se à avaliação de reprodutores, em que, de acordo com Barth (2018), o maior problema não se relaciona com falta de conhecimento, mas sim com a dificuldade das escolas de medicina veterinária de

disponibilizar equipamento e treino prático adequado, bem como, com a falta de laboratórios de diagnóstico que possibilitem o diagnóstico de casos mais problemáticos.

Os princípios associados ao “Processo de Bolonha” incluem uma alteração da visão do ensino, que implica um envolvimento ativo do estudante, associando, sempre que necessário, o ensino em ambientes fora das tradicionais salas de aula. A existência de protocolos de colaboração com a Coudelaria de Alter (equinos) e com o Centro de Experimentação do Baixo Alentejo (pequenos ruminantes), associada à recente construção de um Centro de Recolha e Congelação de Sémen de Bovinos na Universidade de Évora, Polo da Mitra, possibilita a existência de condições físicas únicas para a realização de aulas práticas de excelência. Além das condições físicas referidas, existem também protocolos de colaboração com várias associações de criadores de ruminantes, as quais permitem aos alunos a realização de atividades em contexto real prático em explorações pecuárias. Num contexto de pós-pandemia, em que algum ensino prático tendeu a ser substituído por ferramentas digitais, torna-se fundamental, na capacitação dos médicos veterinários, a manutenção de aulas práticas efetivas e com possibilidade de contacto físico com a realidade. Essas condições existem na Universidade de Évora e devem ser enaltecidas como uma vantagem competitiva na área do ensino.

A aquisição de conhecimentos e competências práticas que possam aumentar a competitividade e empregabilidade é essencial no contexto atual, onde, o número elevado de médicos veterinários formados anualmente está a contribuir para a emigração de muitos dos nossos jovens em busca de melhores condições de trabalho.

Esta unidade curricular permitirá adquirir várias competências de dia 1, referidas pela EAEVE (*European Association of Establishments for Veterinary Education*) (Education European Association of Establishments For Veterinary & Federation of Veterinarians of Europe, 2019) tais como:

- 1. Trabalhar efetivamente como membro de uma equipa multidisciplinar e de prestação de serviços:** ao longo de todo o trabalho, desenvolvido em equipas pequenas e com trabalho prático efetivo.
- 2. Demonstrar capacidade de lidar com informação incompleta, contingências e adaptação à mudança:** numa unidade curricular fundamentalmente prática, com envolvimento de animais em contexto de Centro de Reprodução em funcionamento, será dada especial importância à capacidade de encontrar soluções concretas para cada situação, responsabilizando o aluno pela execução concreta da tarefa proposta.

3. **Ficar apto a rever e avaliar literatura e apresentações de modo critico:** fará parte da avaliação a apresentação e discussão de um artigo sobre determinado procedimento, devendo ser indicados os procedimentos que podem ser melhorados ou alterados.
4. **Demonstrar reconhecimento pelos limites pessoais e profissionais sabendo quando necessita de pedir conselho, assistência e suporte:** esta situação é claramente estimulada ao lidar com animais de grande porte e que implicam conhecimento e colaboração entre pares.
5. **Demonstrar capacidade e compromisso de aprendizagem e desenvolvimento profissional ao longo da vida, incluindo registar e refletir sobre a experiência profissional, adotando medidas para melhorar a competência e performance:** esta competência será extremamente estimulada através do preenchimento da ficha técnica de campo, a qual inclui uma autoavaliação dos procedimentos.
6. **Tomar parte na autoavaliação e revisão dos processos em grupo de modo a melhorar a performance:** a autoavaliação através da ficha técnica inclui a revisão do trabalho individual e em grupo.
7. **Manipular e conter animais de modo seguro e respeitando o animal, dando instruções aos outros no modo como auxiliar o médico veterinário na realização destas técnicas:** o trabalho quer em coudelaria quer com as associações de criadores, é um trabalho em equipa, com tratadores e auxiliares de veterinária, permitirá o desenvolvimento de competências de manejo e contenção de animais, de modo prático e seguro.
8. **Recolher, preservar e transportar amostras, selecionar os testes de diagnóstico apropriados, interpretar e compreender as limitações dos resultados dos testes:** esta competência será amplamente desenvolvida tendo como modelo a avaliação seminal e a utilização das diferentes metodologias de avaliação disponíveis.
9. **Demonstrar conhecimento sobre a organização, funcionamento e legislação relativa a atividade veterinária como um negócio e direitos do trabalho:** a abordagem da legislação para o licenciamento dos centros de recolha e congelação de sémen contribuirá para a compreensão do processo de criação de uma empresa e procedimentos legais associados, bem como a pesquisa da legislação que suporta todo o procedimento.

## **2. Enquadramento no plano de estudos**

No atual plano de estudos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, existem UCs optativas oferecidas aos alunos do 4º e 5º ano. Propõe-se assim a criação de duas unidades curriculares,

“Técnicas reprodutivas em ruminantes e equinos 1: avaliação e processamento de sémen” e “Técnicas reprodutivas em ruminantes e equinos 2: Inseminação artificial, produção e criopreservação de embriões”, as quais serão oferecidas como optativas (grupo de optativas 2 e 3) aos estudantes do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária no 4º e no 5º ano do Mestrado Integrado (anexo 1). Podem igualmente ser oferecidas como créditos livres ou como competências transversais, mas também a estudantes de doutoramento em Ciências Veterinárias ([Aviso n.º 18293/2022, DR, 2ª Série, nº 184 de 22 de setembro](#)).

O estudante pode frequentar ambas as UCs ou apenas uma, na medida em que, são independentes apesar de relacionadas entre si (9º e 10º semestre). São unidades curriculares de 3 ECTs, correspondendo a 26 horas de aulas teórico-práticas. De referir que, no plano de estudos estas UCs estão colocadas no segundo semestre (fevereiro a maio), correspondendo à época reprodutiva dos equinos e, apesar de não ser a época reprodutiva por excelência, à época em que existem mais atividades de controlo reprodutivo em pequenos ruminantes. Essa calendarização proporciona a interação desejada com os centros de reprodução e com as associações de criadores.

Para efeito de prova de agregação será desenvolvida a Unidade curricular de “**Técnicas reprodutivas em ruminantes e equinos 1: avaliação e processamento de sémen**”. Os temas abordados na UC “Técnicas reprodutivas em ruminantes e equinos 2: inseminação artificial produção e criopreservação de embriões” estão descritos no anexo 2, como informação complementar.

### **3. Técnicas reprodutivas em equinos e ruminantes 1: avaliação e processamento de sémen: ficha da unidade curricular**

#### **3.1 Resumo**

Nesta unidade curricular, de carácter eminentemente teórico-prático, pretende-se transmitir conhecimentos na área da avaliação e processamento de sémen em ruminantes e equinos. A organização do ensino permitirá a aquisição de competências predominantemente práticas no que concerne a recolha e avaliação de sémen, bem como o seu processamento. Serão abordadas as várias tecnologias disponíveis e sua aplicação e enquadramento em contexto real.

#### **3.2 Objetivos**

Pretende-se nesta Unidade Curricular que os alunos adquiram competências teóricas e práticas no que concerne:

- Avaliação e processamento de sémen
- Recolha, avaliação e processamento de sémen em bovinos
- Recolha, avaliação e processamento de sémen em pequenos ruminantes
- Criopreservação de sémen em ruminantes
- Recolha, avaliação e processamento de sémen no garanhão
- Criopreservação de sémen no garanhão
- Centros de recolha e congelação de sémen: funcionamento e enquadramento legal

#### **3.2 Competências**

As competências que se objetivam nesta UC são essencialmente competências de natureza prática. Assim, no final desta UC os estudantes deverão ser capazes de: 1) identificar e preparar todo o equipamento clínico e laboratorial para trabalhar em sémen; 2) Recolher e avaliar o sémen de garanhões, touros, carneiros e bodes; 3) Utilizar e interpretar novas metodologias e avaliação seminal; 4) Refrigerar e congelar sémen de garanhão, touro, carneiro e bode, tendo presentes as particularidades inerentes a cada espécie; 5) Processar sémen de qualidade inferior recorrendo a diferentes protocolos e 6) Compreender o enquadramento legal e modo de funcionamento de um centro de recolha e congelação de sémen nas várias espécies.

### 3.3 Funcionamento da UC

A distribuição da carga horária encontra-se descremada na tabela 1. As aulas teórico-práticas (26h) serão divididas em função da espécie em blocos de duração varável de acordo com a organização descrita (tabela 2). Previamente à lecionação de cada tema serão enviados artigos científicos, para que os estudantes possam preparar a aula.

As aulas serão lecionadas em contexto prático, de acordo com a espécie, permitindo aos descentes realizar as tarefas propostas. Os alunos acompanharão as atividades em grupos de 5-6 alunos, de modo a que todos possam efetivamente realizar os procedimentos.

**Tabela 1 Distribuição da carga horária proposta na UC Técnicas reprodutivas em equinos e ruminantes 1**

	Horas de contacto com o docente							Horas de trabalho independente			Horas de avaliação	Total
	T	TP	PL	TC	S	OT	E	Estudo	Trabalho de grupo	Trabalho de Projeto		
Total		26						30	8		4	78

T- ensino teórico; TP - ensino teórico-prático; PL - ensino prático e laboratorial; TC – trabalho de campo; S – Seminário; OT – Orientação tutorial, E – estágio.

**Tabela 2 Distribuição da carga horária por espécies proposta na UC Técnicas reprodutivas em equinos e ruminantes 1**

Distribuição dos temas	Horas teórico-práticas
1. Recolha, avaliação e processamento de sémen: conceitos gerais	2
2. Avaliação do macho reprodutor: recolha e avaliação de sémen em bovinos	2
3. Refrigeração e congelação de sémen em touros	4
4. Avaliação do macho reprodutor: recolha e avaliação de sémen em pequenos ruminantes	3
5. Refrigeração e congelação de sémen em pequenos ruminantes	6
6. Avaliação do macho reprodutor: recolha, avaliação e refrigeração de sémen no garanhão	3
7. Criopreservação de sémen no garanhão	3
8. Processamento de sémen de garanhões maus refrigeradores/congeladores	2
9. Centros de recolha e congelação de sémen: enquadramento e licenciamento	1

### 3.4 Avaliação

A avaliação será, predominantemente contínua, ao longo das atividades práticas propostas, e, baseada na execução das mesmas, permitindo desenvolver capacidade crítica, mas também estimulando a apresentação regular de relatórios.

**Avaliação contínua:**

**Avaliação teórica:** para cada tema será enviado um artigo para todos os alunos, sendo que, grupos de dois alunos, deverão apresentar esse artigo no início da aula teórica seguinte ao tema ter sido lecionado. Essa apresentação (10 + 5 minutos) será avaliada pelo docente e colegas em sala, em ficha própria (anexo 3).

**Avaliação prática:**

Em cada aula prática será distribuída aos alunos uma ficha técnica (anexo 4), em que se indicam os objetivos e descrição do procedimento a realizar, e na qual o aluno deverá fazer a sua própria avaliação, de acordo com a dificuldade que sentiu ao realizar o procedimento pedido. O docente efetuará a avaliação continua utilizando a mesma ficha técnica, sendo que a mesma deve ser discutida no próprio dia com cada aluno. O aluno deverá preencher obrigatoriamente o campo sugestões relativas ao procedimento realizado e formas de melhorar a sua realização e eficácia. É obrigatória a realização de 75% dos procedimentos obrigatórios (6), para não ir a exame final.

**Procedimentos obrigatórios:**

1. Recolha e avaliação de sémen no touro
2. Refrigeração e criopreservação de sémen no touro
3. Recolha e avaliação de sémen em pequenos ruminantes
4. Refrigeração e criopreservação de sémen no carneiro
5. Refrigeração e criopreservação de sémen no bode
6. Recolha e avaliação de sémen no garanhão: processamento de sémen fresco e refrigerado.
7. Criopreservação de sémen no garanhão
8. Processamento de sémen de garanhões maus refrigeradores/congeladores

**Avaliação contínua:** 0,4\* avaliação contínua teórica+ 0,6\*avaliação contínua prática

**Avaliação em exame:**

No final da Unidade Curricular, os alunos não avaliados em avaliação contínua, deverão submeter-se a exame final. A avaliação será oral, com discussão dos temas abordados, de acordo com os pontos analisados na avaliação contínua e realização de um procedimento prático (por sorteio).

### 3.5 Conteúdo programático

Os temas serão lecionados por espécie para facilidade de organização das atividades nas diferentes espécies. O enquadramento de cada tema encontra-se descrito em texto. No final de cada tema indicam-se algumas referências para a preparação da aula. A bibliografia completa encontra-se descremida no final do conteúdo programático.

#### **Tema 1: Recolha, avaliação e processamento de sémen: conceitos gerais**

##### **Enquadramento**

A recolha de sémen em ruminantes e equinos realiza-se essencialmente em três situações concretas: 1) como parte integrante do exame do macho reprodutor 2) para obter sémen para utilização em inseminação artificial 3) para obter sémen para refrigeração/ criopreservação.

A recolha de sémen deve obedecer a regras de bem-estar animal, sendo que, preferencialmente, a recolha deve ser feita por vagina artificial, única metodologia exequível em equinos (Guerrero-Gutiérrez et al., 2021; Baíee et al., 2018; Jiménez-Rabadán et al., 2016; Crabtree, 2010). Em ruminantes (touro, carneiro e bode) a recolha por vagina artificial é o método de eleição nos centros de recolha e criopreservação de sémen, mas, na prática clínica, em termos de avaliação do reprodutor, continua-se a utilizar a eletroejaculação, dada a dificuldade de ter machos treinados a saltar na presença de um operador, na maioria das explorações. A utilização da técnica de modo correto e o respeito pelo bem-estar animal devem estar sempre presentes na realização deste procedimento (Guerrero-Gutiérrez et al., 2021; Abril-Sánchez et al., 2019). De referir que, como a avaliação do sémen é parte integrante de um exame clínico, a recolha só deve ser realizada caso o animal tenha sido avaliado e aprovado em todos os outros passos prévios, nomeadamente o exame de estado geral e da genitália externa (Barth, 2018; Tibary et al., 2018).

A avaliação geral do sémen depende das características particulares de cada espécie e é diferente no que concerne ruminantes e equinos. A definição de protocolos e de critérios objetivos de avaliação é fundamental para a realização de trabalho prático de qualidade e torna-se imprescindível para trabalhos de investigação (Hernandez-Aviles & Love, 2021; Whitesell et al., 2020; Hernández-Avilés, C., Zambrano-Varón, J., & Jiménez-Escobar, 2019; Barth, 2018; Tibary et al., 2018; McDonnell, 2016).

Na prática clínica, após a recolha, o sémen é avaliado no que concerne volume (peso ou copo graduado), concentração (contagem ou espectofotometria) e motilidade, de modo subjetivo, massal e individual nos ruminantes e individual nos equinos, sendo recomendada a realização de

um esfregaço para avaliar a vitalidade, percentagem de espermatozoides vivos, e morfologia, incluindo a identificação das diferentes anomalias (Hernandez-Aviles & Love, 2021; Kowalczyk et al., 2019; Tibary et al., 2018; Charles C. Love, 2016). Apesar de, em teoria, este ser um procedimento de rotina, a experiência prática, tem demonstrado a existência de grande disparidade na execução dos procedimentos e na interpretação dos resultados (Whitesell et al., 2020). A existência de equipamento em condições e o treino dos técnicos na sua utilização permitirá melhorar consideravelmente a eficácia da sua prática.

A utilização de metodologias objetivas, como a citometria de fluxo e os sistemas computorizadas de avaliação de sémen (CASA), é importante para a uniformização de critérios, sendo, no entanto, essencial a sua correta execução e interpretação nas várias espécies (Hernández-avilés et al., 2021; Gacem et al., 2020; Hernández-Avilés et al., 2019; Battut et al., 2017; Gliozi et al., 2017; Boryshpolets et al., 2013; Palacín et al., 2013).

No que concerne a utilização do CASA, a existência de diferentes equipamentos e a possibilidade de alteração dos critérios utilizados, origina uma grande variabilidade de resultados, que podem, inclusivamente, influenciar a aprovação ou reprovação de um animal como reprodutor e, obviamente, condicionam a sua utilização em trabalhos de investigação (Whitesell et al., 2020; Malama et al., 2017; Boryshpolets et al., 2013; Palacín et al., 2013). Na avaliação microscópica da morfologia, verifica-se que mudanças, aparentemente pequenas, nos métodos de avaliação, como utilização de microscópio de contraste de fases ou a utilização de microscopia de interferência de contraste diferencial (DIC), aumentam a objetividade da avaliação, ao permitirem a avaliação mais pormenorizada dos esfregaços de sémen (Whitesell et al., 2020; Dascanio & McCue, 2014). Apesar de se reconhecerem as suas vantagens, o custo elevado dos equipamentos associados a estas metodologias, limita, muitas vezes, a sua utilização na prática clínica, sendo inegável a sua importância na formação dos técnicos e investigadores.

A posterior utilização de sémen para inseminação artificial implica o seu processamento, existindo diferentes protocolos e diluidores, que variam conforme o sémen for para aplicação em fresco, refrigerado ou congelado e são diferentes conforme a espécie animal (Bustani & Baiee, 2021; J. Aurich et al., 2020; Nikitkina et al., 2020; Lv, Wu, et al., 2019; Ugur et al., 2019, C. Aurich, 2008).

As duas principais abordagens para a preservação de sémen são a refrigeração e a congelação/vitrificação. Na refrigeração o sémen é armazenado a 4-5°C no máximo por 72 horas (Bashawat et al., 2021; Wiebke et al., 2021). No processo de criopreservação, após diluição e armazenamento em palhinhas de 0,25 ou 0,5 mL, o sémen é arrefecido até 4 a 5°C ao longo de 1 a 4 horas, sendo depois preservado em azoto líquido a -196°C ao longo de anos (Jane M Morrell et al., 2022; Bustani

& Baiee, 2021; Nikitkina et al., 2020; Layek et al., 2016). A criopreservação de sémen é essencial para a implementação de programas de conservação e melhoramento genético, facilitando a disseminação de património genético através do mundo pela grande facilidade de distribuição e armazenamento (Production, 2023).

A resistência do sémen à refrigeração/criopreservação é influenciada pela espécie, variações individuais, processamento utilizado (velocidade de congelação-descongelação, diluidor e crioprotetor utilizado) estação do ano, características do ejaculado, origem do sémen (ejaculado ou epidídimos) e metodologia de recolha (Jane M Morrell et al., 2022; Yáñez-Ortiz et al., 2022; Prell et al., 2020; Dias et al., 2018; Müller-Unterberg et al., 2017; Jiménez-Rabadán et al., 2016; Yodmingkwan et al., 2016).

Ao longo do processo de criopreservação as células espermáticas são sujeitas a alterações drásticas na temperatura, à formação de cristais de gelo, bem como a vários fatores de stress físico, químico, osmótico e oxidativo. Estas alterações podem levar a lesões ao nível da membrana celular, acrossoma, núcleo, função mitocondrial e motilidade, com efeito na fertilidade e desenvolvimento embrionário (Ezzati et al., 2020). As alterações induzidas pela criopreservação incluem alterações moleculares e estruturais, cuja compreensão é essencial para o desenvolvimento de protocolos eficazes (Yáñez-Ortiz et al., 2022). É fundamental o conhecimento dos mecanismos associados à perda de qualidade do sémen criopreservado, de modo adaptar e melhorar os protocolos de criopreservação passíveis de serem utilizados na prática (Ezzati et al., 2020; Ugur et al., 2019). A existência de biomarcadores seminais associados à resistência ao processo de criopreservação pode ser utilizada com indicador da sensibilidade ao processo (Yáñez-Ortiz et al., 2022).

Na criopreservação podem ser utilizados sistemas manuais ou automáticos variando as velocidades de arrefecimento e os crioprotetores utilizados (Bustani & Baiee, 2021; Nikitkina et al., 2020; Lv, Larbi, et al., 2019; Dias et al., 2018; Layek et al., 2016; Álvarez et al., 2014; Bezerra et al., 2011).

Os diluidores de sémen são utilizados com o objetivo de preservar a capacidade de fertilização dos espermatozoides, protegendo-os, como referido, de fatores lesivos como a congelação, formação de cristais de gelo, choque osmótico e o stress oxidativo (Yáñez-Ortiz et al., 2022). Assim, devem permitir manter o pH entre 6,8 a 7,2, prover energia, ter efeito antioxidante, proteger das lesões pelo frio e minimizar a contaminação, através da adição de antibiótico (Bustani & Baiee, 2021).

De entre os componentes dos diluidores de sémen incluem-se os crioprotetores não penetrantes (gema de ovo, derivados do leite, lecitina de soja), crioprotetores penetrantes (glicerol, DMSO, amidas, etilenoglicol); soluções tampão, (EDTA, HEPES; cloreto de potássio, citrato de sódio, bicarbonato de sódio, TRIS, Tes), fontes de energia e protetores de choque osmótico (frutose,

glicose, dissacarídeos, lactato, piruvato), outros aditivos incluindo, produtos de origem vegetal (óleo, chá verde, ...), produtos de origem animal (mel, óleo de peixe, vitaminas, proteínas do plasma seminal e proteínas séricas), antioxidantes enzimáticos (catalase, glutatião peroxidase, superóxido dismutase) e não enzimáticos (manganésio, taurina, carnitina) e antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina) (Yáñez-Ortiz et al., 2022; Bashawat et al., 2021; Bustani & Baiee, 2021; Wiebke et al., 2021; Lv, Wu, et al., 2019; Layek et al., 2016; Dorado et al., 2007).

Em algumas espécies, como o garanhão e o bode, a maioria dos protocolos de criopreservação estão associados a centrifugação e remoção do plasma seminal, existindo diversos protocolos de centrifugação, de modo a melhorar a qualidade do sémen pré-criopreservação (Bustani & Baiee, 2021; Papin et al., 2021; Lv, Larbi, et al., 2019; Al-Essawe et al., 2018).

Apesar de não ser utilizada como técnica de rotina, pode igualmente ser utilizada a vitrificação, técnica associada a arrefecimento ultrarrápido, sem que ocorra a formação de cristais de gelo, mas com formação de uma substância vítreia, utilizando diluidores em concentração elevada. Esta técnica já foi aplicada com sucesso em sémen de garanhão, touro e carneiro (Falah et al., 2020; Consuegra et al., 2019; Pilar Jiménez-Rabadán et al., 2015).

### **Objetivos: revisão e aquisição de conhecimentos:**

- Recolha e avaliação de sémen nas várias espécies: diferenças entre métodos de recolha e entre avaliação geral do sémen
- Apresentação de novas metodologias de avaliação seminal: vantagens e aplicações
- Fundamentos sobre processamento de sémen: fresco, refrigerado e congelado

### **Metodologia**

**Local: Polo da Mitra**

### **Introdução teórica geral**

Neste tema serão revistos conceitos básicos, lecionados nas UCs obrigatórias, no que concerne recolha e avaliação geral do sémen. Apresentar-se-ão as bases fisiológicas e metodologias disponíveis para recolha e avaliação de sémen, acompanhadas de fotografias e vídeos originais. Serão abordadas metodologias objetivas de avaliação seminal, como o sistema computorizado de avaliação de sémen (CASA) e a citometria de fluxo. Será dada especial enfase à importância do bem-estar animal durante a recolha e à necessidade de estabelecer critérios objetivos de avaliação que sejam aplicáveis e repetíveis pelas várias equipas. Sendo uma aula em sala serão abordadas as bases

teóricas do processamento de sémen, nomeadamente no que concerne os diferentes diluidores e métodos de criopreservação.

### **Bibliografia recomendada**

- Aurich, J., Kuhl, J., Tichy, A., & Aurich, C. (2020). Efficiency of semen cryopreservation in stallions. *Animals*, 10(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani10061033>
- Barth, A. D. (2018). Review: The use of bull breeding soundness evaluation to identify subfertile and infertile bulls. *Animal*, 12(s1), s158–s164. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000538>
- Hernandez-Aviles, C., & Love, C. (2021). Prebreeding season/prepub hase examination of the stallion: testicular ultrasonography, semen evaluation and considerations. *Clinical Theriogenology*, 13(289), 289–298. <https://doi.org/10.5829/ct.v13i3.9102>
- Ezzati, M., Shanehbandi, D., Hamdi, K., Rahbar, S., & Pashaiai, M. (2020). Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell and Tissue Banking*, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10561-019-09797-0>
- Production, F. A. O. A. (2023). Innovations in cryoconservation of animal genetic resources. In *Innovations in cryoconservation of animal genetic resources*. <https://doi.org/10.4060/cc3078en>
- Tibary, A., Boukhliq, R., & Allali, K. El. (2018). Ram and Buck Breeding Soundness Examination. *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét*, 6(2), 241–255.
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 246(December 2021), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>

## **Tema 2: Avaliação do macho reprodutor: recolha e avaliação de sémen em bovinos**

### **Enquadramento**

A avaliação de reprodutores é fundamental para a melhoria da fertilidade das explorações de ruminantes, sendo basilar, quer comercialmente quer em programas de melhoramento e conservação genética (P. J. Chenoweth & McPherson, 2016). O exame dos reprodutores envolve a história pregressa, exame clínico, avaliação da condição corporal, exame da genitália externa e glândulas acessórias, perímetro escrotal, avaliação da líbido e espermograma (A. D. Barth, 2018; Chenoweth & McPherson, 2016). Os dados relativos à fertilidade nas explorações de bovinos dependem, sobretudo, da organização e da dimensão da exploração, sabendo-se que em bovinos de carne existem, geralmente, menos registos, comparativamente ao que se passa nas explorações de leite.

O exame clínico, que é muitas vezes realizado de modo sumário, é um aspeto fundamental, no sentido de identificar anomalias que inviabilizem a utilização do macho como reprodutor, evitando o prosseguir desnecessário do exame reprodutor. Apesar de existirem vários testes, mais ou menos padronizados, que permitem avaliar a líbido em bovinos, esta avaliação é muitas vezes obtida pela história pregressa, sendo desejável a educação do produtor no sentido de avaliar a monta e

ejaculação, bem como, a existência de retorno ao cio nas vacas à reprodução (A. D. Barth, 2018; Albert D. Barth & Waldner, 2002;). A avaliação da genitália externa, observação e palpação, bem como a avaliação das glândulas sexuais assessórias, por palpação retal, pode ser complementada com o recurso à ecografia (Rodrigues et al., 2020), recomendando-se obrigatoriamente a mensuração do perímetro escrotal, o qual é utilizado muitas vezes como critério de seleção em programas de melhoramento genético (A. D. Barth & Waldner, 2002).

A recolha de sémen pode ser feita por vagina artificial e por eletroejaculação. Em machos não treinados, e para avaliação como reprodutores, é muitas vezes utilizada a electroejaculação, apesar das preocupações associadas ao bem-estar animal. O mesmo se passa por exemplo em raças, como a raça Brava, cujo temperamento e manejo, não permitem o seu treino. Recentemente, têm vindo a ser desenvolvidos estudos que procuram minimizar o sofrimento infligido pela eletroejaculação, o qual não pode de modo algum ser negligenciado (Baiee et al., 2018).

No que concerne a avaliação de sémen, a maioria das vezes, é feita com o recurso a observação subjetiva, sendo imperativo uniformizar critérios e aplicar protocolos estandardizados, os quais foram definidos primeiramente pela Sociedade Internacional de Teriogenologia (Peter J Chenoweth et al., 2010). A utilização de metodologias objetivas, como os sistemas computorizados de avaliação de sémen e a citometria de fluxo, são fundamentais para uniformizar critérios de avaliação (Gliozzi et al., 2017; Malama et al., 2017; Nagy et al., 2015).

#### ***Objetivos: revisão e aquisição de conhecimentos sobre:***

- Recolha de sémen em touros: recolha com vagina artificial e por electroejaculação
- Avaliação de sémen de touro: metodologia de rotina e técnicas objetivas
- Critérios a utilizar na avaliação seminal: objetivos e uniformização de critérios

#### ***Metodologia***

**Local: Centro de Recolha e Congelação de Sémen de Bovinos (Polo da Mitra)**

#### **Introdução**

Neste tema serão abordados os vários métodos de recolha de sémen: vagina artificial e eletroejaculação, com especial relevo para o treino dos animais, equipamento, condições físicas necessárias e cuidados a ter na recolha de sémen. Serão abordadas diferentes metodologias objetivas de avaliação e a sua aplicabilidade. Serão apresentados os dados de várias equipas de

investigação que realçam a multiplicidade de fatores que condicionam a avaliação de sémen nesta espécie.

### **Componente prática**

Na componente prática os estudantes terão oportunidade de efetuar recolha de sémen em bovinos e de efetuar todos os procedimentos de avaliação, de modo a avaliar o potencial fértil do reprodutor. A existência de machos treinados para recolha com vagina artificial, permitirá a realização da componente prática em condições de segurança e respeitando as regras de bem-estar animal. Tendo em conta os procedimentos descritos de modo a maximizar o bem-estar durante a electroejaculação, será feita a demonstração do procedimento

### **Bibliografia recomendada**

- Baiee, F., Haron, W., Yusoff, R., Omar, A., Yimer, N., Hammadi, S., Ahmedeltayeb, T., & Kaka, A. (2018). Modification of electro-ejaculation technique to minimise discomfort during semen collection in bulls. *Pakistan Journal of Zoology*, 50(1), 83–89. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.1.83.89>
- Barth, A. D. (2018). Review: The use of bull breeding soundness evaluation to identify subfertile and infertile bulls. *Animal*, 12(s1), s158–s164. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000538>
- Malama, E., Zeron, Y., Janett, F., Siuda, M., Roth, Z., & Bollwein, H. (2017). Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology*, 87, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.002>

## **Tema 3: Refrigeração e congelação de sémen em touros**

### **Enquadramento**

Na medida em que o sémen de touro é bastante resistente à criopreservação, a grande maioria do sémen utilizado é sémen congelado, sendo a técnica muito vulgarizada particularmente em bovinos de aptidão leiteira, associada aos programas de melhoramento genético e à disseminação de touros de alto valor genético (Wiebke et al., 2021). No que concerne a utilização de sémen refrigerado, no nosso país, os dados são reduzidos, mas serão quase exclusivamente aplicados em raças autóctones, envolvidas em programas de conservação genética.

A fertilidade com sémen refrigerado em bovinos varia conforme o tempo de armazenamento (1-6 dias), temperatura de armazenamento (5°C a temperatura ambiente) e utilização (inseminação ou fertilização *in vitro*), entre os 30 e os 76 % (Wiebke et al., 2021; Murphy et al., 2016). A dose a aplicar de sémen refrigerado varia conforme os países, mas a utilização de doses menores, comparativamente ao sémen congelado, pode eventualmente possibilitar um mais acelerado progresso genético ao possibilitar a utilização de machos reprodutores mais novos (C. Murphy et al., 2016).

A temperatura mais critica para a existência de choque pelo frio inclui o arrefecimento entre os 15°C e os 5°C (Watson, 2000), pelo que, no que concerne os diluidores utilizados na refrigeração, a sua composição é muitas vezes semelhante à dos diluidores de congelação. No entanto, na maioria dos estudos não se refere a velocidade de arrefecimento, mas sim a temperatura de armazenamento (C. Murphy et al., 2016).

Os diluidores utilizados na refrigeração de sémen em touros, incluem geralmente uma solução tampão (TRIS), uma fonte de energia (açúcar simples ou dissacarídeo), componentes com efeito crioprotetor, como a gema de ovo, a lecitina de soja ou derivados do leite (E. M. Murphy et al., 2017) e a adição de antioxidantes. A necessidade de adição de crioprotetores penetrantes como o glicerol no processo de refrigeração, permanece como questionável (Wiebke et al., 2021).

O processo de congelação de sémen implica a diluição e adição de crioprotetores, o arrefecimento e a congelação e a posterior descongelação. Em todos os passos do processo pode ocorrer lesão das células espermáticas (Ugur et al., 2019; Khalil et al., 2018; Barbas & Mascarenhas, 2009; Watson, 2000).

Em bovinos, a maioria dos diluidores utilizados na criopreservação de sémen são diluidores comerciais, podendo incluir: combinações de crioprotetores penetrantes e não penetrantes em diferentes proporções (gema de ovo, proteínas de baixa densidade (*LDH low density proteins*), derivados do leite, lecitina de soja, glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfoxido (DMSO)); substâncias tampão (citrato de sódio, bicarbonato de sódio, TRIS, Tes); fontes de energia (açúcares simples ou dissacarídeos) e antimicrobianos (penicilina, estreptomicina, gentamicina). A suplementação dos diluidores com diversos componentes, com vista a melhorar a qualidade seminal após descongelação, tem vindo a ser alvo de vários estudos (Yadav et al., 2023; Ugur et al., 2019; Gangwar et al., 2018; Layek et al., 2016). O fator de diluição é dependente da concentração inicial, recomendando-se uma concentração para criopreservação de  $80 * 10^6$  espermatozoides/mL, sendo a adição do crioprotetor geralmente feita em um único passo. Utilizam-se geralmente palhinhas de 0,25 mL (Ugur et al., 2019; Gangwar et al., 2018).

O processo de criopreservação pode ser realizado em sistemas automáticos, com uma velocidade de arrefecimento bem definida (-0.25°C/m a -2,8°C/min-), mas, na realidade prática, a congelação é muitas vezes realizada de modo manual. Assim, após equilíbrio em câmara frigorífica, caixa térmica ou caixa de esferovite, a 4 a 5°C por cerca de 4 horas, o sémen é colocado em vapores de azoto a 4-6 cm de altura, por 7 a 20 minutos (pré congelação entre -75°C e -125°C), após o qual é colocado diretamente em azoto líquido (-196°C) (Dias et al., 2018). A utilização de sistemas automáticos permite um controlo mais preciso da velocidade de arrefecimento, com um

arrefecimento lento e gradual, que permite o equilíbrio pré congelação. Contrariamente, nos sistemas manuais, a temperatura ambiente influência a curva de arrefecimento. A utilização dos sistemas manuais em condições de laboratório (25°C), com controlo de temperatura ambiente, permite uma melhor uniformização do procedimento, sendo estes sistemas economicamente mais vantajosos. A descongelação é feita em banho-maria a 37°C por 30 a 45 segundos (Dias et al., 2018).

A utilização de técnicas objetivas de avaliação seminal, como a citometria de fluxo e os sistemas CASA, permite caracterizar a eficiência do processo de criopreservação, identificando os parâmetros de avaliação *in vitro* que mais se correlacionam com a fertilidade *in vivo* (Gliozzi et al., 2017). A avaliação da ultraestrutura das células espermáticas após criopreservação possibilita a compreensão das lesões associadas ao processo. A alteração da membrana plasmática foi a lesão mais frequente, num estudo realizado em touros, sendo que, a melhoria dos protocolos de criopreservação deve ter em atenção este fator (Khalil et al., 2018). Outras alterações implicam a capacitação prematura, alterações do acrosoma e da função mitocondrial (Khalil et al., 2018).

***Objetivos: revisão e aquisição de conhecimentos sobre:***

- Avaliação de sémen de touro: metodologia de rotina e técnicas objetivas
- Refrigeração e criopreservação de sémen de touro

***Metodologia***

**Local: Centro de Recolha e Congelação de Sémen de Bovinos (Polo da Mitra)**

**Introdução**

Serão abordadas as bases teóricas da refrigeração e criopreservação de sémen em bovinos, os mecanismos de lesão induzidas pelo processo, bem como os vários protocolos possíveis de serem utilizados nesta espécie, incluindo diluidores, crioprotetores e curvas de arrefecimento. Serão apresentados os dados de várias equipas de investigação que realçam a multiplicidade de fatores que condicionam a conservação de sémen nesta espécie.

**Componente prática**

Na componente prática os estudantes terão oportunidade de, após recolha e avaliação do sémen, efetuar todos os procedimentos com vista à preparação de sémen refrigerado e criopreservado. Serão utilizados diluidores comerciais e não comerciais com distintos componentes. O sémen será posteriormente avaliado de modo subjetivo e objetivo.

## Bibliografia recomendada

- Gliozzi, T. M., Turri, F., Manes, S., Cassinelli, C., & Pizzi, F. (2017). The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, 11(11), 1–8. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000684>
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>
- Murphy, E. M., Murphy, C., O'Meara, C., Dunne, G., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2017). A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 1541–1554. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11646>
- Wiebke, M., Hensel, B., Nitsche-Melkus, E., Jung, M., & Schulze, M. (2021). Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science*, May, 106822. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106822>

## Tema 4: Avaliação do macho reprodutor: recolha e avaliação de sémen em pequenos ruminantes.

### **Enquadramento**

Tal como nos bovinos, a avaliação de reprodutores é fundamental para a melhoria da fertilidade das explorações de pequenos ruminantes (Maquivar et al., 2021). No entanto, a sua prática está longe de ser uma realidade. O exame do macho reprodutor é semelhante ao descrito para os touros (Tibary et al., 2018; Lone et al., 2017). Os dados de fertilidade em explorações de pequenos ruminantes, infelizmente, são muitas vezes quase inexistentes, o que dificulta bastante a avaliação da história reprodutiva. O exame clínico, é na prática clínica resumido à avaliação da condição corporal, sistema locomotor e temperatura retal, sendo, no entanto, como referido um aspeto fundamental, no sentido de identificar anomalias que inviabilizem a utilização do macho como reprodutor. A avaliação da líbido em pequenos ruminantes pode ser feita por observação visual, tendo sido desenvolvidos alguns sistemas de avaliação automáticos, que permitem reduzir o tempo de observação e melhorar a objetividade da avaliação (Alhamada et al., 2017; Lacuesta et al., 2018, Stellflug & Berardinelli, 2002).

A avaliação da genitália externa é feita por visualização e palpação, sendo importante definir os valores de perímetro testicular para cada raça, os quais podem e devem ser utilizados como critério de melhoramento (Romão et al., 2023)

Em pequenos ruminantes, tradicionalmente, recomenda-se a avaliação cerca de 2 meses antes do início da época reprodutiva, sendo que cerca de 10% dos carneiros avaliados, apresenta baixa fertilidade (Tibary et al., 2018). De referir que, sendo os pequenos ruminantes uma espécie poliéstrica sazonal, denominados como reprodutores de dias curtos (Giriboni et al., 2017; Malpaux et al., 2010; Rosa & Bryant, 2003), é essencial ter em conta a estação do ano na avaliação do

reprodutor, influenciando não só as características seminais e resistência à criopreservação (Pablo et al., 2021) como a líbido e perímetro escrotal (Leboeuf et al., 2006; Rosa & Bryant, 2003). A própria resposta à eletroejaculação, quer em termos de qualidade seminal, quer em termos de parâmetros de bem-estar, é influenciada pela estação do ano (Ungerfeld et al., 2021). A presença de machos sexualmente ativos, na espécie ovina e caprina, estimula a atividade sexual dos outros machos, bem como das fêmeas, influenciando a fertilidade do rebanho (Palacios et al., 2023; Delgadillo et al., 2022).

A recolha de sémen em pequenos ruminantes pode também ser feita por vagina artificial e por eletroejaculação, sendo igualmente de respeitar as preocupações associadas ao bem-estar animal, como referido nos bovinos (Guerrero-Gutiérrez et al., 2021; Abril-Sánchez, 2019; Ungerfeld et al., 2018).

A avaliação do sémen obedece às mesmas regras referidas para os touros, sendo a utilização de metodologias objetivas, como o CASA e a citometria de fluxo, aplicáveis com as especificidades inerentes a cada espécie (Hahn et al., 2019; Santolaria et al., 2015; Palacine t al., 2013). Em pequenos ruminantes a utilização do teste de endosmose (HOST) é apontado como um teste simples e prático de ser aplicado em campo, correlacionando-se com a fertilidade pós inseminação artificial (IA) (Rajashri et al., 2017).

#### ***Objetivos: revisão e aquisição de conhecimentos sobre:***

- Recolha de sémen em pequenos ruminantes: recolha com vagina artificial e por electroejaculação
- Avaliação de sémen de carneiro e bode: metodologia de rotina e técnicas objetivas
- Critérios a utilizar na avaliação seminal: objetivos e uniformização de critérios

#### ***Metodologia***

**Local: Centro de Colheita de Sémen da Herdade da Abóboda (Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, Herdade da Abobada)**

#### ***Introdução***

Neste tema serão abordados os vários métodos de recolha de sémen: vagina artificial e eletroejaculação, com especial relevo para o treino dos animais, equipamento, condições físicas necessárias e cuidados a ter na recolha de sémen. Serão abordadas diferentes metodologias objetivas de avaliação e a sua aplicabilidade em sémen de pequenos ruminantes. Serão

apresentados os dados de várias equipas de investigação que realçam a multiplicidade de fatores que condicionam a avaliação de sémen nestas espécies.

### **Componente prática:**

Na componente prática os estudantes terão oportunidade de efetuar recolha de sémen nas duas espécies e efetuar todos os procedimentos de avaliação, de modo a avaliar o potencial fértil do reprodutor. A existência de machos treinados para recolha e vagina artificial permitirá a realização da componente prática em condições de segurança e respeitando as regras de bem-estar animal. Tendo em conta os procedimentos descritos de modo a maximizar o bem-estar durante a electroejaculação, será feita a demonstração do procedimento no carneiro e bode.

### **Bibliografia recomendada**

- Abril-Sánchez, S., Freitas-de-Melo, A., Giriboni, J., Santiago-Moreno, J., & Ungerfeld, R. (2019). Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternative techniques. *Animal Reproduction Science*, 205(March), 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.023>
- Hahn, K., Failing, K., & Wehrend, A. (2019). Effect of temperature and time after collection on buck sperm quality. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2135-y>
- Malpaux, B., Chemineau, P., Bodin, L., & Migaud, M. (2010). *Neuroendocrine and Genetic Control of Seasonal Reproduction in Sheep and Goats Because of Changes in Gonadal Activity , Photoperiod Synchronizes an Endogenous Circannual Rhythm of Reproductive*. 45, 42–49.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01661.x>
- Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Santolaria, P., & Yániz, J. L. (2013). Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research*, 112(1–3), 128–135.  
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.014>
- Rajashri, M., Reddy, K. R., Kumari, G. A., Kumari, N. N., & Kesharwani, S. (2017). Correlation Between Hypo-Osmotic Swelling Test (Host) and Other Seminal Characteristics of Deccani Ram Semen. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 5(2), 195–200.  
[https://doi.org/10.18006/2017.5\(2\).195.200](https://doi.org/10.18006/2017.5(2).195.200)
- Santolaria, P., Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Fantova, E., Blasco, M. E., Silvestre, M. A., & Yániz, J. L. (2015). Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Science*, 163, 82–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.001>
- Tibary, A., Boukhliq, R., & El Allali, K. (2018). Ram and Buck breeding soundness examination. *Rev. Mar. Sci. Agr. Vét*, 6, 241–255.

## Tema 5: Refrigeração e congelação de sémen em pequenos ruminantes

### Enquadramento

Em pequenos ruminantes, a baixa fertilidade associada à inseminação por via cervical com sémen congelado, limita muitas vezes a sua utilização, sendo a refrigeração uma alternativa viável em programas de melhoramento genético (Alvarez et al., 2019; Leboeuf et al., 2008).

Os diluidores utilizados na refrigeração de sémen incluem, vários componentes com diferentes funções, como descrito previamente (Bustani & Baiee, 2021; Salamon & Maxwell, 2000). Em sémen refrigerado de carneiro utiliza-se frequentemente gema de ovo associada a Tris-hydroxymethyl aminomethane (Tris), bem como diluidores à base de leite ou contendo lecitina de soja (Abadjieva et al., 2020; Quan et al., 2016; Kasimanickam et al., 2011; Leboeuf et al., 2006; Salamon & Maxwell, 2000), sendo a eficácia do diluidor com lecitina de soja comparável à utilização de gema de ovo e superior à do diluidor à base de leite (Kasimanickam et al., 2011). A utilização de Tris, N-Tris (hydroxymethyl) methylaminoethane-sulfonic acid (Tes) na refrigeração de sémen de carneiro permitiu a manutenção de motilidade, velocidade e resposta positiva ao teste de endosmose por 3 dias, em sémen refrigerado a 4°C, estando estes diluidores associados a menor alteração da integridade de membrana e do acrossoma (Quan et al., 2016).

A utilização de diluidores incluindo gema de ovo ou derivados do leite é desaconselhada no sémen de bode, podendo influenciar negativamente a sobrevivência dos espermatozoides (Leboeuf et al., 2006). Este facto deve-se sobretudo à existência de uma enzima, fosfolipase A2 (*EYCE: egg yolk coagulating enzyme*), a qual pode coagular a gema de ovo e hidrolisar a lecitina em componentes espermicidas e de uma lipase (55-60 kD lipoproteína lipase, SBUIII), a qual interfere com os diluidores à base de leite, podendo induzir a reação do acrossoma e, subsequentemente, prejudicar a sobrevivência dos espermatozoides após refrigeração e congelação (Lv, Larbi, et al., 2019; Lv, Wu, et al., 2019; Leboeuf et al., 2006; Purdy, 2006). A utilização de diluidores contendo estes componentes pode ser viável, se associada à previa remoção do plasma seminal, procedimento utilizado frequentemente no processo de criopreservação nesta espécie (Yodmingkwan et al., 2016; Leboeuf et al., 2006).

O sémen refrigerado pode ser mantido entre 2 e 15°C, sendo a maioria das vezes refrigerado a 4-5°C, mantendo-se viável, regra geral, entre 12 a 24 horas, apesar de alguns autores referirem a manutenção de viabilidade por cerca de 72 horas (Quan et al., 2016; Leboeuf et al., 2006; Salamon & Maxwell, 2000). O arrefecimento lento e a adição de crioprotetores permite, como nas outras espécies, a diminuição dos efeitos do choque pelo frio associados ao arrefecimento até aos 5°C (Salamon & Maxwell, 2000; Watson, 2000).

A diminuição da motilidade em sémen refrigerado de bode parece estar associada à diminuição do pH, sendo que, a substituição do diluidor ao longo do tempo de refrigeração e a utilização de diluidores com maior capacidade tampão, podem ser úteis na manutenção da motilidade, integridade de membrana e estabilidade do acrossoma, permitindo a obtenção de taxas de fertilidade, semelhantes às obtidas com sémen fresco, após 12 dias de refrigeração (Liu et al., 2016).

Quando avaliada a fertilidade após inseminação com sémen refrigerado, em ovinos, a taxa de gestação variou entre os 20 e os 80% sendo influenciada pelo tipo de diluidor, temperatura e tempo de armazenamento, bem como pelo local de deposição do sémen no trato reprodutivo da fêmea, cervical ou vaginal (Bashawat et al., 2021). Em caprinos a taxa de fertilidade é, de modo geral, mais elevada, média superior a 50 %, sendo diferente entre raças e conforme o diluidor utilizado (Bashawat et al., 2021).

As células espermáticas do carneiro e do bode são particularmente sensíveis a lesões oxidativas, na medida em que possuem um rácio maior de ácidos gordos polinsaturados em relação aos ácidos gordos saturados, e um menor rácio de colesterol/fosfolípidos na sua membrana plasmática (Arav et al., 2000). A adição de substâncias antioxidantes permite aumentar a resistência ao processo de arrefecimento e congelação (Yadav et al., 2023; Bustani & Baiee, 2021; Abadjieva et al., 2020; Lv, Larbi, et al., 2019; Farshad & Hosseini, 2013).

As técnicas de criopreservação utilizadas em pequenos ruminantes são semelhantes às aplicadas noutras espécies, nomeadamente nos bovinos (Lv, Wu, et al., 2019). No entanto, a aplicação de sémen congelado por via cervical em caprinos é bastante mais eficaz, comparativamente aos ovinos, o que se pode dever, em parte, às diferenças anatómicas entre as duas espécies, existindo também diferenças entre raças dentro da espécie ovina, no que concerne não só a anatomia da cérvix mas também a composição do muco cervical (Abril-Parreño et al., 2021). O método de obtenção do sémen influencia a qualidade do ejaculado e resistência à criopreservação, sobretudo em bodes (Guerrero-Gutiérrez et al., 2021; P. Jiménez-Rabadán et al., 2016).

Após avaliação, o sémen é geralmente diluído com diluidor de congelação, incluindo frequentemente, glicerol, gema de ovo, Tris, frutose ou glucose, ácido cítrico e antimicrobiano, devendo a diluição ser gradual, já que, o fator de diluição pode ser muito elevado em ejaculados com elevada concentração (Dorado et al., 2007; Purdy, 2006; Salamon & Maxwell, 2000). A adição do diluidor pode ser feita de modo faseado, protocolo no qual, o primeiro diluidor adicionado não contém glicerol, o qual apenas é adicionado numa segunda fase (Lv, Wu, et al., 2019; Salamon & Maxwell, 2000). A utilização de diferentes aditivos, aos diluidores de sémen, tem sido testada em sémen de carneiro e de bode, incluindo a utilização de trealose, glutamina, LDH, amidas e diferentes

aminoácidos (Xu et al., 2022; Lv, Larbi, et al., 2019; Bittencourt et al., 2018; Farshad & Hosseini, 2013; Bezerra et al., 2011; Ali et al., 2008).

No criopreservação de sémen de bode, como referido, recomenda-se, geralmente, a remoção do plasma seminal pré diluição ou, alternativamente, a utilização de diluidores sem gema de ovo nem derivados do leite (Purdy, 2006). A utilização de outros crioprotetores, como a lecitina de soja, permitiu a obtenção de resultados homogéneos em vários ejaculados de bode, com motilidade pós descongelação superior a 50% (Jane M Morrell et al., 2022; Salmani et al., 2013). No processo de remoção do plasma seminal o sémen é centrifugado, em solução tampão de lavagem, por cerca de 10 a 15 minutos a 550-950 g (Purdy, 2006). A remoção do plasma seminal pode ter efeitos deletérios já que, como se sabe, este tem um importante papel nutritivo e de proteção, sendo importante para a sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino (Lv, Wu, et al., 2019).

Apesar de, no carneiro, não ser de modo geral realizada a centrifugação pré congelação, num estudo realizado em 2022, a centrifugação dos ejaculados, diluídos com INRA 96, possibilitou uma taxa elevada de recuperação, sem efeitos deletérios na qualidade seminal e fertilidade (Neila-montero et al., 2022).

Tal como nos bovinos, o sémen é arrefecido de modo gradual até os 4-5º C, sendo necessário tempo de equilíbrio a essa temperatura (2-4 horas). O sémen pode ser congelado em equipamento de congelação automático, com diminuição gradual e controlada da temperatura, quer em velocidade fixa (-8ºC/ min), quer em velocidade variável, conforme a fase de congelação (entre -4ºC a -25ºC/ minuto) (Purdy, 2006; Salamon & Maxwell, 2000). Alternativamente, pode ser processado de modo manual, sendo o sémen colocado em vapores de azoto líquido (4 a 6 cm acima da superfície do azoto líquido) por 10 a 20 minutos, tempo após o qual, as palhinhas são imersas diretamente no azoto líquido (Lv, Wu, et al., 2019). Quando o processo de adição do diluidor é feito em duas fases, a junção do glicerol é feita entre os 2-5ºC (Salamon & Maxwell, 2000).

O sémen é geralmente congelado em palhinhas de 0,25 mL e numa concentração de 80-500 \*10<sup>6</sup> espermatozoides/ mL (Leboeuf et al., 2006; Purdy, 2006; Salamon & Maxwell, 2000). A descongelação é feita a 35-40ºC por cerca de 30-60 segundos (Lv, Wu, et al., 2019).

Torna-se importante a avaliação da eficácia dos vários protocolos de criopreservação, não só *in vitro*, por avaliação subjetiva e objetiva, mas também *in vivo* pela sua aplicação (Neila-montero et al., 2022; Bittencourt et al., 2018; Santolaria et al., 2015; Salmani et al., 2013; Dorado et al., 2007). A maior limitação à aplicação de sémen congelado, sobretudo em ovinos, prende-se com a necessidade de inseminação intrauterina por laparoscopia, com o consequente aumento de custos e de mão de obra especializada (Alvarez et al., 2019).

### **Objetivos: revisão e aquisição de conhecimentos sobre:**

- Avaliação de sémen de carneiro e bode: metodologia de rotina e técnicas objetivas
- Refrigeração e criopreservação de sémen de carneiro e bode

### **Metodologia**

**Local: Centro de Colheita de Sémen da Herdade da Abóboda (Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, Herdade da Abobada)**

### **Introdução**

Serão abordadas as bases teóricas da refrigeração e criopreservação de sémen em pequenos ruminantes, realçando-se as diferenças entre as duas espécies, nomeadamente em relação aos diferentes crioprotetores passíveis de serem utilizados, bem como à eventual necessidade de remoção do plasma seminal na criopreservação de sémen de bode. Serão apresentados os dados de várias equipas de investigação que realçam a multiplicidade de fatores que condicionam a conservação de sémen nesta espécie.

### **Componente prática**

Na componente prática os estudantes terão oportunidade de, após recolha e avaliação do sémen, efetuar todos os procedimentos com vista à preparação de sémen refrigerado e criopreservado. Serão utilizados diluidores comerciais e não comerciais com distintos componentes. O sémen será posteriormente avaliado de modo subjetivo e objetivo.

### **Bibliografia recomendada**

- Bashawat, M., Hensel, B., Müller, K., & Schulze, M. (2021). Cooled storage of semen from livestock animals (Part II): Camelids, goats, and sheep. *Animal Reproduction Science*, 234(May). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106855>
- Guerrero-Gutiérrez, M., Ungerfeld, R., Kako Rodriguez, M. G., Santiago-Moreno, J., & Giriboni, J. (2021). Using transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands for buck semen collection yields semen with greater cryoresistance than electroejaculation alone during the breeding season. *Theriogenology*, 172, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.016>
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M. R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M. D., & Garde, J. J. (2016). Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 167, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.013>
- Lv, C., Wu, G., Hong, Q., & Quan, G. (2019). Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreservation and Biobanking*, 17(2), 171–182. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0113>
- Morrell, J. M., Malaluang, P., & Ntallaris, T. (2022). *Practical Method for Freezing Buck Semen*. 0–9.

Purdy, P. H. (2006). *Review article A review on goat sperm cryopreservation* *8*, 63, 215–225.  
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>

## **Tema 6: Avaliação do macho reprodutor: recolha, avaliação e refrigeração de sémen no garanhão**

### **Enquadramento**

O exame do garanhão, como proposto pela Sociedade de Teriogenologia, implica um exame clínico de estado geral, avaliação da genitália externa, avaliação do diâmetro testicular, avaliação da líbido e espermograma. Para um garanhão ser considerado fértil deve ter exame clínico e da genitália externa sem alterações, os dois testículos na bolsa escrotal, com diâmetro escrotal mínimo de 8 cm, apresentar líbido e produzir um bilião de espermatozoides móveis normais no segundo ejaculado de duas recolhas, realizadas com 1 hora de intervalo (Hernández-avilés & Love, 2021; Varner, 2016).

O exame do garanhão reprodutor é obrigatório para a inscrição na maioria dos livros genealógicos. No caso da raça Lusitana é imprescindível a apresentação de um relatório, previamente à avaliação do garanhão para inscrição como reprodutor, sendo necessário uniformizar os procedimentos e critérios para a raça. De facto, na prática, observa-se uma grande variedade nos relatórios de exame do reprodutor. A utilização de ecografia, com ou sem doppler, para avaliação testicular, por exemplo, não é realizada por rotina, mas é uma valia adicional, permitindo a determinação mais precisa do volume testicular, bem como a identificação e caracterização de lesões testiculares (Hernandez-Aviles & Love, 2021; Varner, 2016; Ortega-Ferrusola et al., 2014).

A recolha de sémen no garanhão faz-se apenas por vagina artificial, utilizando égua peada ou manequim, podendo também ser feita em estação (Crabtree, 2010). O treino do garanhão é um passo fundamental para o sucesso do procedimento, sendo de extrema importância para a segurança dos operadores e dos animais (J. Dascanio & McCue, 2021; Alvarenga et al., 2016; McDonnell, 2016).

A avaliação de sémen permanece como um dos dados mais subjetivos na avaliação do garanhão, verificando-se que diferentes metodologias, utilizadas em diferentes laboratórios, podem, inclusivamente, condicionar a aprovação do garanhão como reprodutor, apesar de influenciarem sobretudo a diferenciação entre um garanhão de moderada ou elevada fertilidade (Whitesell et al., 2020).

Além de ser parte integrante do exame do reprodutor, a avaliação seminal é também realizada por rotina para preparação de doses inseminantes. A fertilidade após IA depende de vários fatores

inerentes não só ao garanhão, mas também à égua e ao próprio manejo reprodutivo (Prell et al., 2020; Kareskoski et al., 2019 ; Charles C. Love, 2016; Sieme et al., 2004). A identificação dos fatores que mais se correlacionam com a fertilidade no garanhão tem sido alvo de vários estudos (Kareskoski et al., 2019; Barrier Battut et al., 2016).

Na avaliação seminal de rotina são incluídos fatores como o volume, a concentração, a motilidade e a morfologia. Estes procedimentos, por serem muitas vezes avaliados do modo subjetivo ou indireto, apresentam grande variabilidade. A utilização de sistemas objetivos como o CASA, para caracterização da motilidade dos espermatozoides, e o NucleoCounter, para a determinação da concentração, representam um progresso importante (Hernandez-Aviles & Love, 2021). A avaliação da vitalidade, através da viabilidade da membrana plasmática, tradicionalmente realizada com eosina-negrosina é utilizada muitas vezes em condições de campo. Atualmente a utilização de corantes fluorescentes como o iodeto de propidium (PI, corante de ADN, cora vermelho células mortas), o diacetato de carbonofluoresceína (CFDA, cora verde as células vivas, indica metabolização do corante e a sua retenção em células com membrana íntegra) ou o SYBR-14 (corante de ADN, cora verde as células vivas) tem vindo a ser utilizada para avaliação da integridade da membrana podendo ser avaliada em microscópio de fluorescência, em sistema CASA e com recurso a citometria de fluxo (Brito, 2007; C. Aurich, 2005). O elevado número de espermatozoides avaliados por citometria de fluxo, garante a maior objetividade desta avaliação (Battut et al., 2017). A avaliação da morfologia pode ser feita a partir da observação de esfregaço corado (eosina negrosina ou corantes como o Diff-Quik) ou utilizando contraste de fase ou microscopia de interferência de contraste diferencial (DIC), a qual, como referido aumenta a precisão da caracterização das anomalias (Whitesell et al., 2020; Varner, 2016).

A maioria do sémen utilizado atualmente na indústria equina é refrigerado, estando descrito que sémen refrigerado a 5°C mantém fertilidade semelhante ao sémen fresco por cerca de 24 horas (C. Aurich, 2008; C. Aurich, 2005). A grande variabilidade individual associada à resistência ao processo de arrefecimento implica o conhecimento do processo e a aplicação de diferentes protocolos em função do garanhão (Rečková et al., 2022; Aurich, 2008).

Utilizam-se, na maioria das vezes, diluidores à base de leite, sendo recomendada uma proporção mínima de 1:3 (sémen: diluidor) para uma concentração final de 25 a  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL (Rečková et al., 2022; Bradecamp, 2021; Papin et al., 2021; Batellier et al., 2001; P. R. Loomis & Graham, 2008; Paul R. Loomis, 2006).

Sempre que a concentração do ejaculado seja inferior a 100 milhões, o mesmo deve ser centrifugado, existindo vários protocolos de centrifugação que variam em força (300-900 G) e em

tempo (10-20 m), os quais, na medida em que a centrifugação provoca sempre algum dano aos espermatozoides, devem ser adaptados consoante a diferente suscetibilidade do ejaculado (Papin et al., 2021; Barrier-Battut et al., 2013; C. Aurich, 2008; Paul R. Loomis, 2006). De modo geral, o ejaculado é diluído previamente à centrifugação (uma parte de sémen para uma parte de diluidor). Após centrifugação e remoção do plasma seminal, o sémen é novamente diluído, sendo que, por rotina, assumem-se perdas entre 20 a 30% com a centrifugação, perdas essas que devem ser contabilizadas na diluição final (Bradecamp, 2021; Paul R. Loomis, 2006).

A generalidade dos estudos considera que a remoção do plasma seminal aumenta a viabilidade e durabilidade do sémen refrigerado (Barrier-Battut et al., 2013), apesar de ser referido que a manutenção de uma pequena percentagem pode ser benéfica para a qualidade *in vitro* e para a fertilidade (Gibb & Aitken, 2016). A remoção do plasma seminal permite aumentar a estabilidade membranária, estando associada a melhor resposta a alterações osmóticas e menor reatividade do acrossoma (Barrier-Battut et al., 2013) e pode reduzir as lesões a nível da cromatina possivelmente por remoção das fontes de radicais livres de oxigénio (ROS)(C C Love et al., 2002). Adicionalmente, o plasma seminal tem vindo a ser referido como responsável por maior resposta inflamatória uterina após IA em vários estudos (J M Morrell & Rocha, 2022), sendo prática comum em muitos países a sua remoção.

O procedimento standard para preparação de sémen refrigerado, preconiza o arrefecimento lento (-0,05°C /minuto) até uma temperatura final de 4 a 10°C, sendo generalizada a utilização de caixas de esferovite, com um tempo de transporte que geralmente varia entre 12 a 24 horas mas pode ir até as 48 horas (Katila, 2011). Na realidade, apesar da temperatura de refrigeração ser usualmente recomendada entre os 4-6°C (C C Love et al., 2002), em estudos realizados com vários sistemas de transporte e temperaturas entre os 4 e os 15 ° C, não se verificaram grandes diferenças nos parâmetros de motilidade após 24-48 horas de refrigeração, bem como na fertilidade após IA (Cuervo-Arango et al., 2015; Brinsko S.P., Rowan K.R., Varner D.D. & T.L., 2000).

Apesar da maioria dos protocolos de conservação de sémen, implicar a redução da sua atividade metabólica, através do arrefecimento, têm vindo a ser desenvolvidos estudos no sentido de criar um diluidor que permita manter a longevidade do sémen do garanhão, sem necessidade de arrefecimento/congelação (Wiebke et al., 2021;Gibb & Aitken, 2016).

***Objetivos: revisão e aquisição de conhecimentos sobre:***

- Recolha de sémen no garanhão: recolha em égua e em manequim, modelos de vagina artificial, preparação e utilização

- Avaliação de sémen no garanhão: metodologia de rotina e técnicas objetivas
- Critérios a utilizar na avaliação seminal: objetivos e uniformização de critérios
- Processamento de sémen para utilização em inseminação artificial: sémen fresco e refrigerado

### ***Metodologia***

**Local: Centro de Reprodução; Unidade Clínica de Alter**

#### **Introdução**

Na introdução serão abordadas as particularidades do treino, recolha, avaliação e processamento do sémen do garanhão. Serão explicadas as várias metodologias passíveis de ser utilizadas na avaliação seminal, bem com a sua variabilidade, sensibilidade e especificidade. Serão apresentados resultados de estudos em várias raças, no que concerne os vários fatores que afetam a qualidade seminal no garanhão. Serão dados exemplos de vários diluidores e sua composição, curvas de arrefecimento e métodos utilizados na refrigeração e transporte do sémen.

#### **Prática**

Na componente prática, os alunos terão oportunidade de realizar os procedimentos nomeadamente, preparar os vários modelos de vagina artificial, preparar o garanhão para a recolha e efetuar a recolha de sémen. Será efetuada a recolha de sémen no garanhão, utilizando preferencialmente manequim de modo a garantir a segurança dos estudantes. O acompanhamento e realização de colheitas em garanhões já treinados, com equipamento de proteção adequado, permitirá a realização efetiva desta componente prática. A existência de grande variabilidade no que concerne o comportamento no garanhão faz com que esta prática seja imprescindível para os estudantes. Os alunos prepararão a sala, os animais e todo o material, incluindo vagina artificial e lavagem do garanhão pré recolha.

Após recolha, o sémen será avaliado em laboratório, volume filtrado, aspeto macroscópico, concentração (contagem manual e determinação em espectrofotómetro), motilidade pré e pós diluição e morfologia. Na avaliação da morfologia serão utilizadas várias colorações e contraste de fases. Será igualmente efetuada a avaliação utilizando sistema computorizado da análise de sémen (CASA), o que permite aferir a uniformizar critérios de avaliação.

Após avaliação os alunos efetuarão todos os cálculos para determinação de dose inseminante com sémen fresco e refrigerado, preparando doses de sémen para aplicação. Serão utilizadas diferentes forças e tempos de centrifugação de modo a que os alunos possam avaliar os diferentes passos e pontos críticos do processo.

## Bibliografia recomendada

- Aurich, C. (2008). Recent advances in cooled-semen technology. *Equine Veterinary Science*, 107, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.015>
- Battut, I. B., Kempfer, A., Lemasson, N., Chevrier, L., & Camugli, S. (2017). Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology*, 97, 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.036>
- Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43, S29–S36. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.006>
- Hernandez-Aviles, C., & Love, C. (2021). Prebreeding season/prepuberal examination of the stallion: testicular ultrasonography, semen evaluation and considerations. *Clinical Theriogenology*, 13(289), 289–298. <https://doi.org/10.58292/ct.v13i3.9102>
- Hernández-Avilés, C., Zambrano-Varón, J., & Jiménez-Escobar, C. (2019). Current trends on stallion semen evaluation: What other methods can be used to improve our capacity for semen assessment? *Journal of Veterinary Andrology*, 4(1), 1–19
- Love, Charles C. (2016). Modern Techniques for Semen Evaluation. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(3), 531–546. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.006>
- Papin, J., Stuhtmann, G., Martinsson, G., Sieme, H., Lundeheim, N., Ntallaris, T., & Morrell, J. M. (2021). Stored Stallion Sperm Quality Depends on Sperm Preparation Method in INRA82 or INRA96. *Journal of Equine Veterinary Science*, 98. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103367>
- Varner, D. D. (2016). Approaches to Breeding Soundness Examination and Interpretation of Results. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43, S37–S44. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.075>

## Tema 7: Criopreservação de sémen no garanhão

### **Enquadramento**

A criopreservação está associada à perda de qualidade do sémen após descongelamento, nomeadamente através da indução de alterações estruturais nos espermatozoides (Atroshchenko et al., 2019). No entanto, nos últimos anos, a melhoria da fertilidade aquando da utilização de sémen congelado, tem levado ao aumento da sua utilização. A melhoria da fertilidade após inseminação artificial (IA) com sémen congelado pode estar associada a vários fatores, nomeadamente a técnica de IA intrauterina profunda, que permite reduzir a dose inseminante, a utilização de novos crioprotetores e a utilização de técnicas que permitem a seleção de espermatozoides previamente à criopreservação (J. Aurich et al., 2020; Šichtař et al., 2019; Al-Essawe et al., 2018; Alvarenga et al., 2016).

A resistência à criopreservação de sémen apresenta uma grande variabilidade individual no garanhão, sendo influenciada por vários fatores como a idade, sazonalidade, raça (Aurich et al., 2020; Greiser et al., 2020; Jiménez-Rabadán et al., 2016; Loomis & Graham, 2008; C C Love et al., 2002; P. R. Loomis, 2001). De modo geral pode dizer-se que a fertilidade do sémen criopreservado de garanhão é inferior à de outras espécies. Uma das razões apontadas para a menor resistência à

criopreservação prende-se que a o facto da seleção nesta espécie ser sobretudo baseada em caracteres morfológicos e em qualidade desportiva (Al-Essawe et al., 2018; P. R. Loomis & Graham, 2008). Devido à grande variabilidade individual, os garanhões são, muitas vezes, classificado como bons, médios e maus refrigeradores/congeladores, de acordo com a resistência dos espermatozoides ao processo de criopreservação (P. R. Loomis & Graham, 2008).

O processo de criopreservação, como nas outras espécies, implica stress osmótico, lesão por cristais de gelo, stress oxidativo e lesão a nível do ADN, provocando alterações na membrana plasmática, peroxidação lipídica, aumento significativo dos níveis de radicais livres de oxigénio (ROS), lesão mitocondrial e fragmentação da ADN, com consequente diminuição da motilidade e redução da fertilidade (Yeste et al., 2015; Watson, 2000), sendo que, os garanhões produtores de ejaculados com elevada congelabilidade apresentam maior percentagem de espermatozoides viáveis com elevado conteúdo em peróxidos e superóxidos em comparação com os garanhões com baixa congelabilidade (Yeste et al., 2015).

Existem diferentes protocolos de congelação, com diferentes diluidores os quais podem ser adaptados em função do garanhão e da qualidade inicial do ejaculado (Bubenickova et al., 2020; Nikitkina et al., 2020; Al-Essawe et al., 2018; Álvarez et al., 2014; Loomis & Graham, 2008).

A centrifugação é, geralmente, o processo mais utilizado na pré congelação. O principal objetivo da centrifugação é a remoção do plasma seminal e a concentração da fração espermática, sendo que um processo eficaz pretende recuperar o máximo possível de espermatozoides, com um mínimo de efeitos deletérios para os mesmos (Varner, 2016). Apesar da generalidade dos protocolos de congelação implicar a remoção do plasma seminal por centrifugação, alguns estudos mostraram os efeitos benéficos da adição de determinadas proteínas seminais na qualidade do sémen criopreservado, sendo o efeito dependente da concentração a que são adicionadas (Bubenickova et al., 2020). Alternativamente à centrifugação, outros métodos como a filtração podem ser utilizados para remoção do plasma seminal (Alvarenga et al., 2016).

Como referido, os diluidores incluem geralmente açúcares, substâncias tampão, eletrólitos, gema de ovo e leite ou subprodutos do leite (Batellier et al., 2001). É fundamental a proporção de cada componente, de modo a assegurar a osmolaridade do diluidor a qual, em conjunto com a manutenção do pH pelas substâncias tampão, tem um papel central na manutenção da motilidade após arrefecimento. Na congelação de sémen de garanhão, como crioprotetores foram tradicionalmente utilizados, produtos de origem biológica, como a gema de ovo e o leite ou seus derivados, os quais, pela sua natureza biológica, podem incluir substâncias deletérias para os espermatozoides. Na última década foram desenvolvidos vários diluidores comerciais, com

composição química definida, que são atualmente os mais utilizados na refrigeração e criopreservação de sémen (Šichtař et al., 2019). A utilização de diluidores inicialmente desenvolvidos para ruminantes apresenta-se como uma boa alternativa, originando resultados *in vitro* e *in vivo* (fertilidade após IA) semelhantes aos diluidores desenvolvidos para a espécie equina (Nikitkina et al., 2020). A utilização de diferentes crioprotetores, nomeadamente glicerol, derivados do glicerol, metilamidas, em associação ou isolados, permite aumentar a qualidade sémen após criopreservação (Álvarez et al., 2014).

O sémen é geralmente criopreservado a uma concentração de 200 a  $400 \times 10^6$ / mL e em palhinhas de 0,5 mL. As características iniciais do ejaculado condicionam o n.º de doses possíveis de criopreservar, sendo que o n.º de espermatozoides total do ejaculado é uma das variáveis que contribui de modo mais significativo para o n.º de doses criopreservadas por recolha (Aurich et al, 2020; Alvarenga et al., 2016). A qualidade do ejaculado pode ser melhorada recorrendo a algumas técnicas de processamento, as quais implicam conhecimento e destreza na manipulação dos ejaculados (Al-Essawe et al., 2018; Hidalgo et al., 2017).

Após diluição e enchimento das palhinhas inicia-se o processo de arrefecimento/congelação. A curva de arrefecimento/congelação depende dos diluidores utilizados sendo, regra geral, processado em duas fases com diferentes velocidades de arrefecimento: até 5°C com velocidade de 3º a 5 º C/minuto e a partir dos 5°C a uma velocidade de 20-50°C/minuto até aos -196°C (Alvarenga et al., 2016). Os tempos de equilíbrio variam entre os 20 minutos e as 2 horas, dependentemente do diluidor.

A criopreservação pode ser feita de modo manual, com recurso a caixa térmica e a vapores de azoto, ou em congelador automático ( McCue, 2021; Nikitkina et al., 2020; Alvarenga et al., 2016).

A seleção do sémen após congelação/descongelação, é muitas vezes efetuada com base na motilidade, sendo considerada aceitável uma motilidade igual ou superior a cerca de 30-35 % (McCue, 2021; Vidament et al., 2005). A existência de garanhões cujo sémen apresenta elevada motilidade e baixa fertilidade após descongelação e de outros com elevada fertilidade e baixa motilidade, implica a necessidade de utilização de metodologias diferentes na avaliação do sémen após congelação/descongelação, sendo aceite que um único teste não é suficiente para prever a fertilidade após utilização de sémen congelado (Hernández-Avilés et al., 2019; Battut et al., 2017; Charles C. Love, 2016; Peña et al., 2016; Varner, 2016) .

***Objetivos: revisão e aquisição de conhecimentos sobre:***

- Processamento do sémen de garanhão para congelação: recolha, avaliação, centrifugação, fases de arrefecimento

- Avaliação do sémen pré congelação e após descongelação: efeito da qualidade inicial do ejaculado.

**Metodologia:**

**Local: Centro de Reprodução; Unidade Clínica de Alter**

**Introdução**

Serão abordados os diferentes passos da criopreservação, diferentes curvas de arrefecimento e diferentes métodos (manual ou com utilização de equipamento de congelação automática). Serão igualmente abordados os diferentes diluidores e suas características e apresentados resultados obtidos com a sua utilização.

**Componente prática**

Nesta componente os estudantes terão oportunidade de realizar todos os passos da criopreservação de sémen, desde a recolha e avaliação inicial, à utilização de várias forças e velocidades de centrifugação, utilização de diferentes diluidores, preparação do arrefecimento e criopreservação propriamente dita. Após criopreservação o sémen será descongelado e avaliado utilizando as metodologias tradicionais, bem como o sistema CASA.

**Bibliografia recomendada para este tema**

- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Ramires Neto, C. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(3), 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003>
- Álvarez, C., Gil, L., González, N., Olaciregui, M., & Luño, V. (2014). Cryobiology Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96 Ò extender q. *Cryobiology*, 69(1), 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.06.008>
- Aurich, J., Kuhl, J., Tichy, A., & Aurich, C. (2020). Efficiency of semen cryopreservation in stallions. *Animals*, 10(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani10061033>
- Battut, I. B., Kempfer, A., Lemasson, N., Chevrier, L., & Camugli, S. (2017). Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology*, 97, 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.036>
- Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43, S29–S36. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.006>
- Loomis, P. R., & Graham, J. K. (2008). Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105(1–2), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.010>

## Tema 8: Processamento de sémen de garanhões maus refrigeradores/congeladores

### Enquadramento

Na seleção na espécie equina os critérios de seleção não incluem, na maioria das raças, os caracteres reprodutivos (Al-Essawe et al., 2018). Assim, sabe-se que apenas 20 % dos garanhões resiste bem à criopreservação e que cerca de 20-50% dos garanhões produz sémen que resiste mal aos processos de arrefecimento e congelação (Vidament et al., 1997). A variabilidade ocorre não só entre garanhões, mas também entre ejaculados do mesmo garanhão (Loomis & Graham, 2008). Na medida em que a refrigeração e congelação são fundamentais na indústria equina, importa conhecer as várias metodologias disponíveis, passíveis de serem utilizadas na melhoria da qualidade do sémen pré e pós refrigeração/congelação. Há várias técnicas que podem ser aplicadas com vista a melhorar a qualidade do sémen, sendo que, de modo geral, podem envolver processos de centrifugação e diferentes métodos de seleção dos espermatozoides baseados nas suas características, nomeadamente a motilidade (migração ou swimming up), a integridade de membrana (filtração) e a motilidade, morfologia, viabilidade e integridade da cromatina (centrifugação com coloide) (Al-Kass et al., 2021; Papin et al., 2021; Šichtař et al., 2019; Hidalgo et al., 2017; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011). A adição de diferentes componentes ao sémen, nomeadamente frações do plasma seminal, proteínas do plasma seminal, antioxidantes permite aumentar a resistência ao processo de criopreservação, podendo ser aplicada isolada ou associada a outras técnicas (Contreras et al., 2020; Šichtař et al., 2019; Al-Essawe et al., 2018).

A centrifugação, utilizada para concentrar o ejaculado e remover o excesso de plasma seminal, deve procurar recuperar o máximo de espermatozoides, mas sem comprometer a sua integridade e pode ser aplicada com diferentes forças e tempos, com ou sem a utilização de “almofadas” (Carroll, 2013; Bliss et al., 2012; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011). A utilização de compostos com o iodixanol, como almofada (*cushion*), permitiu aumentar a força e tempo de centrifugação, e, consequentemente, a taxa de recuperação, protegendo os espermatozoides das lesões associadas ao processo. Pode ser aplicado em tubos *Falcon* de base cónica ou em tubos com extremidade em ponta (*nipple*), sendo os últimos recomendados quando a concentração do ejaculado é baixa (Alvarenga et al., 2016; Bliss et al., 2012). Apesar de, inicialmente, se recomendar a utilização de 3,5 mL de solução de iodixanol atualmente este volume pode ser reduzido a volumes mínimos de 1 (Bliss et al., 2012) a 0,2 mL (Charles Love, comunicação pessoal), o que permite que não seja necessária a sua remoção após o processo, facilitando a aplicação da técnica. A utilização de forças de centrifugação de cerca de 1000 G durante 20 minutos, possível com a utilização destes compostos, permite a recuperação de 90 a 95% dos espermatozoides. Como referido anteriormente, o sémen é geralmente diluído pré centrifugação, tendo os diluidores,

nomeadamente os diluidores um papel importante por conterem antioxidantes os quais podem contrariar a libertação de radicais livres de oxigénio (ROS) associada à centrifugação (J. M. Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011).

Alguns estudos contemplaram a utilização de técnicas alternativas à remoção do plasma seminal por centrifugação, utilizando o *swimming up*. Esta técnica assenta na motilidade dos espermatozoides de uma suspensão para outra, não existindo nenhuma seleção com base na morfologia, integridade da cromatina, viabilidade, ou integridade do acrossoma. Apesar de haver algumas modificações que podem aumentar a seletividade desta técnica, esta não é utilizada por rotina na medida em que apenas permite uma baixa taxa de recuperação (J. M. Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011). No entanto, num estudo realizado por Hidalgo et al. (2017) a taxa de recuperação utilizando uma técnica de *swimming up* modificada, foi semelhante à centrifugação com coloide, apesar de esta técnica não permitir a separação completa do plasma seminal, sendo por isso, referida como menos eficaz que a centrifugação com coloide.

A filtração é apontada por alguns autores com uma alternativa menos dispendiosa, prática e de aplicação mais célere. Apesar de originar menor taxa de recuperação e menor motilidade após refrigeração, quando comparado com a centrifugação com almofada (cushion), pode ser uma alternativa em termos práticos em condições de campo (Roach et al., 2016).

A centrifugação utilizando coloides pode ser subdividida entre centrifugação utilizando gradientes de densidade e centrifugação em monocamada (SLC, single layer centrifugation) (Papin et al., 2021; J. M. Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011). Nesta técnica, o sémen, previamente diluído, é centrifugado através de um coloide. Durante este processo os espermatozoides movem-se para o ponto que corresponde a sua própria densidade, tendo como objetivo que a conjugação da força e tempo de centrifugação, associados às características do coloide permitam formar um pellet de espermatozoides de boa qualidade na base do tubo de centrifugação. Inicialmente o processo implicava vários coloides com diferentes densidades (gradiente de densidade) mas, atualmente, utiliza-se sobretudo a centrifugação utilizando um coloide em monocamada (SLC), específico para cada espécie. O procedimento tem sido amplamente utilizado no processamento de sémen de garanhão, permitindo a seleção de espermatozoides de boa qualidade, previamente ao processo de criopreservação (Morrel et al., 2009), apesar de se observar uma grande variabilidade entre garanhões na qualidade dos ejaculados após aplicação do processo (Al-Kass et al. 2021). Adicionalmente a utilização de SLC permite melhorar a qualidade microbiológica do ejaculado sem efeitos significativos nos parâmetros cinéticos de avaliação do sémen após congelação e descongelação (Guimarães et al., 2015).

A adição de plasma seminal de garanhões com diferente resistência à criopreservação (bons a maus “congeladores”), após centrifugação utilizando filtros de monocamada, não influenciou a qualidade do sémen após congelação/descongelação (Al-Essawe et al., 2018). A adição de antioxidantes aos diluidores de sémen de garanhão apresenta resultados promissores na melhoria da eficácia do processo (Contreras et al., 2020).

**Objetivos: aquisição de conhecimentos no que concerne:**

- Identificação de garanhões mau refrigeradores/congeladores: avaliação de sémen refrigerado e congelado
- Avaliação do sémen pré congelação e após descongelação
- Processamento de sémen de má qualidade: centrifugação a diferentes forças e tempos, utilização de coloides de monocamada, com diferentes gradientes e de “almofada” (*cushion fluid*).

**Metodologia**

**Local: Centro de Reprodução; Unidade Clínica de Alter**

**Introdução**

Serão explicados os processos passíveis de serem utilizados no processamento de garanhões maus refrigeradores/congeladores e a sua fundamentação teórica, nomeadamente no que concerne a centrifugação, utilização de diferentes diluidores, adição de diferentes aditivos e diferentes técnicas de processamento com a utilização de centrifugação com filtros de monocamada (SLC), bem como a utilização de “almofada” de centrifugação (*cushion fluid*). Serão apresentados resultados da aplicação de várias técnicas de processamento em diferentes raças e por diferentes equipas, com variações particulares para cada técnica.

**Componente prática**

Nesta componente os estudantes terão oportunidade de realizar a maioria dos passos do processamento do sémen passíveis de serem utilizados na prática clínica para a melhoria da sua qualidade pré e pós criopreservação. Nomeadamente serão aplicados processos de centrifugação, com diferentes tempos e forças gravitacionais (g), utilização de SLC, centrifugação com almofada (*cushion fluid*), bem como a combinação de duas ou mais técnicas. Pré e pós criopreservação o sémen será avaliado utilizando as metodologias tradicionais e o sistema CASA.

## Bibliografia recomendada

- Al-Essawe, E., Johannisson, A., Wulf, M., Aurich, C., & Morrell, J. (2018). Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. *Cryobiology*, 81(July 2017), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.01.009>
- Al-Kass, Z., Brown, A., Johannisson, A., Ntallaris, T., & Morrell, J. M. (2021). Variation among stallions in sperm quality after single layer centrifugation. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(6), 848–856. <https://doi.org/10.1111/rda.13924>
- Morrell, J. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2011). Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Veterinary Medicine International*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/894767>
- Šichtař, J., Bubeníčková, F., Sirohi, J., & Šimoník, O. (2019). How to increase post-thaw semen quality in poor freezing stallions: Preliminary results of the promising role of seminal plasma added after thawing. *Animals*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/ani9070414>
- Varner, D. D. (2016). Strategies for Processing Semen from Subfertile Stallions for Cooled Transport. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(3), 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.007>

## Tema 9: Centros de recolha e congelação de sémen: enquadramento e licenciamento

A legalização de um centro de recolha e congelação de sémen tem um enquadramento legal específico, devendo respeitar, não só condições sanitárias, mas também condições de segurança e de bem-estar animal. O processo é complexo e envolve várias entidades nomeadamente a Direção Regional de Agricultura, a Divisão de Intervenção Veterinária e Direção Geral de Alimentação e Veterinária.

Do ponto de vista sanitário é fundamental prevenir a transmissão de doenças de acordo com os regulamentos europeus, aplicando as medidas de biossegurança necessárias, realizando os testes de diagnóstico recomendados, os quais diferem entre espécies animais, e assegurando as condições sanitárias das instalações e medidas de controlo das mesmas (Comissão europeia, 2020; 2019, 2016; OIE, 2019; Ministério da Agricultura, 2004). Como aspetos mais relevantes no processo importa salientar a classificação necessária, de acordo com o regime do exercício da atividade pecuária (REAP), as regras de admissão dos animais e os tempos de quarentena, as instalações, incluindo quarentena e tratamento de efluentes, o circuito dos animais no centro, os procedimentos de recolha, avaliação e processamento do sémen e as regras para armazenamento de produtos germinais (Comissão europeia, 2020; 2019, 2016; Ministério da Agricultura, 2013, 2004; OIE, 2019)

Devem ser respeitadas as boas práticas laboratoriais de modo a garantir condições de biossegurança (OIE, 2019).

**Metodologia:**

**Local: Polo da Mitra**

**Exposição teórica: como legalizar um centro de recolha e congelação de sémen**

Será efetuado seminário presencial ou on line em que se convidarão os vários intervenientes no processo de legalização de um centro de recolha e congelação de sémen. Nesta apresentação procurar-se-á apresentar um fluxograma dos vários passos de licenciamento de um centro, bem como abordar os manuais de procedimentos existentes para os três centros com os quais os alunos tiveram contacto ao longo das aulas práticas.

**Bibliografia recomendada**

Comissão europeia. (2016). Regulamento (UE) n.º 2016/429 do Parlamento Europeu e do Conselho de 9 de março de 2016, relativo às doenças animais transmissíveis e que altera e revoga determinados atos no domínio da saúde animal (“Lei da Saúde Animal”). Jornal Oficial Da União Europeia, 2014(37), 16–18. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0429&from=EN>

Comissão europeia. (2019). COMMISSION DELEGATED REGULATION (EU) 2020/686 of 17 December 2019 supplementing Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council as regards the approval of germinal product establishments and the traceability and animal health requir. 0203(504), 12008.

Comissão europeia. (2020). REGULAMENTO DELEGADO (UE) 2020/688 DA COMISSÃO de 17 de dezembro de 2019 que complementa o Regulamento (UE) 2016/429 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito aos requisitos de saúde animal aplicáveis à circulação na União de animais terrestre. 2019, 140–210.

Ministério da Agricultura. (2013). Decreto-Lei n.º 81/2013 de 14 de junho;113, 3304–3329.

Ministério da Agricultura (2004). Decreto-Lei 187/2004 de 7 de agosto; 185, 5122–5132.

OIE. (2019). Terrestrial animal health code: General provisions (Vol. 1).

#### 4. Bibliografia

- Abadjieva, D., Yotov, S., Mladenova, V., Lauberte, L., Kalvanov, I., Krasilnikova, J., Telesheva, G., & Kistanova, E. (2020). Positive effect of natural antioxidant oregonin from *Alnus incana* bark on ram semen quality stored at 5 °C for 48 h. *Research in Veterinary Science*, 131(March), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.021>
- Abril-Parreño, L., Krogenæs, A. K., Byrne, C. J., Donovan, A., Stuen, S., Caldas, E., Diskin, M., Druart, X., & Fair, S. (2021). Ewe breed differences in cervical anatomy and cervicovaginal mucus properties: An international study. *Theriogenology*, 160, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.038>
- Abril-Sánchez, S., Freitas-de-Melo, A., Giriboni, J., Santiago-Moreno, J., & Ungerfeld, R. (2019). Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternative techniques. *Animal Reproduction Science*, 205(March), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.023>
- Al-Essawe, E., Johannisson, A., Wulf, M., Aurich, C., & Morrell, J. (2018). Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. *Cryobiology*, 81(July 2017), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.01.009>
- Alhamada, M., Debus, N., & Bocquier, F. (2017). An automated method for the evaluation of ram libido in real mating conditions. *Animal*, 11(11), 2036–2044. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000611>
- Ali, M. Z., Ahmad, A., Chatagnon, G., Moussa, M., Tainturier, D., Anton, M., & Fieni, F. (2008). Use of Glutamine and Low Density Lipoproteins Isolated from Egg Yolk to Improve Buck Semen Freezing. 436, 429–436. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00930.x>
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Ramires Neto, C. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(3), 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003>
- Álvarez, C., Gil, L., González, N., Olaciregui, M., & Luño, V. (2014). Cryobiology Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96 ° extender q. *Cryobiology*, 69(1), 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.06.008>
- Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Boixo, J. C., Chamorro, C., Neila-Montero, M., Montes-Garrido, R., de Paz, P., & Anel, L. (2019). Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(S4), 32–40. <https://doi.org/10.1111/rda.13523>
- Atroshchenko, M. M., Bragina, E. E., Zaitsev, A. M., Kalashnikov, V. V., Naumenkova, V. A., Kudlaeva, A. M., & Nikitkina, E. V. (2019). Conservation of genetic resources in horse breeding and major structural damages of sperm during semen cryopreservation in stallions. *Nature Conservation Research*, 4, 78–82. <https://doi.org/10.24189/ncr.2019.024>
- Aurich, C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4 SPEC. ISS.), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.025>
- Aurich, C. (2008). Recent advances in cooled-semen technology & 107, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.015>
- Aurich, J., Kuhl, J., Tichy, A., & Aurich, C. (2020). Efficiency of semen cryopreservation in stallions. *Animals*, 10(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani10061033>
- Baiee, F., Haron, W., Yusoff, R., Omar, A., Yimer, N., Hammadi, S., Ahmedeltayeb, T., & Kaka, A. (2018). Modification of electro-ejaculation technique to minimise discomfort during semen collection in bulls. *Pakistan Journal of Zoology*, 50(1), 83–89. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.1.83.89>
- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, 10(1), 49–62. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>
- Barrier-Battut, I., Bonnet, C., Giraudo, A., Dubois, C., Caillaud, M., & Vidament, M. (2013). Removal of Seminal Plasma Enhances Membrane Stability on Fresh and Cooled Stallion Spermatozoa. *Reproduction in*

*Domestic Animals*, 48(1), 64–71. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02026.x>

- Barrier Battut, I., Kempfer, A., Becker, J., Lebailly, L., Camugli, S., & Chevrier, L. (2016). Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology*, 86(4), 1111–1131. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.001>
- Barth, A. D. (2018). Review: The use of bull breeding soundness evaluation to identify subfertile and infertile bulls. *Animal*, 12(s1), s158–s164. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000538>
- Barth, Albert D., & Waldner, C. L. (2002). Factors affecting breeding soundness classification of beef bulls examined at the Western College of Veterinary Medicine. *Canadian Veterinary Journal*, 43(4), 274–284.
- Bashawat, M., Hensel, B., Müller, K., & Schulze, M. (2021). Cooled storage of semen from livestock animals (Part II): Camelids, goats, and sheep. *Animal Reproduction Science*, 234(May). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106855>
- Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J. M., & Magistrini, M. (2001). Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, 68(3–4), 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00155-5)
- Battut, I. B., Kempfer, A., Lemasson, N., Chevrier, L., & Camugli, S. (2017). Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology*, 97, 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.036>
- Bezerra, F. S. B., Castelo, T. S., Alves, H. M., Oliveira, I. R. S., Lima, G. L., Peixoto, G. C. X., Bezerra, A. C. S. D., & Silva, A. R. (2011). Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology*, 63(3), 263–266. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.09.136>
- Bittencourt, R. F., Oba, E., de Almeida Biscarde, C. E., Azevedo, H. C., Bittencourt, M. V., de Menezes, G. F. O., da Silva Lima, A., da Mata Fuchs, K., & de Lisboa Ribeiro Filho, A. (2018). Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation. *Cryobiology*, 85(October), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.266>
- Bliss, S. B., Voge, J. L., Hayden, S. S., Teague, S. R., Brinsko, S. P., Love, C. C., Blanchard, T. L., & Varner, D. D. (2012). The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *THE*, 77(6), 1232–1239. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.031>
- Boryshpolets, S., Kowalski, R. K., Dietrich, G. J., Dzyuba, B., & Ciereszko, A. (2013). Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*, 80(7), 758–765. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.019>
- Bradecamp, E. A. (2021a). Centrifugation of Semen: Standard Technique. In *Equine Reproductive Procedures* (pp. 551–556).
- Bradecamp, E. A. (2021b). Packing Semen for Cooled Transport. In John Wiley & Sons (Ed.), *Equine Reproductive Procedures* (pp. 541–546). <https://doi.org/10.1002/9781119556015.ch146>
- Brinsko S.P., Rowan K.R., Varner D.D., B., & T.L. (2000). Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 53(8), 1641–1655.
- Brito, L. F. C. (2007). Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6(4), 249–264. <https://doi.org/10.1053/j.ctep.2007.09.004>
- Bubenickova, F., Postlerova, P., Simonik, O., Sirohi, J., & Sichtar, J. (2020). Effect of seminal plasma protein fractions on stallion sperm cryopreservation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21176415>
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220–1233. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>
- Chenoweth, P. J., & McPherson, F. J. (2016). Bull breeding soundness, semen evaluation and cattle productivity. *Animal Reproduction Science*, 169, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.03.001>

- Chenoweth, Peter J., Hopkins, F. M., Spitzer, J. C., & Larsen, R. E. (2010). Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation form. *Clinical Theriogenology*, 2(1), 43–50. [https://www.researchgate.net/profile/Peter-Chenoweth-2/publication/281575349\\_Guidelines\\_for\\_using\\_the\\_bull\\_breeding\\_soundness\\_evaluation\\_form/link/s/5e3a561292851c7f7f1d0978/Guidelines-for-using-the-bull-breeding-soundness-evaluation-form.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Peter-Chenoweth-2/publication/281575349_Guidelines_for_using_the_bull_breeding_soundness_evaluation_form/link/s/5e3a561292851c7f7f1d0978/Guidelines-for-using-the-bull-breeding-soundness-evaluation-form.pdf)
- Comissão europeia. (2016). Regulamento (UE) n.º 2016/429 do Parlamento Europeu e do Conselho de 9 de março de 2016, relativo às doenças animais transmissíveis e que altera e revoga determinados atos no domínio da saúde animal (“Lei da Saúde Animal”). *Jornal Oficial Da União Europeia*, 2014(37), 16–18. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0429&from=EN>
- Comissão europeia. (2019). *COMMISSION DELEGATED REGULATION (EU) 2020/686 of 17 December 2019 supplementing Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council as regards the approval of germinal product establishments and the traceability and animal health requir.* 0203(504), 12008.
- Comissão europeia. (2020). *REGULAMENTO DELEGADO (UE) 2020/688 DA COMISSÃO de 17 de dezembro de 2019 que complementa o Regulamento (UE) 2016/429 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito aos requisitos de saúde animal aplicáveis à circulação na União de animais terrestre.* 2019, 140–210.
- Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Ortiz, I., Arenas, R., Morrell, J. M., & Hidalgo, M. (2019). Vitrification of Large Volumes of Stallion Sperm in Comparison With Spheres and Conventional Freezing: Effect of Warming Procedures and Sperm Selection. *Journal of Equine Veterinary Science*, 83, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.01.017>
- Contreras, M. J., Treulen, F., Arias, M. E., Silva, M., Fuentes, F., Cabrera, P., & Felmer, R. (2020). Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(2), 229–239. <https://doi.org/10.1111/rda.13611>
- Crabtree, J. (2010). Prebreeding examination of the stallion 1. Physical examination. *In Practice*, 32(1), 22–28. <https://doi.org/10.1136/inp.b5503>
- Dascanio, J. J., & McCue, P. M. (2014). Equine Reproductive Procedures. In *Equine Reproductive Procedures*. <https://doi.org/10.1002/9781118904398>
- Delgadillo, J. A., Espinoza-flores, L. A., Abecia, J. A., Hernández, H., & Keller, M. (2022). Domestic Animal Endocrinology Sexually active male goats stimulate the endocrine and sexual activities of other males in seasonal sexual rest through the “buck-to-buck effect.” *Domestic Animal Endocrinology*, 81, 106746. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2022.106746>
- Dias, E. A. R., Campanholi, S. P., Rossi, G. F., Freitas Dell'Aqua, C. de P., Dell'Aqua, J. A., Papa, F. O., Zorzetto, M. F., de Paz, C. C. P., Oliveira, L. Z., Mercadante, M. E. Z., & Monteiro, F. M. (2018). Evaluation of cooling and freezing systems of bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 195(January), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.012>
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária. (2017). *Normas para Aplicação e Validação dos Programas de Conservação Genética Animal e Programas de Melhoramento Genético Animal - PDR2020.* 18. <https://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=208489&cboui=208489>
- Dorado, J., Rodríguez, I., & Hidalgo, M. (2007). Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, 68(2), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.048>
- Education European Association of Establishments For Veterinary, & Federation of Veterinarians of Europe. (2016). List of subjects and day one competences. *European System of Evaluation of Veterinary Training (ESEVT): Manual of Standard Operating Procedure*, May, 29–34. [https://www.eaeve.org/fileadmin/downloads/SOP/ESEVT\\_\\_Uppsala\\_\\_SOP\\_May\\_2016.pdf](https://www.eaeve.org/fileadmin/downloads/SOP/ESEVT__Uppsala__SOP_May_2016.pdf)
- Ezzati, M., Shanelbandi, D., Hamdi, K., Rahbar, S., & Pashaial, M. (2020). Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell and Tissue Banking*, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10561-019-09797-0>

- Falah Hasan BaieeFalah, Ali Al-Wahab, & Asaad Alaa Almusawi. (2020). Effect of vitrification on spermatozoa quality in bull semen. *Eurasian Journal of Biosciences*, 14(October), 3897–3904. [https://www.researchgate.net/publication/344754347\\_Effect\\_of\\_vitrification\\_on\\_spermatozoa\\_quality\\_in\\_bull\\_semen](https://www.researchgate.net/publication/344754347_Effect_of_vitrification_on_spermatozoa_quality_in_bull_semen)
- Farshad, A., & Hosseini, Y. (2013). The cryoprotective effects of amino acids supplementation on cooled and post-thaw Markhoz bucks semen quality. *Small Ruminant Research*, 114(2–3), 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.07.007>
- Gacem, S., Bompart, D., Valverde, A., Catalán, J., Miró, J., & Soler, C. (2020). Optimal frame rate when there were stallion sperm motility evaluations and determinations for kinematic variables using CASA-Mot analysis in different counting chambers. *Animal Reproduction Science*, 223(November). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106643>
- Gangwar, C., Saxena, A., Patel, A., Singh, S. P., Yadav, S., Kumar, R., & Singh, V. (2018). Effect of reduced glutathione supplementation on cryopreservation induced sperm cryoinjuries in Murrah bull semen. *Animal Reproduction Science*, 192, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.005>
- Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43, S29–S36. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.006>
- Giriboni, J., Lacuesta, L., & Ungerfeld, R. (2017). Theriogenology Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology*, 87, 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.004>
- Glioza, T. M., Turri, F., Manes, S., Cassinelli, C., & Pizzi, F. (2017). The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, 11(11), 1–8. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000684>
- Greiser, T., Sieme, H., Martinsson, G., & Distl, O. (2020). Theriogenology Breed and stallion effects on frozen-thawed semen in warmblood , light and quarter horses. *Theriogenology*, 142, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.033>
- Guerrero-Gutiérrez, M., Ungerfeld, R., Kako Rodriguez, M. G., Santiago-Moreno, J., & Giriboni, J. (2021). Using transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands for buck semen collection yields semen with greater cryoresistance than electroejaculation alone during the breeding season. *Theriogenology*, 172, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.016>
- Guimarães, T., Lopes, G., Pinto, M., Silva, E., Miranda, C., Correia, M. J., Damásio, L., Thompson, G., & Rocha, A. (2015). Colloid centrifugation of fresh stallion semen before cryopreservation decreased microorganism load of frozen-thawed semen without affecting seminal kinetics. *Theriogenology*, 83(2), 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.003>
- Hahn, K., Failing, K., & Wehrend, A. (2019). Effect of temperature and time after collection on buck sperm quality. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2135-y>
- Hernandez-Aviles, C., & Love, C. (2021). Prebreeding season/prepur hase examination of the stallion: testicular ultrasonography, semen evaluation and considerations. *Clinical Theriogenology*, 13(289), 289–298.
- Hernández-avilés, C., & Love, C. (2021). *Prebreeding season / prepurchase examination of the stallion : testicular ultrasonography, semen evaluation , and considerations. July.*
- Hernández-avilés, C., Ramírez-agámez, L., & Makloski-cohorn, C. (2021). *Macroscopic and Physicochemical Analysis of the Ejaculate 17. 3 - Routine Microscopic Analysis.* 257–274.
- Hernández-Avilés, C., Zambrano-Varón, J., & Jiménez-Escobar, C. (2019). Current trends on stallion semen evaluation: What other methods can be used to improve our capacity for semen assessment? *Journal of Veterinary Andrology*, 4(1), 1–19.
- Hidalgo, M., Ortiz, I., Dorado, J., Morrell, J. M., Gosálvez, J., Consuegra, C., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., & Crespo, F. (2017). Stallion sperm selection prior to freezing using a modified colloid swim-up procedure without centrifugation. *Animal Reproduction Science*, 185(June), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.08.005>

- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M. R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M. D., & Garde, J. J. (2016). Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 167, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.013>
- Jiménez-Rabadán, Pilar, García-Álvarez, O., Vidal, A., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Ramón, M., del Olmo, E., Fernández-Santos, R., Garde, J. J., & Soler, A. J. (2015). Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, 71(1), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.05.004>
- Julienne, P., & Evain, A. (1997). *Equine frozen semen, freezability*. 97, 907–917.
- Kareskoski, M., Venhoranta, H., Virtala, A. M., & Katila, T. (2019). Analysis of factors affecting the pregnancy rate of mares after inseminations with cooled transported stallion semen. *Theriogenology*, 127, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.036>
- Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Tibary, A., & Pelzer, K. (2011). Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. *Small Ruminant Research*, 99(2–3), 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.03.057>
- Katila, T. (2011). Containers for transport of equine semen. In AO. McKinnon, EL. Squires, WE. Vaala, & DD. Varner (Eds.) (Ed.), *EQUINE REPRODUCTION* (2nd ed., pp. 1330–1335). WILEY-BLACKWELL.
- Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E. B., Hassan, M. A. E., & Mohey-Elsaeed, O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6, S49–S56. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001>
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>
- Leboeuf, B., Delgadillo, J. A., Manfredi, E., Piacère, A., Clément, V., Martin, P., Pellicer, M., Boué, P., & De Cremoux, R. (2008). Management of Goat Reproduction and Insemination for Genetic Improvement in France. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(SUPPL.2), 379–385. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01188.x>
- Leboeuf, B., Restall, B., & Salamon, S. (2006). *Production and storage of goat semen for artificial insemination*. 113–141.
- Liu, C. H., Dong, H. B., Ma, D. L., Li, Y. W., Han, D., Luo, M. J., Chang, Z. Le, & Tan, J. H. (2016). Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential. *Animal Reproduction Science*, 164, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.011>
- Loomis, P. R. (2001). The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science*, 68(3–4), 191–200. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00156-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00156-7)
- Loomis, P. R., & Graham, J. K. (2008). Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105(1–2), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.010>
- Loomis, Paul R. (2006). Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 22(3), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.07.002>
- Love, C C, Thompson, J. A., Lowry, V. K., & Varner, D. D. (2002). *Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility*. 57, 1135–1142.
- Love, Charles C. (2016). Modern Techniques for Semen Evaluation. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(3), 531–546. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.006>
- Lv, C., Larbi, A., Wu, G., Hong, Q., & Quan, G. (2019). Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. *Animal Reproduction Science*, 208(January), 106127. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106127>
- Lv, C., Wu, G., Hong, Q., & Quan, G. (2019). Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreservation and Biobanking*, 17(2), 171–182. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0113>

- Malama, E., Zeron, Y., Janett, F., Siuda, M., Roth, Z., & Bollwein, H. (2017). Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology*, 87, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.002>
- Malpaux, B., Chemineau, P., Bodin, L., & Migaud, M. (2010). *Neuroendocrine and Genetic Control of Seasonal Reproduction in Sheep and Goats Because of Changes in Gonadal Activity, Photoperiod Synchronizes an Endogenous Circannual Rhythm of Reproductive*. 45, 42–49. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01661.x>
- Maquivar, M. G., Smith, S. M., & Busboom, J. R. (2021). *Reproductive Management of Rams and Ram Lambs during the Pre-Breeding Season in US Sheep Farms*. 1–12.
- McCue, P. M. (2021). Semen Freezing. In I. John Wiley & Sons (Ed.), *Equine Reproductive Procedures* (pp. 567–571).
- McDonnell, S. M. (2016). Advances in Diagnostics and Therapeutic Techniques in Breeding Behavior Disorders in Stallions. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(3), 513–519. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.008>
- Ministério da Agricultura. (2013). *Decreto-Lei n.º 81/2013 de 14 de junho*. 3304–3329.
- Ministério da Agricultura, D. R. e P. (2004). *DIÁRIO DA REPÚBLICA — I SÉRIE-A N.º 185 — 7 de Agosto de 2004*. 185, 5122–5132.
- Morrell, J. M., & Mayer, I. (2017). Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: A review. *Zygote*, 25(5), 545–557. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000442>
- Morrell, J. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2011). Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Veterinary Medicine International*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/894767>
- Morrell, J. M., & Rocha, A. (2022). *A Novel Approach to Minimising Acute Equine Endometritis That May Help to Prevent the Development of the Chronic State*. 8(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.799619>
- Morrell, Jane M, Malaluang, P., & Ntallaris, T. (2022). *Practical Method for Freezing Buck Semen*. 0–9.
- Murphy, C., Holden, S. A., Murphy, E. M., Cromie, A. R., Lonergan, P., & Fair, S. (2016). The impact of storage temperature and sperm number on the fertility of liquid-stored bull semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(9), 1349–1359. <https://doi.org/10.1071/RD14369>
- Murphy, E. M., Murphy, C., O'Meara, C., Dunne, G., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2017). A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 1541–1554. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11646>
- Nagy, Á., Polichronopoulos, T., Gáspárdy, A., Solti, L., & Cseh, S. (2015). Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(3), 370–381. <https://doi.org/10.1556/004.2015.035>
- Neila-montero, M., Riesco, M. F., Montes-garrido, R., Paz, P. De, Alvarez, M., Anel-lopez, L., & Anel, L. (2022). *Theriogenology An optimized centrifugation protocol for ram sperm ensuring high sample yield, quality and fertility*. 191. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.006>
- Nikitkina, E., Musidray, A., Krutikova, A., Anipchenko, P., Plemyashov, K., & Shiryaev, G. (2020). Cryopreservation in Stallions. *Animals*, 10(10), 1801.
- OIE. (2019). *Terrestrial animal health code: General provisions* (Vol. 1).
- Ortega-Ferrusola, C., Gracia-Calvo, L. A., Ezquerra, J., & Pena, F. J. (2014). Use of colour and spectral doppler ultrasonography in stallion andrology. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(s4), 88–96. <https://doi.org/10.1111/rda.12363>
- Pablo, L., Flix, E., Casta, C., & Antonio, L. (2021). *Seasonal changes in testosterone and thyroxine concentrations in Mediterranean rams and bucks and their relationship with sperm cryoresistance*. 249(April). <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104513>
- Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Santolaria, P., & Yániz, J. L. (2013). Standardization of CASA sperm motility

- assessment in the ram. *Small Ruminant Research*, 112(1–3), 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.014>
- Palacios, C., Martínez-lópez, A. A., Campos-marmolejo, S. A., Plaza, J., Keller, M., Chemineau, P., Delgadillo, J. A., & Abecia, J. A. (2023). *Rams sexually activated in spring by light treatment stimulate social and sexual activities in non-activated rams*. 61, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2022.12.003>
- Papin, J., Stuhtmann, G., Martinsson, G., Sieme, H., Lundeheim, N., Ntallaris, T., & Morrell, J. M. (2021). Stored Stallion Sperm Quality Depends on Sperm Preparation Method in INRA82 or INRA96. *Journal of Equine Veterinary Science*, 98. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103367>
- Prell, M. J., McCue, P. M., Moffett, P. D., & Graham, J. K. (2020). Motility and Fertility Evaluation of Thawed Frozen Stallion Semen After 24 Hours of Cooled Storage. *Journal of Equine Veterinary Science*, 90, 102983. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102983>
- Production, F. A. O. A. (2023). Innovations in cryoconservation of animal genetic resources. In *Innovations in cryoconservation of animal genetic resources*. <https://doi.org/10.4060/cc3078en>
- Purdy, P. H. (2006). *Review article A review on goat sperm cryopreservation* 63, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>
- Quan, G. B., Wu, G. Q., Wang, Y. J., Li, D. J., Ma, Y., & Hong, Q. H. (2016). Effects of the Tris, Tes, or skim milk based extender on in vitro parameters of ram spermatozoa during liquid storage. *Small Ruminant Research*, 134, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.11.008>
- Rajashri, M., Reddy, K. R., Kumari, G. A., Kumari, N. N., & Kesharwani, S. (2017). Correlation Between Hypo-Osmotic Swelling Test (Host) and Other Seminal Characteristics of Deccani Ram Semen. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 5(2), 195–200. [https://doi.org/10.18006/2017.5\(2\).195.200](https://doi.org/10.18006/2017.5(2).195.200)
- Rečková, Z., Filipčík, R., Soušková, K., Kopec, T., Hošek, M., & Pešan, V. (2022). The efficiency of different types of extenders for semen cooling in stallions. *Animal Bioscience*, 35(5), 670–676. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0300>
- Roach, J., Schnobrich, M., Ellerbrock, R., Feijo, L., Bradecamp, E., Alvarenga, M. A., Kline, K., & Canisso, I. (2016). *Paper Comparison of cushioned centrifugation and SpermFilter filtration on longevity and morphology of cooled-stored equine semen*. <https://doi.org/10.1136/vr.103607>
- Rodrigues, N. N., Rossi, G. F., Vrisman, D. P., Taira, A. R., Souza, L. L., Zorzetto, M. F., Bastos, N. M., de Paz, C. C. P., de Lima, V. F. M. H., Monteiro, F. M., & Franco Oliveira, M. E. (2020). Ultrasonographic characteristics of the testes, epididymis and accessory sex glands and arterial spectral indices in peri- and post-pubertal Nelore and Caracu bulls. *Animal Reproduction Science*, 212(May 2019), 106235. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106235>
- Romão, R., Carolino, N., Perloiro, T., Bettencourt, E., & Bettencourt, C. (2023). O-184 Scrotal circumference as a trait for reproductive selection in white merino breed. *Animal - Science Proceedings*, 14(1), 193–194. <https://doi.org/10.1016/j.anscip.2023.01.260>
- Rosa, H. J. D., & Bryant, M. J. (2003). *Seasonality of reproduction in sheep*. 48, 155–171. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00038-5)
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Salmani, H., Nabi, M. M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M. B., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Towhidi, A., Shahneh, A. Z., & Zhandi, M. (2013). Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research*, 112(1–3), 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.015>
- Santolaria, P., Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Fantova, E., Blasco, M. E., Silvestre, M. A., & Yániz, J. L. (2015). Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Science*, 163, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.001>
- Šichtař, J., Bubeníčková, F., Sirohi, J., & Šimoník, O. (2019). How to increase post-thaw semen quality in poor

- freezing stallions: Preliminary results of the promising role of seminal plasma added after thawing. *Animals*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/ani9070414>
- Sieme, H., Bonk, A., Hamann, H., Klug, E., & Katila, T. (2004). Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*, 62(5), 915–928. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.011>
- Stellflug, J. N., & Berardinelli, J. G. (2002). Ram mating behavior after long-term selection for reproductive rate in Rambouillet ewes. *Journal of Animal Science*, 80(10), 2588–2593. <https://doi.org/10.1093/ansci/80.10.2588>
- Tibary, A., Boukhliq, R., & Allali, K. El. (2018). Ram and Buck Breeding Soundness Examination. *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét.*, 6(2), 241–255.
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Ungerfeld, R., Casuriaga, D., Giriboni, J., Freitas-de-Melo, A., Silveira, P., & Brandão, F. Z. (2018). Administration of cloprostenol and oxytocin before electroejaculation in goat bucks reduces the needed amount of electrical stimulation without affecting seminal quality. *Theriogenology*, 107, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.034>
- Ungerfeld, R., Viera, M. N., Freitas-de-melo, A., Giriboni, J., Casuriaga, D., & Silveira, P. (2021). Seasonality of the stress response in goat bucks when there is use of electroejaculation for semen collection. *Animal Reproduction Science*, 226(February), 106719. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106719>
- Varner, D. D. (2016). Approaches to Breeding Soundness Examination and Interpretation of Results. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43, S37–S44. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.075>
- Vidament, M., Dupere, A. M., Julianne, P., Evain, A., Noue, P., & Palmer, E. (1997). Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 48(6), 907–917. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00319-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00319-1)
- Watson, P. F. (2000). *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. 481–492.
- Whitesell, K., Stefanovski, D., McDonnell, S., & Turner, R. (2020). Evaluation of the effect of laboratory methods on semen analysis and breeding soundness examination (BSE) classification in stallions. *Theriogenology*, 142, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.035>
- Wiebke, M., Hensel, B., Nitsche-Melkus, E., Jung, M., & Schulze, M. (2021). Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science*, May, 106822. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106822>
- Xu, B., Wang, Z., Wang, R., Song, G., Zhang, Y., Su, R., Liu, Y., Li, J., & Zhang, J. (2022). Metabolomics analysis of buck semen cryopreserved with trehalose. *Frontiers in Genetics*, 13(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.938622>
- Yadav, D. K., Kumar, A., Gupta, S., Sharma, P., Kumar, G., Sachan, V., Yadav, B., Yadav, S., Saxena, A., & Swain, D. K. (2023). Antioxidant Additive Melatonin in Tris-based Egg Yolk Extender Improves Post-thaw Sperm Attributes in Haryana Bull. *Animal Reproduction Science*, 251(March), 107214. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107214>
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 246(December 2021), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>
- Yeste, M., Estrada, E., Rocha, L. G., Marín, H., Rodríguez-Gil, J. E., & Miró, J. (2015). Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, 3(2), 395–407. <https://doi.org/10.1111/andr.291>
- Yodmingkwan, P., Guntaprom, S., Jaksamrit, J., & Lertchunhakiat, K. (2016). Effects of Extenders on Fresh and Freezing Semen of Boer Goat. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 11, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.12.021>

## Anexos

### Anexo 1 Estrutura curricular Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora

Unidade curricular	Área Científica	Ano curricular	Semestre	Horas de trabalho totais
Anatomia I	MV	1.º	1.º Semestre	156,0
Histologia Geral	CBIO	1.º	1.º Semestre	78,0
Bioquímica I	BIOQ	1.º	1.º Semestre	156,0
Exognósia	ZOO	1.º	1.º Semestre	78,0
Agricultura e Ambiente	AGR	1.º	1.º Semestre	78,0
Fundamentos de Bioestatística	MAT	1.º	1.º Semestre	78,0
Embriologia Médica	CBIO	1.º	1.º Semestre	78,0
Estratégias de Comunicação	MV	1.º	1.º Semestre	78,0
Anatomia II	MV	1.º	2.º Semestre	156,0
Histologia Veterinária	CBIO,MV	1.º	2.º Semestre	156,0
Bioquímica II	BIOQ	1.º	2.º Semestre	156,0
Biofísica Aplicada à Medicina Veterinária	FIS	1.º	2.º Semestre	78,0
Genética Molecular Aplicada	CBIO	1.º	2.º Semestre	78,0
Atividades complementares I	MV	1.º	Anual	78,0
Optativas do grupo 1		1.º	2.º Semestre	78,0
Melhoramento Genético Animal	ZOO	2.º	1.º Semestre	156,0
Anatomia III	MV	2.º	1.º Semestre	156,0
Fisiologia Animal I	MV	2.º	1.º Semestre	156,0
Parasitologia Veterinária I	MV	2.º	1.º Semestre	156,0
Microbiologia Médica I	MV	2.º	1.º Semestre	156,0
Princípios de Nutrição Animal	ZOO	2.º	2.º Semestre	78,0
Fisiologia Animal II	MV	2.º	2.º Semestre	156,0
Microbiologia Médica II	MV	2.º	2.º Semestre	78,0
Parasitologia Veterinária II	MV	2.º	2.º Semestre	156,0
Imunologia Veterinária	MV	2.º	2.º Semestre	78,0
Bem-Estar Animal	ZOO	2.º	2.º Semestre	156,0
Atividades complementares II	MV	2.º	Anual	78,0
Alimentação e Dietética Animal	ZOO	3.º	1.º Semestre	156,0
Patologia Geral	MV	3.º	1.º Semestre	78,0
Semiologia Médica I	MV	3.º	1.º Semestre	78,0
Farmacologia	MV	3.º	1.º Semestre	78,0
Imagiologia	MV	3.º	1.º Semestre	156,0
Semiologia Cirúrgica	MV	3.º	1.º Semestre	78,0
Tecnologia dos Produtos Animais I	EAGRO	3.º	1.º Semestre	78,0
Epidemiologia	MV	3.º	1.º Semestre	78,0
Reprodução Animal	MV	3.º	2.º Semestre	78,0
Anatomia Patológica I	MV	3.º	2.º Semestre	156,0
Semiologia Médica II	MV	3.º	2.º Semestre	156,0
Anestesiologia	MV	3.º	2.º Semestre	156,0
Produção Animal	ZOO	3.º	2.º Semestre	156,0
Tecnologia dos Produtos Animais II	EAGRO	3.º	2.º Semestre	78,0
Farmacoterapêutica e Resistência a Fármacos	MV	4.º	1.º Semestre	78,0

Unidade curricular	Área Científica	Ano curricular	Semestre	Horas de trabalho totais
Anatomia Patológica II	MV	4.º	1.º Semestre	156,0
Cirurgia de Animais de Companhia I	MV	4.º	1.º Semestre	156,0
Andrologia, Ginecologia e Obstetrícia	MV	4.º	1.º Semestre	156,0
Doenças Infeciosas I	MV	4.º	1.º Semestre	156,0
Doenças Parasitárias I	MV	4.º	1.º Semestre	78,0
Toxicologia Veterinária	MV	4.º	2.º Semestre	78,0
Cirurgia de Animais de Companhia II	MV	4.º	2.º Semestre	156,0
Doenças Infeciosas II	MV	4.º	2.º Semestre	156,0
Doenças Parasitárias II	MV	4.º	2.º Semestre	156,0
Medicina Interna de Animais de Companhia	MV	4.º	2.º Semestre	78,0
Atividades Hospitalares I	MV	4.º	Anual	78,0
Optativas do grupo 2		4.º	2.º Semestre	78,0
Medicina de Animais de Companhia I	MV	5.º	1.º Semestre	156,0
Ética e Deontologia	MV	5.º	1.º Semestre	78,0
Clínica e Cirurgia de Equinos I	MV	5.º	1.º Semestre	78,0
Clínica e Cirurgia de Ruminantes	MV	5.º	1.º Semestre	156,0
Inspeção Sanitária I	MV	5.º	1.º Semestre	156,0
Higiene e Saúde Pública	MV	5.º	1.º Semestre	78,0
Economia e Gestão da Saúde Animal	ECN	5.º	1.º Semestre	78,0
Medicina de Animais de Companhia II	MV	5.º	2.º Semestre	78,0
Clínica e Cirurgia de Equinos II	MV	5.º	2.º Semestre	156,0
Clínica de Suínos, Aves e Coelhos	MV	5.º	2.º Semestre	78,0
Inspeção Sanitária II	MV	5.º	2.º Semestre	156,0
Vigilância Epidemiológica e Gestão do Risco em Medicina Preventiva	MV	5.º	2.º Semestre	156,0
Atividades Hospitalares II	MV	5.º	Anual	78,0
Optativas do grupo 3		5.º	2.º Semestre	78,0
Estágio Curricular	MV	6.º	1.º Semestre	780,0

**Anexo 2 Técnicas reprodutivas em ruminantes e equinos 2: Inseminação artificial, produção e criopreservação de embriões: distribuição dos temas**

<b>Distribuição dos temas</b>	<b>Horas teórico-práticas</b>
1. Sincronização de cios e inseminação artificial em bovinos	2
2. Sincronização de cios e inseminação artificial em pequenos ruminantes	2
3. Inseminação por laparoscopia em pequenos ruminantes	2
4. Manejo reprodutivo e inseminação artificial em equinos	2
5. Produção in vivo de embriões: conceitos gerais	2
6. Ovulação múltipla e transferência de embriões em bovinos	4
7. Ovulação múltipla e transferência de embriões em pequenos ruminantes	4
8. Recolha e transferência de embriões em equinos	3
9. Criopreservação de embriões: congelação lenta e vitrificação	4
10. Equipa de colheita e /ou produção de embriões: enquadramento legal	1

**Anexo 3: Modelo de ficha de avaliação de apresentação de artigo**

<b>Nome</b>		
<b>Número</b>	<b>Ano</b>	<b>Data</b>
<b>Tema do artigo</b>		
<b>Aspectos mais relevantes da investigação</b>		
<b>Pontos críticos</b>		
<b>Aspectos práticos para o tema em estudo</b>		
<b>Novas questões que esta investigação suscita</b>		
<b>Autoavaliação</b>		
<b>Justificação</b>		
<b>Avaliação do docente</b>		
<b>Justificação</b>		

**Assinatura do aluno** \_\_\_\_\_

**Assinatura do docente** \_\_\_\_\_

**Anexo 4: Modelo de ficha de avaliação de realização de procedimento prático**

<b>Nome</b>		
<b>Número</b>	<b>Ano:</b>	<b>Data</b>
<b>Procedimento desenvolvido</b>		
<b>Descrição sumária do procedimento</b>		
<b>Principais dificuldades</b>		
<b>Aspectos a melhorar</b>		
<b>Autoavaliação</b>		
<b>Justificação</b>		
<b>Avaliação do docente</b>		
<b>Justificação</b>		
<b>Assinatura do aluno</b> _____		
<b>Assinatura do docente</b> _____		