



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SÊMEN BOVINO
DESCONGELADO À 37°C E 4°C PARA O USO EM BIOTÉCNICAS
REPRODUTIVAS**

Bruno de Oliveira Pereira
Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

BRASÍLIA - DF
OUTUBRO/2021



BRUNO DE OLIVEIRA PEREIRA

**MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE ESPERMÁTICA APÓS O
DESCONGELAMENTO PARA O USO EM BIOTÉCNICAS
REPRODUTIVAS**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

BRASÍLIA - DF
OUTUBRO/2021

PP436a Pereira, Bruno de Oliveira
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE SÊMEN BOVINO DESCONGELADO À
37°C E 4°C PARA O USO EM BIOTÉCNICAS REPRODUTIVAS / Bruno de
Oliveira Pereira; orientador Ivo Pivato. -- Brasília, 2021.
34 p.

Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) --
Universidade de Brasília, 2021.

1. Reprodução animal. 2. Biotecnologia. 3. Sêmen. 4.
CASA. 5. Citometria de fluxo. I. Pivato, Ivo, orient. II.
Titulo.

Cessão de Direitos

Autor: Bruno de Oliveira Pereira

Título: Manutenção da viabilidade espermática após o descongelamento para o uso em biotécnicas reprodutivas

Ano: 2021

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Bruno de Oliveira Pereira

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: PEREIRA, Bruno de Oliveira

Título: Manutenção da viabilidade espermática após o descongelamento para o uso em biotécnicas reprodutivas

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em: ___/___/___

Banca examinadora

Prof. Dr. Ivo Pivato

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fábio Henrique Bezerra Ximenes

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

MV. MSc. Tiago Mendonça de Souza

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT	XI
1. PARTE I – Trabalho Científico	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	8
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
6. CONCLUSÕES	17
7. REFERÊNCIAS.....	18
8. PARTE II – Relatório de Estágio	20

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 – Gráfico de análise do citômetro de fluxo com divisões das populações de espermatozoides de acordo com seu estado físico. Membrana íntegra, apoptose e necrose, e suas consequentes ligações aos corantes Anexina V e IP. Fonte: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia.....7
- FIGURA 2 – Gráfico de análise do citômetro de fluxo com divisões das populações de espermatozoides de acordo com seu estado físico. Vivos sem acrossoma reagido, com acrossoma reagido e mortos, e suas consequentes ligações aos corantes PNA e IP. Fonte: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia.....7
- FIGURA 3 – Gráfico de análise do citômetro de fluxo com divisões das populações de espermatozoides de acordo com seu estado físico. Viáveis e estáveis, não viáveis e instáveis, suas e consequentes ligações aos corantes M540 e YoPro1. Fonte: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia.....8

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Porcentagem média (média \pm E.P) de espermatozoides móveis e com motilidade progressiva de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).19
- TABELA 2 – Padrões médios (média \pm E.P) de Velocidade média da trajetória (VAP) de espermatozoides de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).....21
- TABELA 3 – Padrões médios (média \pm E.P) de Velocidade linear progressiva (VSL) e Velocidade curvilínea (VCL) de espermatozoides de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).....30
- TABELA 4 – Padrões médios (média \pm E.P) de Amplitude lateral da cabeça (ALH) e Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) de espermatozoides de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).....33
- TABELA 5 – Padrões médios (média \pm E.P) de Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN) de espermatozoides de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).....37
- TABELA 6 – Porcentagem média (média \pm E.P) de espermatozoides morfolologicamente normais de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).....40

TABELA 7 – Porcentagem média (média \pm E.P) de espermatozoides vivos com membrana íntegra e vivos com membrana estáveis de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).....	40
TABELA 8 – Porcentagem média (média \pm E.P) de espermatozoides vivos sem o acrossoma reagido de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).....	50
TABELA 9 – Porcentagem média (média \pm E.P) de espermatozoides em estado de Apoptose e Necrose de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).....	50

LISTA DE ABREVIações

ALH – Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

ANEXINA V – AlexaFluor® 488 anexin V

BCF – Frequência de batimento flagelar

CASA – Sistema de análise computadorizada de sêmen

FITC-PNA – sonda fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) com lectina de amendoim (*peanut agglutinin* – PNA)

IA – Inseminação artificial

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

IP – Iodeto de propídeo

LIN – Linearidade

MP – Motilidade progressiva

MT – Motilidade total

M540 – Merocianina 540

PIVE – Produção in vitro de embriões

SOF – Synthetic oviduct fluid

STR – Retilinearidade

TIFOI – Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos

VAP – Velocidade de trajetória

VCL – Velocidade curvilínea

VSL – Velocidade retilínea

RESUMO

O sêmen criopreservado é um fator importante para o melhoramento genético bovino no mundo, visto que, aliado à outras biotécnicas da reprodução, como a inseminação artificial (IA), pode ser acessado de forma simples por diversos produtores. No entanto, apesar desta facilidade, o sêmen criopreservado quando utilizado de forma inadequada, como no caso de erros no descongelamento e manutenção da amostra antes de seu uso, gera perda na eficiência da técnica (IA). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade do sêmen após seu descongelamento, mantido em duas temperaturas (37°C e 4°C) e períodos (0h, 2h, 4h, 6h e 8h). Foram feitas avaliações de cinética pelo CASA e de viabilidade espermática por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que o sêmen descongelado à 37°C é superior ao descongelado à 4°C, nos dois primeiros períodos de avaliação (0h e 2h) quando analisados os dados de motilidade total e motilidade progressiva. Para os demais horários (4h, 6h e 8h), os dois tratamentos se mantiveram semelhantes estatisticamente para estas variáveis. Os dados relativos à viabilidade espermática mostram um decaimento da qualidade das amostras do grupo 37°C a partir do segundo momento de avaliação (2h), entretanto para o grupo 4°C os resultados se mantêm sem diferença estatística ao longo tempo, sendo o 4°C superior ao 37°C na maioria dos horários. Com os resultados obtidos pode-se afirmar que o grupo 37°C foi superior ao 4°C por até 2h mantido nesta temperatura para as variáveis analisadas pelo CASA. Porém quando são analisados os dados de viabilidade espermática (citometria de fluxo), o grupo 4°C se mostra mais eficiente em preservar as características do espermatozoide em relação ao 37°C.

Palavras-chave: reprodução animal; biotecnologia; IA; CASA; citometria de fluxo; sêmen.

ABSTRACT

Cryopreserved semen is an important factor for bovine genetic improvement in the world, and associated with other reproductive biotechniques, such as artificial insemination (AI), it can be accessed in a simple way by several producers. However, despite this facility, cryopreserved semen when used inappropriately, as in the case of mistakes in thawing and maintenance of the sample before its use, generates loss of technique efficiency (AI). The current work aimed to evaluate the viability of the semen after its thawing, kept at two temperatures (37°C and 4°C) and periods (0h, 2h, 4h, 6h and 8h). Kinetic evaluations by CASA and sperm viability by flow cytometry were performed. The results showed that semen thawed at 37°C is superior to semen thawed at 4°C, in the first two evaluation periods (0h and 2h) when analyzing the total motility and progressive motility data. For the other times (4h, 6h and 8h), the two treatments remained statistically similar for these variables. Data on sperm viability show a decline in the quality of samples of the 37°C group from the second time of evaluation (2h), while for the 4°C group the results remain without statistical difference over time, with 4°C being higher than 37°C at most times. With the results obtained, it can be stated that the 37°C group was superior in thawing and even for two hours kept at this temperature. For the other times, the two treatments were similar in the variables analyzed by CASA. However, when data of sperm viability were analyzed (flow cytometry), the 4°C group was more efficient in preserving the sperm characteristics compared to 37°C.

Keywords: animal reproduction; biotechnology; AI; CASA; flow cytometry; semen.

1. PARTE I – TRABALHO CIENTÍFICO

1.1 INTRODUÇÃO

O uso de sêmen criopreservado traz inúmeras vantagens para a produção animal, tornando possível o uso extensivo de várias biotécnicas reprodutivas, entre elas a inseminação artificial (IA), a produção de embriões in vivo ou in vitro (PIVE) e a injeção intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI).

A inseminação artificial (IA) é a biotécnica de maior impacto na produção animal, sendo uma importante ferramenta para aumentar a produção de rebanhos bovinos em todo o mundo. Ao longo dos anos com o desenvolvimento de protocolos de sincronização de ovulação, a utilização desta tecnologia vem crescendo. No Brasil, o número de fêmeas em idade reprodutiva inseminadas passou de 5,8% em 2002 para 13,1% em 2018 (Baruselli et al., 2019), principalmente devido ao desenvolvimento e uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No entanto, existem etapas que podem ser melhoradas em todo o processo, como por exemplo, o descongelamento de sêmen e manutenção deste antes da IA.

O método tradicional consiste na retirada da palheta do botijão criogênico e sua imersão em banho maria à 37 graus por pelo menos 30 segundos. Estudos mostram que o sêmen fresco e refrigerado quando incubado à 37°C mantêm a motilidade total e progressiva mais alta quando comparado ao sêmen congelado e mantido nas mesmas condições (Anzar et al., 2011; Ahmad et al., 2015).

Nur et al. (2005), avaliaram o descongelamento a baixas temperaturas comparando com o descongelamento tradicional e, posterior exposição a baixas temperaturas. Esses autores observaram que o descongelamento a baixas temperaturas é mais eficiente em manter a viabilidade dos espermatozoides do que o descongelamento a 37° e depois exposição a baixas temperaturas (Nur et al., 2005). Por outro lado, vários estudos mostram que o sêmen descongelado e mantido a temperatura de 37°C perde cerca de 50% de sua motilidade em torno de 2h e 3h, e cerca de 80% entre 6h e 8h (Carvalho, et al., 2018; Cunha, et al., 2019). Esses resultados sugerem que o uso do sêmen após descongelamento deve ser feito o mais breve possível, independente da biotécnica a ser utilizada. Desta forma,

poucas doses devem ser descongeladas simultaneamente, tornando o processo de uso de sêmen congelado menos eficiente.

No sistema produtivo brasileiro existe uma grande variação no tipo de propriedades, desde aquelas que utilizam modernas tecnologias até as pequenas propriedades de difícil acesso e que algumas vezes não dispõem de eletricidade.

No que se refere a IA, esses pequenos produtores têm dificuldade para a aquisição e manutenção de um botijão criogênico para o armazenamento do sêmen. Entretanto, isso pode ser contornado com o uso de um botijão comunitário em uma associação de produtores ou adquirido e mantido pelo poder público (prefeitura). Mas muitas vezes, seria complexo o transporte desse sêmen, visto que, se faz necessário levar o botijão até estas propriedades.

Portanto, um procedimento que mantenha a qualidade do sêmen após o descongelamento por um maior período seria fundamental para viabilizar o acesso desses produtores a esta tecnologia. Isso porque o sêmen descongelado poderia chegar à propriedade sem a necessidade de transportar o botijão, e apenas uma garrafa térmica ou caixa de isopor seria suficiente, facilitando o transporte e fazendo a técnica chegar a esses produtores. Esse procedimento também seria de grande importância para o melhoramento genético animal, em que amostras de sêmen poderiam ser utilizadas por produtores que não tem estrutura para manter sêmen congelado na propriedade.

A possibilidade de manter a viabilidade pós-descongelamento também permitiria aos grandes produtores, que inseminam milhares de fêmeas por IATF, uma maior agilidade no momento da IA permitindo o descongelamento de maior número de doses simultaneamente agilizando o serviço.

Com relação as técnicas de reprodução assistida, principalmente na PIVE quando várias doadoras são aspiradas, os ovócitos devem ser fecundados entre 22 e 24 horas após o início da maturação. Nesses casos, muitas vezes mais de uma dose precisa ser descongelada para cumprir esse período de 22 a 24 horas evitando o envelhecimento dos ovócitos (Diógenes et. al., 2017). Tendo uma metodologia que torne possível a manutenção da qualidade seminal pós-descongelamento, uma mesma dose poderia ser utilizada para vários momentos de fecundação.

No caso da TIFOI, em que a IA é realizada juntamente com a injeção dos ovócitos e que o mesmo técnico tem que aspirar as doadoras, fazer a injeção

e inseminar a ovuladora, a possibilidade de descongelar as doses necessárias para o trabalho simultaneamente, facilitaria e agilizaria o processo.

Apesar de alguns estudos avaliarem o uso de sêmen bovino refrigerado em IA e IATF o sêmen utilizado não foi exposto ao stress do congelamento (Crespilho et al., 2014; Satake et al., 2017). Borges-Silva, et al., 2016, comparou o uso do sêmen refrigerado e criopreservado avaliando taxa de prenhez em IATF em bovinos de corte, e concluiu que o sêmen refrigerado possui maior viabilidade, e conseqüentemente obteve maior taxa de concepção. Nenhum estudo em bovinos utiliza o resfriamento pós-congelamento para manter a viabilidade de sêmen criopreservado visando a sua utilização nas diversas técnicas de reprodução assistida. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar por quanto tempo após o descongelamento o sêmen bovino pode ser mantido a temperaturas de 4°C e de 37°C sem perder a sua viabilidade e capacidade de fecundar.

2. OBJETIVO

O objetivo deste experimento foi avaliar a viabilidade de sêmen de touros *Bos Taurus* mantidos em duas temperaturas e cinco períodos após o descongelamento, definindo assim, um protocolo de descongelamento de sêmen que permita manter os espermatozoides viáveis por um maior período após o descongelamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de sêmen

Foi utilizado sêmen comercial de 5 touros *Bos taurus* (raça holandesa, 10 doses de cada touro de uma mesma partida), congeladas em palhetas de 0,25ml e mantidas em botijão criogênico (concentração aproximada de 20×10^6 espermatozoides por palheta).

Descongelamento e manutenção das amostras

Em cada dia de avaliação as 10 palhetas de cada touro foram distribuídas nos dois grupos sendo metade (5 palhetas) descongeladas a 37°C em banho maria (por 30 segundos) e a outra metade a 4°C (por 1 minuto) em caixa térmica com água, própria para transporte e refrigeração de sêmen BotuFlex®; Botucatu – SP, Brasil, onde era feito o controle da temperatura. Após o descongelamento as demais palhetas eram mantidas nas suas respectivas temperaturas de descongelamento (37°C e 4°C) por um período de 8 horas e, foram analisadas quanto a viabilidade espermática a cada 2 horas.

Avaliações do sêmen

Após o descongelamento, as amostras dos dois grupos foram avaliadas para morfologia espermática, cinética espermática, integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal e estabilidade de membrana plasmática.

A análise da morfologia espermática foi realizada em microscopia de contraste de fase, com preparação úmida e contagem de 200 células por lâmina. Os espermatozoides foram classificados em normais ou com defeitos maiores e/ou menores (Blom, 1973; Hancock, 1959; Silva et al., 1993).

As avaliações da cinética espermática foram realizadas pelo sistema de análise computadorizada (CASA), em que 2µL de sêmen descongelado foram colocados na lâmina de leitura (Makler® counting chamber, Selfi-medical instruments, Califórnia, EUA), sendo a amostra avaliada no aparelho modelo Ivos-Ultimate 12 (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, Massachusetts – USA), previamente ajustado (SETUP bovinos). Pelo menos 5 campos foram selecionados para leitura e análise. As variáveis mensuradas foram: motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade de trajetória (µm/s; VAP), velocidade

retilínea ($\mu\text{m/s}$; VSL), velocidade curvilínea ($\mu\text{m/}$; VCL), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm ; ALH), frequência de batimento flagelar (Hz; BCF), linearidade (%; LIN) e retilinearidade (%; STR).

A análise de integridade da membrana plasmática, integridade do acrossoma, atividade mitocondrial e estabilidade de membrana foi realizada em citometria de fluxo, utilizando um citômetro de fluxo AMNIS FlowSight (Amnis Corp., Seattle, WA) utilizando software de aquisição INSPIRE V6.1. Para cada parâmetro foram adquiridos 10.000 eventos, utilizando um template previamente estabelecido para aquisição de espermatozoides bovinos. Para a integridade da membrana plasmática e apoptose foi utilizado o kit Dead Cell Apoptosis (AlexaFluor® 488 anexin V, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EUA) que contém Anexina-V conjugada com Alexa Fluor 488 e Iodeto de propídeo (IP). Os espermatozoides foram classificados em: vivos (IP e anexina-V negativos), necróticos (IP positivo e anexina-V negativo) e apoptóticos (anexina-V positivo e IP positivo ou negativo). Para a integridade do acrossoma uma conjugação da sonda fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) com lectina de amendoim (*peanut agglutinin* – PNA, Molecular Probe®, Eugene, Oregon, EUA) associado ao IP, sendo que os espermatozoides IP-negativos foram considerados vivos e os espermatozoides IP-positivos foram considerados mortos. As células vivas ou mortas foram classificadas com acrossoma reagido (FITC-PNA positivo) ou como acrossoma intacto (FITC-PNA negativo). Para a estabilidade da membrana o corante utilizado foi a Merocianina 540 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), associado ao Yo-Pro 1 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). As células negativas para M540 com YoPro1-negativo foram consideradas viáveis com membranas estáveis. Para a análise dos dados foram considerados os espermatozoides vivos com membrana íntegra (IP e anexina-V negativos)(Figura 1), apoptóticos (anexina-V positivo com IP positivo ou negativo)(Figura 1), necróticos (IP positivo e anexina-V negativo)(Figura 1), vivos com acrossoma intacto (IP e FITC-PNA negativos)(Figura 2), viáveis com membranas estáveis (M540 negativo e YoPro1 negativo)(Figura 3).

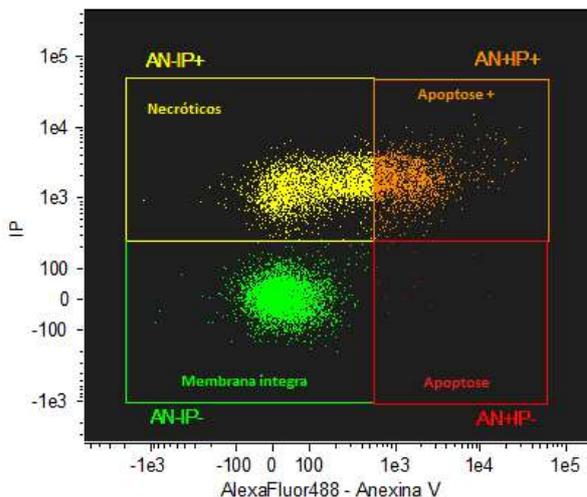


Figura 1. Gráfico de análise do citômetro de fluxo com divisões das populações de espermatozoides de acordo com seu estado físico. Membrana íntegra, apoptose e necrose, e suas conseqüentes ligações aos corantes Anexina V e IP. Fonte: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia.

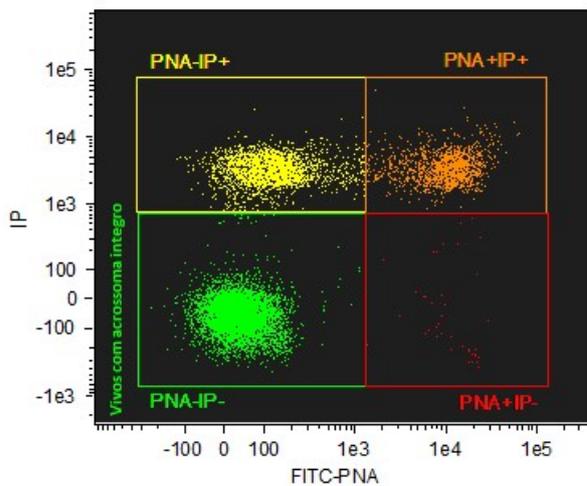


Figura 2. Gráfico de análise do citômetro de fluxo com divisões das populações de espermatozoides de acordo com seu estado físico. Vivos sem acrossoma reagido, com acrossoma reagido e mortos, e suas conseqüentes ligações aos corantes PNA e IP. Fonte: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia.

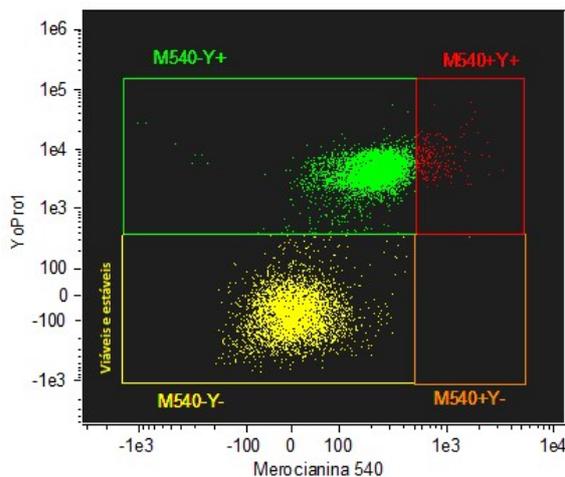


Figura 3. Gráfico de análise do citômetro de fluxo com divisões das populações de espermatozoides de acordo com seu estado físico. Viáveis e estáveis, não viáveis e instáveis, suas e consequentes ligações aos corantes M540 e YoPro1. Fonte: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia.

Análise estatística

Os dados analisados no CASA e pela citometria de fluxo foram avaliados como medida repetida no tempo. Foi realizado ANOVA usando o procedimento de GLIMMIX do SAS versão 9.3 (SAS/STAT; SAS Institute Inc., Cary, NC). Os dados foram testados para normalidade, e todos tiveram distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. O modelo estatístico incluiu o efeito da temperatura de descongelamento (**Tratamento**) e do tempo após descongelamento (**Tempo**), além de suas interações. Os resultados estão apresentados com LSMEANS \pm E.P. Diferenças estatísticas com o $P \leq 0,05$ foram consideradas significantes.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento teve como objetivo avaliar a viabilidade espermática de sêmen de touros *Bos Taurus* mantidos em duas temperaturas (4°C e 37°C) em diferentes horários pós descongelamento. Para tal foram propostos 2 grupos experimentais:

Grupo I: Controle, sêmen descongelado e mantido a 37°C nos diferentes horários de avaliação.

Grupo II: Descongelamento 4°C, sêmen descongelado e mantido a 4°C nos diferentes horários de avaliação.

As 10 doses de sêmen foram descongeladas simultaneamente e foram mantidas em banho maria nas suas respectivas temperaturas de acordo com o grupo à 37°C ou à 4°C. As 0, 2, 4, 6 e 8 horas pós- descongelamento uma palheta de cada grupo foi retirada e utilizada para a realização das diversas avaliações. As amostras examinadas na hora 0 foram mantidas por 30 segundos a 37°C e 1 minuto a 4°C, e depois analisadas. Em cada momento de avaliação os dois grupos experimentais foram submetidos as mesmas avaliações: cinética espermática computadorizada (CASA), integridade de membrana plasmática, integridade acrosomal e estabilidade de membrana plasmática com uso de sondas fluorescentes (citometria de fluxo) e morfologia espermática (microscopia de contraste de fase).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das variáveis **Motilidade Total** e **Motilidade Progressiva** estão apresentados na tabela 1. Para estes indicadores, o descongelamento à 37°C se mostrou superior nos dois primeiros momentos de avaliação (0h e 2h), já que foram superiores aos do grupo descongelado e mantido a 4°C. E do terceiro ao quinto (4h, 6h, 8h) os dois tratamentos se mostraram semelhantes para ambas as variáveis. Esses resultados diferem de outros estudos que mostram que quando o sêmen é descongelado e mantido a 37°C em 2 a 3 horas pós-descongelamento já ocorre uma queda significativa desses parâmetros (Carvalho, et al., 2018 e Cunha, et al., 2019). Essas diferenças podem ser devidas a variação individual e/ou racial dos animais avaliados, já que neste estudo foram utilizados animais *Bos taurus*, da raça holandesa, enquanto que os autores citados utilizaram sêmen de touros *Bos indicus* das raças Nelores e Gir. Outros aspectos a serem considerados são os métodos de preparo e manutenção das amostras, Carvalho, et al., 2018 utilizaram um método de lavagem das amostras com synthetic oviduct fluid (SOF) para avaliação das motilidades pelo CASA, e posteriormente, incubou as mesmas em estufa à 39°C e 5% de CO₂. No presente estudo não foi utilizado nenhum método de lavagem para tais avaliações e as amostras foram incubadas dentro de palhetas de 0,25ml em banho maria com água à 37°C, o que pode ser uma variável importante para comparação dos resultados.

Contudo, quando avaliamos todos os horários de incubação (0h, 2h, 4h, 6h, 8h), nota-se uma queda significativa destes parâmetros ao longo do tempo das amostras descongeladas à 37°C, semelhante ao encontrado por Ahmad et al. (2015), Carvalho, et al. (2018) e Cunha, et al. (2019). Já no descongelamento à 4°C os valores para tais variáveis, apesar de inferiores nos dois primeiros momentos, se mantiveram estáveis em todos os momentos avaliados, sem diferença significativa entre eles.

Tabela 1. Porcentagem média (média \pm E.P) de espermatozoides móveis e com motilidade progressiva de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).

Tempo (h)	Motilidade Total (%)		Progressiva (%)	
	37°C	4°C	37°C	4°C
0	63,19 \pm 6,13 ^{A,a}	44,00 \pm 6,13 ^{A,b}	42,34 \pm 4,54 ^{A,B,a}	29,85 \pm 4,54 ^{A,b}
2	63,67 \pm 6,14 ^{A,a}	48,52 \pm 6,11 ^{A,b}	44,01 \pm 4,53 ^{A,a}	31,31 \pm 4,53 ^{A,b}
4	46,37 \pm 6,09 ^{B,a}	46,00 \pm 6,09 ^{A,a}	34,16 \pm 4,51 ^{B,C,a}	28,00 \pm 4,51 ^{A,a}
6	35,99 \pm 6,09 ^{B,C,a}	36,60 \pm 6,09 ^{A,a}	25,99 \pm 4,51 ^{C,D,a}	22,20 \pm 4,51 ^{A,a}
8	30,19 \pm 6,09 ^{C,a}	39,60 \pm 6,09 ^{A,a}	21,79 \pm 4,51 ^{D,a}	24,80 \pm 4,51 ^{A,a}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Os resultados de **Velocidade média da trajetória (VAP)** estão descritos na tabela 2. VAP refere-se a distância percorrida pelo espermatozoide no caminho médio durante o período observado, este caminho médio é determinado pelo CASA utilizando suavização de trilha. Para cada ponto da trajetória, uma média é tirada de suas coordenadas (x,y), bem como dos pontos de rastreamento em cada lado do espermatozoide. Tal procedimento é feito em toda a trajetória do espermatozoide, em cada ponto de coordenada, fornecendo assim, uma trajetória média suavizada, o VAP é o comprimento dessa trajetória durante o período de observação (Mortimer, 2000). Neste trabalho, a VAP se manteve sem diferença significativa entre os horários de avaliação quando observada dentro do mesmo grupo, sendo o grupo 37°C superior ao 4°C na maioria dos horários observados (0h, 4h, 6h, 8h), possivelmente devido a sua maior atividade metabólica à essa temperatura.

Tabela 2. Padrões médios (média \pm E.P) de Velocidade média da trajetória (VAP) de espermatozoides de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).

Tempo (h)	VAP (μ m/s)	
	37°C	4°C
0	84,05 \pm 3,32 ^{A,a}	75,44 \pm 3,32 ^{A,b}
2	76,61 \pm 3,37 ^{A,a}	72,92 \pm 3,27 ^{A,a}
4	78,57 \pm 3,27 ^{A,a}	69,66 \pm 3,27 ^{A,b}
6	76,84 \pm 3,27 ^{A,a}	68,64 \pm 3,27 ^{A,b}
8	75,90 \pm 3,27 ^{A,a}	68,36 \pm 3,27 ^{A,b}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Na tabela 3 encontram-se os resultados de **Velocidade linear progressiva (VSL)** e **Velocidade curvilínea (VCL)**. A VSL é determinada pela distância entre o primeiro e o último ponto da trajetória, e reflete a ideia de deslocamento real do espermatozoide durante a avaliação e a VCL é a distância total que o espermatozoide percorre ao longo da avaliação, considerando todos os pontos de coleta, portanto, é sempre o maior entre as 3 velocidades calculadas (Mortimer, 2000).

Na coleta de dados, a VSL, dentro do mesmo grupo de tratamento (37°C e 4°C), não apresentou diferença significativa entre os horários de avaliação. Quando observamos os dois tratamentos, nota-se uma piora significativa neste parâmetro, no grupo 4°C, a partir do terceiro horário. Já para VCL no primeiro momento, o tratamento 37°C se mostrou superior aos demais horários dentro do seu grupo, e superior ao mesmo horário do grupo 4°C. Para o restante dos tempos os valores se mantiveram sem diferenças significativas para ambos os tratamentos e horários avaliados. Os resultados de VSL combinados com os dados de VCL, indicam uma trajetória menos linear dos espermatozoides do grupo 4°C a partir de 4h, visto que os valores totais de trajetória (VCL) são semelhantes entre ambos os tratamentos.

Tabela 3. Padrões médios (média \pm E.P) de Velocidade linear progressiva (VSL) e Velocidade curvilínea (VCL) de espermatozoides de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).

Tempo (h)	VSL ($\mu\text{m/s}$)		VCL ($\mu\text{m/s}$)	
	37°C	4°C	37°C	4°C
0	67,43 \pm 2,76 ^{A,a}	61,1 \pm 2,76 ^{A,a}	147,68 \pm 6,51 ^{A,a}	132,74 \pm 6,51 ^{A,b}
2	64,36 \pm 2,75 ^{A,a}	58,77 \pm 2,76 ^{A,a}	123,26 \pm 6,53 ^{B,a}	127,23 \pm 6,51 ^{A,a}
4	66,89 \pm 2,75 ^{A,a}	56,04 \pm 2,74 ^{A,b}	126,51 \pm 6,51 ^{B,a}	120,86 \pm 6,51 ^{A,a}
6	64,73 \pm 2,74 ^{A,a}	55,22 \pm 2,74 ^{A,b}	122,98 \pm 6,51 ^{B,a}	122,58 \pm 6,51 ^{A,a}
8	64,71 \pm 2,74 ^{A,a}	54,96 \pm 2,74 ^{A,b}	120,82 \pm 6,51 ^{B,a}	122,2 \pm 6,51 ^{A,a}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Os resultados de amplitude lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) estão expressos na tabela 4. ALH é calculada com a largura do movimento lateral da cabeça, e é expresso em μm , no CASA Hamilton Thorne, o resultado expresso é a ALHmax, que é o valor máximo para o seguimento da trajetória analisada. O BCF é expresso em hertz e é calculado pelo

número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a trajetória do movimento, tal movimento está ligado ao desenvolvimento de outra onda flagelar (Mortimer, 2000).

Semelhante aos parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva, nota-se uma diminuição significativa dos parâmetros de ALH dentro do grupo 37°C entre os momentos de avaliação, enquanto o grupo 4°C se manteve numa constante ao longo do tempo. Para este parâmetro, entre os grupos avaliados, o tratamento à 4°C se mostrou superior na maioria dos momentos avaliados. Já para os dados de BCF o grupo 37°C se mostrou superior ao grupo 4°C em quase todos os momentos de avaliação, sendo que dentro de ambos os grupos, estes se mantiveram sem diferença significativa entre os horários das análises.

Tabela 4. Padrões médios (média \pm E.P) de Amplitude lateral da cabeça (ALH) e Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) de espermatozoides de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).

Tempo (h)	ALH (μ m)		BCF (Hz)	
	37°C	4°C	37°C	4°C
0	7,16 \pm 0,28 ^{A,a}	6,69 \pm 0,28 ^{A,a}	23,98 \pm 0,97 ^{B,a}	24,21 \pm 0,97 ^{A,a}
2	5,65 \pm 0,28 ^{B,b}	6,42 \pm 0,28 ^{A,a}	31,22 \pm 0,95 ^{A,a}	22,99 \pm 1,00 ^{A,b}
4	5,54 \pm 0,28 ^{B,a}	6,20 \pm 0,28 ^{A,a}	30,38 \pm 1,00 ^{A,a}	22,45 \pm 1,00 ^{A,b}
6	5,46 \pm 0,28 ^{B,C,b}	6,46 \pm 0,28 ^{A,a}	29,67 \pm 0,98 ^{A,a}	21,50 \pm 0,97 ^{A,b}
8	4,90 \pm 0,28 ^{C,b}	6,50 \pm 0,28 ^{A,a}	29,91 \pm 0,97 ^{A,a}	21,01 \pm 0,96 ^{B,b}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Os resultados de Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN) estão expostos na tabela 5. Os valores de STR e LIN são relações das velocidades expressas anteriormente, sendo $STR = (VSL/VAP) \times 100$ e $LIN = (VSL/VCL) \times 100$ (Mortimer, 2000).

Para ambas as variáveis, dentro do mesmo grupo de tratamento (37°C e 4°C), não houve diferença significativa entre os horários de avaliação. No entanto, para LIN, o grupo 37°C se mostrou superior na maioria dos momentos avaliados.

Tabela 5. Padrões médios (média \pm E.P) de Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN) de espermatozoides de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).

Tempo (h)	STR (%)		LIN (%)	
	37°C	4°C	37°C	4°C
0	78,67 \pm 1,69 ^{B,a}	80,72 \pm 1,69 ^{A,a}	46,65 \pm 1,89 ^{B,a}	47,94 \pm 1,89 ^{A,a}
2	83,33 \pm 1,63 ^{A,a}	80,21 \pm 1,76 ^{A,a}	54,25 \pm 1,87 ^{A,a}	47,56 \pm 1,90 ^{A,b}
4	84,62 \pm 1,85 ^{A,a}	80,34 \pm 1,89 ^{A,a}	55,81 \pm 1,88 ^{A,a}	48,19 \pm 1,85 ^{A,b}
6	83,88 \pm 1,91 ^{A,a}	80,29 \pm 1,90 ^{A,a}	56,20 \pm 1,84 ^{A,a}	46,99 \pm 1,83 ^{A,b}
8	85,51 \pm 1,89 ^{A,a}	79,86 \pm 1,87 ^{A,a}	57,80 \pm 1,83 ^{A,a}	46,79 \pm 1,83 ^{A,b}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Na tabela 6 estão descritos os resultados de **Morfologia Espermática**. Os resultados foram semelhantes entre os dois tratamentos em todos os momentos avaliados. Sendo que os resultados também se mantiveram constantes entre os horários de avaliações dentro do mesmo grupo, portanto, o descongelamento a 4°C não é capaz de produzir danos a morfologia dos espermatozoides, se mantendo inalterado entre os tratamentos e dentro dos padrões aceitáveis para morfologia espermática (Lone et. al, 2017).

Tabela 6. Porcentagem média (média \pm E.P) de espermatozoides morfologicamente normais de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).

Tempo (h)	Morfologia Normal (%)	
	37°C	4°C
0	85,23 \pm 2,32	83,16 \pm 2,32
2	87,78 \pm 2,32	85,86 \pm 2,30
4	89,31 \pm 2,26	85,89 \pm 2,24
6	86,70 \pm 2,24	85,37 \pm 3,25
8	84,30 \pm 2,24	83,69 \pm 2,24

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

A partir das análises realizadas no CASA, foi observado que para os parâmetros motilidade total e motilidade progressiva, que são de extrema importância para avaliação da qualidade seminal, o grupo descongelado à 37°C foi superior nos dois primeiros horários de avaliação. Para tais indicadores o grupo

descongelado à 4°C se manteve com valores inferiores ao grupo 37°C, tal apresentação pode estar relacionada a uma manutenção em taxa de metabolismo basal a essa temperatura, o que poderia ser justificado pelos valores inferiores de VAP e BCF ao 37°C e constantes ao longo do tempo.

Os dados relativos a citometria de fluxo estão expressos nas tabelas a seguir. Nas tabelas 7 e 8 estão expressos os dados de **Integridade e Estabilidade de membrana plasmática**, e **Integridade acrossomal**, respectivamente. Para os dados relativos à integridade e estabilidade de membrana, e integridade acrossomal nota-se uma piora significativa dos parâmetros a partir do segundo momento de avaliação (2h) dentro do grupo 37°C, já para o grupo 4°C, tais parâmetros se mantiveram sem diferença significativa ao longo das avaliações. Os resultados aqui encontrados de integridade acrossomal e/ou integridade de membrana do tratamento controle (37°C) são semelhantes aos descritos por Carvalho, et al., (2018) e Cunha, et al., (2019) em condições já descritas no texto, e igualmente, semelhante a Ahmad et. al. (2015), que utilizou touros Angus nas mesmas condições e horários de manipulação.

Quando comparados os dois grupos, para integridade e estabilidade de membrana, as amostras descongeladas à 4°C se mostraram superiores às descongeladas à 37°C na maioria dos horários avaliados (2h, 6h, 8h), sendo que nos demais horários os dois tratamentos foram semelhantes estatisticamente. Para integridade acrossomal os dois tratamentos se mostraram semelhantes nos 4 primeiros momentos de avaliação (0h, 2h, 4h, 6h), sendo o grupo 4°C superior ao 37°C apenas no último horário (8h) analisado. Os resultados encontrados no presente estudo para estas três avaliações são superiores aos descritos por Silva, et. al. (2021), que avaliou o descongelamento imediato à 37°C, para a mesma raça e condições de manipulação.

Tabela 7. Porcentagem média (média \pm E.P) de espermatozoides vivos com membrana íntegra e vivos com membrana estáveis de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).

Tempo (h)	Integridade de membrana (%)		Estabilidade de membrana (%)	
	4°C	37°C	4°C	37°C
0	55,34 \pm 7,78 ^{A,B,a}	59,64 \pm 7,78 ^{A,a}	58,60 \pm 8,43 ^{A,a}	48,92 \pm 8,43 ^{A,a}
2	57,14 \pm 7,78 ^{A,B,a}	37,56 \pm 7,78 ^{B,b}	56,10 \pm 8,43 ^{A,a}	31,32 \pm 8,43 ^{B,b}
4	43,42 \pm 7,78 ^{B,a}	37,06 \pm 7,78 ^{B,a}	37,67 \pm 8,43 ^{B,a}	23,38 \pm 8,43 ^{B,a}
6	43,85 \pm 7,78 ^{B,a}	29,00 \pm 7,78 ^{B,b}	36,01 \pm 8,43 ^{B,a}	17,97 \pm 8,43 ^{B,b}
8	66,14 \pm 7,78 ^{A,a}	29,06 \pm 7,78 ^{B,b}	46,68 \pm 8,43 ^{A,B,a}	15,46 \pm 8,43 ^{B,b}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Tabela 8. Porcentagem média (média \pm E.P) de espermatozoides vivos sem acrossoma reagido de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).

Tempo (h)	Integridade acrossomal (%)	
	4°C	37°C
0	48,92 \pm 8,55 ^{A,B,a}	51,72 \pm 8,55 ^{A,a}
2	49,42 \pm 8,55 ^{A,a}	39,24 \pm 8,55 ^{B,a}
4	33,21 \pm 8,55 ^{B,a}	34,44 \pm 8,55 ^{B,C,a}
6	38,80 \pm 8,55 ^{A,B,a}	25,33 \pm 8,55 ^{B,C,a}
8	46,44 \pm 8,55 ^{A,B,a}	19,80 \pm 8,55 ^{C,b}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Na tabela 9 estão expressos os dados de espermatozoides em **Apoptose e Necrose**. Para os dados de apoptose não foram observadas diferenças significativas nos momentos de avaliação dentro dos respectivos grupos ou entre os dois grupos avaliados. Já para os dados de necrose observa-se uma diferença significativa entre os dois tratamentos nos momentos 4h, 6h, 8h, sendo que o grupo 37°C apresenta maiores valores de espermatozoides em necrose. Para tal variável, os dois grupos se mantiveram sem diferenças significativas quando analisado dentro do mesmo tratamento, entre os momentos de avaliação, contudo, nota-se uma tendência ($P < 0,10$ e $> 0,05$) de aumento dos espermatozoides em necrose entre os dois primeiros (0h, 2h) e o último (8h) tempo de avaliação no grupo descongelado à 37°C.

Tabela 9. Porcentagem média (média \pm E.P) de espermatozoides em estado de Apoptose e Necrose de amostras de sêmen de touros holandeses (n=5 por grupo) descongeladas, mantidas em banho maria (37°C e 4°C) e avaliadas ao longo do tempo (0h, 2h, 4h, 6h e 8h).

Tempo (h)	Apoptose (%)		Necrose (%)	
	4°C	37°C	4°C	37°C
0	25,46 \pm 8,99 ^{A,B,a}	15,13 \pm 8,99 ^{B,a}	19,08 \pm 6,08 ^{A,a}	25,14 \pm 6,08 ^{A,a}
2	23,36 \pm 8,99 ^{A,B,a}	35,18 \pm 8,99 ^{A,a}	19,35 \pm 6,08 ^{A,a}	27,17 \pm 6,08 ^{A,a}
4	34,76 \pm 8,99 ^{A,B,a}	27,62 \pm 8,99 ^{A,B,a}	21,82 \pm 6,08 ^{A,b}	35,30 \pm 6,08 ^{A,a}
6	39,91 \pm 8,99 ^{A,a}	36,16 \pm 8,99 ^{A,a}	16,13 \pm 6,08 ^{A,b}	34,76 \pm 6,08 ^{A,a}
8	21,82 \pm 8,99 ^{B,a}	30,01 \pm 8,99 ^{A,B,a}	12,00 \pm 6,08 ^{A,b}	40,74 \pm 6,08 ^{A,a}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Com os dados de viabilidade espermática avaliados pela citometria de fluxo, foi observado que para os parâmetros de integridade acrossomal, e integridade e estabilidade de membrana, o grupo descongelado à 4°C se mostrou estável estatisticamente ao longo dos momentos avaliados, sendo que para o grupo 37°C ocorre uma diminuição da viabilidade para estes parâmetros a partir do segundo horário de avaliação. Assim, podemos afirmar que o descongelamento à 4°C não é capaz de causar danos à membrana e ao acrossoma dos espermatozoides, sendo este superior na maioria dos horários avaliados em relação ao descongelado à 37°C.

Os dados de necrose e apoptose são extraídos da mesma avaliação feita para integridade de membrana plasmática, sendo estes, um reflexo dos dados de integridade de membrana, os espermatozoides com membrana não íntegra são classificados em estado de apoptose ou necrose. Com tais dados avaliados separadamente, não é evidenciada uma piora dos parâmetros dentro do mesmo grupo para as variáveis. Contudo, é observado um maior número de espermatozoides em estado de necrose no grupo 37°C em relação ao 4°C nos três últimos horários de análise.

Considerando que entre a coleta e a utilização de sêmen congelado existem processos que podem afetar a sua viabilidade, ocorrendo uma diminuição ao longo do tempo quando incubado, e ainda, sendo o sêmen criopreservado menos viável que o fresco ou refrigerado (Ahmad et al., 2015; Morris et al., 2012), no presente trabalho, o sêmen descongelado a 4°C não apresentou melhores parâmetros de movimento em relação ao 37°C, porém, quando avaliados os parâmetros de

viabilidade espermática o grupo 4°C foi mais eficiente em preservar tais características.

Para regiões em que o inverno é muito rigoroso, poderia ser uma opção o descongelamento a 4°C, acarretando menos oscilação de temperatura e preservando a qualidade. O emprego desta técnica de descongelamento ainda precisa ser avaliado com um maior número de touros e raças, e testado em programas de IA e PIVE, podendo assim, ser proposta uma nova alternativa ao transporte e manutenção de sêmen por longos períodos.

6. CONCLUSÕES

Com os dados obtidos na pesquisa é possível concluir que o grupo descongelado à 37°C é superior ao 4°C na avaliação imediata e 2h após o descongelamento, quando analisados os parâmetros de cinética de movimento pelo CASA.

Para os dados relativos à viabilidade espermática o grupo descongelado à 4°C se mostrou mais eficiente em preservar tais variáveis. É observado uma piora significativa dos parâmetros a partir do segundo momento de avaliação no grupo 37°C, entretanto, no grupo 4°C tais características se mantem sem diferenças estatísticas ao longo do tempo.

A partir destes dados, o descongelamento à 4°C pode ser uma alternativa viável para o uso de sêmen criopreservado em situações em que há a necessidade de manutenção destas amostras por mais de 2h para sua utilização. Tendo aplicações tanto à campo, em inseminações artificiais, como em um laboratório de produção in vitro de embriões.

7. REFERÊNCIAS

AHMAD, Mushtaq; AHMAD, Nasim; RIAZ, Amjad; ANZAR, Muhammad. Sperm survival kinetics in different types of bull semen: progressive motility, plasma membrane integrity, acrosomal status and reactive oxygen species generation. **Reproduction, Fertility And Development**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 784, 2015. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd13400>.

ANZAR, M.; KROETSCH, T.; BOSWALL, L.. Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 126, n. 1-2, p. 23-31, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.04.018>.

Baruselli, Pietro Sampaio, Catussi, B. L. C., Abreu, L. Â., Elliff, F. M., Silva, L. G., Batista, E. S., & Crepaldi, G. A. (2019). Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 43(2), 308–314.

Blom, E. "Ultrastrukturen af nogle karakteristiske sperimedefekter og forslag til et nyt klassificerings-system for tyrens spermiogram" [The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram (author's transl)]. **Nordisk veterinærmedicin** vol. 25,7,1973: 383-91.

BORGES-SILVA, Juliana C.; SILVA, Márcio R.; MARINHO, Daniel B.; NOGUEIRA, Eriklis; SAMPAIO, Deiler C.; OLIVEIRA, Luiz Orcírio F.; ABREU, Urbano G. P.; MOURÃO, Gerson B.; SARTORI, Roberto. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Reproduction, Fertility And Development**, [S.L.], v. 28, n. 7, p. 1004, 2016. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd14185>.

CRESPILHO, A.M.; NICHI, M.; GUASTI, P.N.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; SÁ FILHO, M.F.; MAZIERO, R.R.; DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O.. Sperm fertility and viability following 48h of refrigeration: evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 146, n. 3-4, p. 126-133, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.020>.

CUNHA, Andrielle T. M.; CARVALHO, José O.; GUIMARÃES, Ana L. S.; LEME, Ligiane O.; CAIXETA, Felipe M.; VIANA, João H. M.; DODE, Margot A. N.. Bovine epididymal spermatozoa treatment for in vitro fertilization: heparin accelerates fertilization and enables a reduction in coincubation time. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 0209692-0209692, 7 jan. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0209692>.

CARVALHO, José de Oliveira; SARTORI, Roberto; RODELLO, Leandro; MOURÃO, Gerson Barreto; BICUDO, Sony Dimas; DODE, Margot A. N.. Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity

to bind to oviductal cells. **Livestock Science**, [S.L.], v. 207, p. 30-37, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2017.11.005>.

DIÓGENES, Mateus Nunes; GUIMARÃES, Ana Luiza Silva; LEME, Ligiane Oliveira; DODE, Margot Alves Nunes. Bovine in vitro embryo production: the effects of fibroblast growth factor 10 (fgf10). **Journal Of Assisted Reproduction And Genetics**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 383-390, 20 dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-016-0852-8>.

Hancock, J. L. "The morphologic characteristics of spermatozoa and fertility." **International Journal of Fertility** 4, 1959: 347-359.

LONE, S.A.; PARAY, A.R.; MIR, S.H.; GANAIE, B.A.; SINHA, R.; SINGH, P. Breeding soundness evaluation in bulls: A review. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research** 1(5): 1-4. 2017.

MORRIS, G. John; ACTON, Elizabeth; MURRAY, Benjamin J.; FONSECA, Fernanda. Freezing injury: the special case of the sperm cell. **Cryobiology**, [S.L.], v. 64, n. 2, p. 71-80, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.12.002>.

Mortimer, Sharon T. "CASA—practical aspects." **Journal of andrology** 21.4, 2000: 515-524.

Nur, Zekariya & Sagirkaya, Hakan & Dogan, Ibrahim & Soylu, M.K. & Ak, Kemal & Ileri, I.K.. (2005). Effect of low temperature thawing procedure and post-thaw cold shock on frozen bull semen. **Medycyna Weterynaryjna**. 61. 991-993.

SATAKE, N; EDWARDS, Saa; TUTT, D; MCGOWAN, Mr; BOE-HANSEN, Gb. Investigation of in vitro measurable sperm attributes and their influence on electroejaculated bull semen with a fixed-time artificial insemination protocol in Australian Bos indicus cattle. **Reproduction In Domestic Animals**, [S.L.], v. 53, n. 2, p. 414-422, 11 dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.13121>.

Silva NC, Leão KM, Pádua JT, et al. Effect of different cryopreservation extenders added with antioxidants on semen quality and in vitro embryo production efficiency in cattle. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 2021 ;93(3):e20191229. DOI: 10.1590/0001-3765202120191229. PMID: 34076181

Silva, Antonio Emídio Dias Feliciano, Margot Alves Nunes Dode, and Maria Marina Unanian. "Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e fatores que a influenciam." **Embrapa Gado de Corte-Documentos (INFOTECA-E)**, 1993.

8. PARTE II – RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio supervisionado foi realizado em dois locais diferentes, a primeira parte foi realizado em um laboratório de reprodução animal, localizado em Águas Claras – DF, Bio Biotecnologia em Reprodução Animal LTDA, e teve duração de 6 semanas, no período de 19/07/2021 à 27/08/2021. A segunda parte foi realizada em uma fazenda de bovinos de corte, Tulipa Agropecuária, localizada em Campinorte – GO, e teve duração de 6 semanas, compreendendo o período de 30/08/2021 à 10/10/2021.

Durante o primeiro estágio as atividades desenvolvidas, se basearam no acompanhamento da rotina dos médicos veterinários da empresa no atendimento à campo em propriedades do DF e GO, bem como acompanhamento das atividades realizadas dentro do laboratório. A empresa foi pioneira na produção in vitro de embriões bovinos no Brasil e atualmente os veterinários oferecem serviços especializados em reprodução de bovinos e cães. Dentre os serviços prestados pela empresa para bovinos estão: exame andrológico completo de touros, coleta e congelamento de sêmen, utilização de sêmen refrigerado em IA, inseminação artificial em tempo fixo, avaliação de qualidade de sêmen congelado por sistema CASA e morfologia, avaliação reprodutiva de fêmeas, coleta de ovócitos de doadoras por aspiração folicular, seleção e classificação de ovócitos, produção in vitro de embriões, transferência de embriões frescos e congelados em tempo fixo, diagnóstico e acompanhamento de gestação. Para área de caninos, no laboratório, foram realizadas as seguintes atividades: coleta e envio de sêmen refrigerado, inseminação artificial de cadelas, avaliação seminal por sistema CASA e morfologia, avaliação reprodutiva completa de machos, bem como tratamentos de enfermidades quando necessário.

O segundo estágio foi realizado na Agropecuária Tulipa, que é hoje uma fazenda referência em criação de gado nelore precoce à pasto, com mais de 60 touros Nelores disponíveis para compra de doses de sêmen em centrais de reprodução.

As funções desenvolvidas durante o estágio tiveram como objetivo o auxílio das atividades de rotina da fazenda. Sendo assim, organizar os materiais que seriam utilizados a depender do manejo realizado (kits cirúrgicos, balança,

medicações, pistolas de vacinação, seringas, agulhas, etc), montagem e organização da área de trabalho no curral, aplicação de vacinas e medicações, pesagem e apartação de animais, coleta das informações dos manejos no curral, manejo e traslado de vacas e touros montado à cavalo, manejo de vacas e touros dentro dos currais, marca à fogo de animais para identificação interna da fazenda, colocação de brinco de identificação e mosquicida, manejo de bezerros recém nascidos à pasto (tatuagem para identificação, pesagem, cura de umbigo e vermifugação), aleitamento artificial e manutenção do bezerreiro dos bezerros guachos, manutenção de cercas das áreas da fazenda, manutenção e limpeza de bebedouros e cochos, acompanhamento de coleta e seleção de ovócitos de bezerras e vacas, auxílio em manejo reprodutivo com avaliação por ultrassonografia, protocolo hormonal para sincronização de ovulação e inseminação artificial, auxílio em partos distócicos, indução e acompanhamento de parto de receptoras, auxílio em cirurgias a campo (cesárea, correção de prolapso uterino e descorna), bem como seu acompanhamento pós operatório e tratamento de animais doentes.

Tais praticas desenvolvidas durante os estágios são de extrema importância, com elas colocamos em prática conhecimentos adquiridos durante a graduação e podemos ter um contato maior com a rotina à campo de um médico veterinário.