



Anais da

Reunião Anual da
IV ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal

7 e 8 de junho de 2019



ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MATO GROSSO DO SUL**

REITOR

Marcelo Augusto Santos Turine

VICE-REITORA

Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Divisão de Editora da UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)
(4:2019: Goiânia, GO).

Anais da IV Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal, 07 e 08 de junho de 2019 / organizadores Alexandre Rossetto Garcia, José Roberto Potiens, Maurício Antônio Silva Peixer. – Campo Grande, MS: UFMS, 2019. 269 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

e-ISBN 978-85-7613-589-0

Disponível em: <<http://www.reuniaobraa.com.br/>>

1. Andrologia. 2. Inseminação Artificial. I. Garcia, Alexandre Rossetto. II. Potiens, José Roberto. III. Peixer, Antônio Silva IV. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. V. Título.

CDD (22) 616.69

Elaborada pela Bibliotecária Lilian Aguilar Teixeira CRB 1/2448



Divisão da Editora UFMS - DIEDU/SECOM/RTR

Portão 14 - Estádio Morenão

Campus da UFMS

Fone: (67) 3345-7203 - Campo Grande - MS

e-mail: diedu.secom@ufms.br

Editora associada à



Associação Brasileira das
Editoras Universitárias

ORGANIZADORES
Alexandre Rossetto Garcia
José Roberto Potiens
Maurício Antonio Silva Peixer

Anais da

Reunião Anual da
IV ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal

7 e 8 de junho de 2019

Goiânia-GO
2019



ORGANIZADORES

Alexandre Rossetto Garcia
Médico-Veterinário
Pesquisador A da Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP

José Roberto Potiens
Médico-Veterinário
Diretor de Produção da Seleon Biotecnologia
Itatinga, SP

Maurício Antonio Silva Peixer
Médico-Veterinário
Diretor da Bio Biotecnologia Animal
Brasília, DF

REVISÃO LINGÜÍSTICA E ORTOGRÁFICA
De responsabilidade dos autores

PROJETO GRÁFICO E EDITORAÇÃO ELETRÔNICA
Divisão da Editora UFMS

COMISSÃO ORGANIZADORA
ABRAA - Associação Brasileira de Andrologia Animal



FICHA TÉCNICA

Reunião Anual da
IV ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal

Goiânia, 7 e 8 de Junho de 2019

Comissão Organizadora

PRESIDENTE

Eliane Vianna da Costa e Silva

VICE-PRESIDENTE

Neimar Correa Severo

PRIMEIRA SECRETÁRIA

Teresinha Inês de Assumpção

SEGUNDA SECRETÁRIA

Leticia Zoccolaro Oliveira

PRIMEIRA TESOUREIRA

Maria Isabel Mello Martins

SEGUNDO TESOUREIRO

Marcelo George Mungai Chacur

DIRETOR TÉCNICO CIENTÍFICO

Alexandre Rossetto Garcia

DIRETOR TÉCNICO CIENTÍFICO

José Roberto Potiens

DIRETOR TÉCNICO CIENTÍFICO

Maurício Antonio Silva Peixer

DIRETORA DE COMUNICAÇÃO E MARKETING

Renata Lançoni

DIRETOR COMERCIAL

Athos de Assumpção Pastore

PRIMEIRO CONSELHEIRO FISCAL

Rubens Paes de Arruda

SEGUNDO CONSELHEIRO FISCAL

Luis Alfredo Garcia Deragon

TERCEIRO CONSELHEIRO FISCAL

Rodrigo Freitas Bittencourt

CONSELHEIRO FISCAL SUPLENTE

Fernando Galvani

REVISORES Ad Hoc

Alexandre Rossetto Garcia
Embrapa Pecuária Sudeste - SP

André Luís Rios Rodrigues
Universidade Federal Fluminense - RJ

Athos de Assumpção Pastore
Androvet - SP

Carlos Frederico Martins
Embrapa Cerrados - DF

Cezinande de Meira
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - SP

Eliane Vianna da Costa e Silva
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - MS

Eneiva Carla Carvalho Celeghini
Universidade de São Paulo - SP

Flavio Antonio Barca Junior
Universidade Norte do Paraná - PR

Frederico Ozanan Papa
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - SP

Ivo Pivato
Universidade de Brasília - DF

João Henrique Moreira Viana
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF

José Antônio Dell' Aqua Jr
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - SP

José Roberto Potiens
Seleon Biotecnologia - SP

Leticia Zoccolaro Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais - MG

Lílian Kátia Ximenes Silva
Universidade da Amazônia - PA

Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis
Universidade Federal de Mato Grosso - MT

Marcelo George Mungai Chacur
Universidade do Oeste Paulista - SP

Margot Alves Nunes Dode
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF

Maria Isabel Mello Martins
Universidade Estadual de Londrina - PR

Maurício Antonio Silva Peixer
Bio Biotecnologia Animal - SP

Neimar Correa Severo
Alta Genetics Brasil - MG

Priscila Reis Kahwage
Exército do Brasil - PA

Renata Lançoni
Médica Veterinária Autônoma - SP

Rodrigo Freitas Bittencourt
Universidade Federal da Bahia - BA

Rubens Paes de Arruda
Universidade de São Paulo - SP

Teresinha Inês Assumpção
Universidade Federal de Uberlândia - MG

e-ISBN: 978-85-7613-589-0

1ª edição

Formato digital (2019)



A Associação Brasileira de Andrologia Animal-ABRAA nasceu em 2016, fruto de um desejo dos sócios fundadores, atuantes na ciência, no campo e em empresas ligadas à área de Andrologia Animal, com o intuito de reunir profissionais que debatessem de forma livre e ética o conhecimento na área.

E assim temos feito. Nossas reuniões têm oferecido bastante tempo para debate de assuntos ligados à reprodução, no que tange a biotecnologia, manejo, conservação de material genético, clínica, fertilidade e infertilidade de machos reprodutores. A plateia tem tempo para expor pensamentos, debater, contrapor e colaborar com os temas abordados pelos palestrantes. É um encontro dinâmico, rico em trocas de experiências.

Este ano, teremos pela primeira vez participação de colegas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA, importante instituição ligada à área e responsável, dentre outros processos, pela normatização e fiscalização da produção e comercialização de material genético animal em território nacional.

Outra novidade de 2019 é a disponibilização de mais tecnologia aos autores de trabalhos científicos, que apresentarão seus resumos em formato digital (e-poster). Assim, a ABRAA inova, aliando modernidade e dinamicidade, numa visão integrada que também associa Ciência à consciência ecológica.

Por fim, com prazer disponibilizamos os Anais da IV Reunião Anual da ABRAA, uma obra que traz a síntese dos assuntos abordados nas palestras. Contempla, também, a produção científica mais atual de pesquisadores de universidades e centros de pesquisa, além de relatos de casos de colegas que atuam diretamente no campo. Essas contribuições são oriundas de 12 estados do Brasil, além de Argentina e França.

Por isso, sentimos cada dia mais que a ABRAA cresce e tem cumprido seu papel original, de ser um espaço plural, que prima por debates científicos altamente especializados, trocas de experiências e crescimento profissional.

Esperamos que nossos congressistas tenham todos uma excelente estadia em Goiânia, com reencontro de amigos e sucesso profissional.

E Boa Leitura!

Eliane Vianna da Costa e Silva
Presidente da ABRAA

Alexandre Rossetto Garcia
Diretor Técnico Científico





Palestras	11
Número e perspectivas do mercado de sêmen no Brasil	12
Sergio de Brito Prieto Saud	
Touros CEIP – conceito, critérios de avaliação e uso da genética	15
Gabriel Armond Crepaldi e Marcos Gouveia Pertegato	
Técnicas de reprodução e impactos no bem-estar animal	25
Lizíe Pereira Buss, Gabriela Lopes Santiago e Felipe José de Carvalho Corrêa	
Qualidade do sêmen e resultados em programas de IATF em bovinos	28
Ériklis Nogueira, Camile Sanches Silva, Juliana Correa Borges Silva, Wagner Rodrigues Garcia, Nathália Albaneze Anache, Karine Casanova Silva, José Roberto Potiens e Eliane Viana da Costa e Silva	
Sêmen suíno no Brasil: biotecnologias e mercado	38
Carlos Henrique Cabral Viana, Mariana Groke Marques e Pedro Nacib Jorge Neto	
Protocolos sanitários para doadores de sêmen: mercado interno e exportação	46
Liria Hiromi Okuda	
Novas tecnologias para colheita de sêmen de felídeos domésticos e selvagens	55
Regina Celia Rodrigues da Paz	
Biotecnologia para processamento de sêmen de cães: refrigeração e transporte	66
Isabel Candia Nunes da Cunha	
Sêmen sexado: como incrementar os índices de fertilidade?	70
Gabriel Armond Crepaldi, Marcos Gouveia Pertegato, Pietro S. Baruselli e José Nélio S. Sales	
Tecnologias para criopreservação de sêmen em equinos	85
Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva e Gabriel Augusto Monteiro	
Ultrassonografia em touros destinados a inseminação artificial	109
Gustave Decuadro-Hansen	
Aplicações da termografia por infravermelho na andrologia animal	122
Marcelo George Mungai Chacur	
Inovações no tratamento de infertilidade em reprodutores: uso da homeopatia	130
Mônica F. A. Souza	

BIOTÉCNICAS E CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL

Análise da cinética espermática e integridade estrutural do sêmen ovino criopreservado com dimetilacetamida e/ou glicerol _____ 139

Renata Oliveira Barreto, Rodrigo Freitas Bittencourt, Gabriel Felipe Oliveira de Menezes, Isabella de Carneiro Brandão, Elton Amorim Romão, Gleice Mendes Xavier, Isabela Costa Vasconcelos, Adrielle da Silva Lima, Maicon Pereira Lents e Pamela Santiago Campos

Avaliação da cromatina durante a maturação epididimária do espermatozoide de touro__ 143

Muller Carrara Martins, Lucas Melo Gonçalves, Amanda Nonato, Benner Geraldo Alves e Marcelo Emilio Beletti

Avaliação do uso de três diluidores comerciais no processo de refrigeração do sêmen bovino _____ 146

Raiza Rocha Pereira, Fernanda Battistotti Barbosa, Luiz Costa Filho, Bianca Rodrigues Acacio, Willian Vaniel Alves dos Reis, Maitê Cardoso Coelho da Silva e Breno Fernandes Barreto Sampaio

Comparação entre o Nucleocounter® SP-100 e a espectrofotometria na determinação da concentração espermática em sêmen bovino _____ 150

João Pedro Brandão Zandonade, Rodrigo Paz Sevilla e Neimar Correa Severo

Congelamento do sêmen de reprodutores bubalinos em período reprodutivo desfavorável para uso em IATF _____ 153

Jaci de Almeida e Osvaldo Almeida Resende

Micro-RNAs diferentes expressos em touros férteis e subfértéis _____ 157

Lucas Melo Gonçalves, Ricardo Tomaz da Silva, Matheus de Souza Gomez, Patrícia Tieme Fujimara, Carlos Ueira-Vieira, Muller Carrara Martins e Marcelo Emilio Beletti

Osmolaridade ideal para execução do teste hiposmótico no sêmen *in natura* de ovinos (*Ovis aries*) _____ 160

Alexandre Rossetto Garcia, Ana Beatriz Bossois Moura, Narian Romanello, Jeferson Ferreira da Fonseca, Felipe Zandonadi Brandão, Messy Hannear de Andrade Pantoja, Andréa do Nascimento Barreto, Marco Antonio de Paula Sousa, Daniela Botta e Alessandro Giro

Proteínas espermáticas marcadoras de fertilidade e subfertilidade em bovinos _____ 164

Muller Carrara Martins, Lucas Melo Gonçalves, Pollyanne G. M. Cunha, Romualdo Morandi-Filho, Amanda Nonato, Ricardo Tomaz da Silva e Marcelo Emilio Beletti

Proteínas espermáticas marcadores de fertilidade em bovinos _____ 167

Lucas Melo Gonçalves, Ricardo Tomaz da Silva, Amanda Nonato, Romualdo Morandi Filho, Muller Carrara Martins, Gabriel Lucas Istorino de Souza e Marcelo Emilio Beletti

Proteínas espermáticas que influenciam a fertilização *in vitro* em bovinos _____ 170

Marcelo Emilio Beletti, Muller Carrara Martins, Lucas Melo Gonçalves, Pollyanne G. M. Cunha, Romualdo Morandi-Filho, Amanda Nonato e Ricardo Tomaz da Silva

Proteínas espermáticas que influenciam o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos _____ 173

Marcelo Emilio Beletti, Muller Carrara Martins, Lucas Melo Gonçalves, Pollyanne G. M. Cunha, Romualdo Morandi-Filho, Amanda Nonato e Ricardo Tomaz da Silva

Viabilidade *in vitro* do sêmen ovino criopreservado com dimetilformamida como substituto total ou parcial do glicerol _____ 176

Renata Oliveira Barreto, Rodrigo Freitas Bittencourt, Gabriel Felipe Oliveira de Menezes, Isabella de Carneiro Brandão, Elton Amorim Romão, Gleice Mendes Xavier, Isabela Costa Vasconcelos, Adrielle da Silva Lima, Maicon Pereira Lents e Elisiane Sateles dos Santos

ANDROLOGIA EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Aspectos relacionados ao procedimento de inseminação artificial que podem afetar a taxa de concepção _____ 180

Leticia Zoccolaro Oliveira, Ana Carolina Bahia Teixeira, Juliana Horta Wutke Diniz, Deborah Freitas Silva, Dara Miranda Castro, Amanda Guimarães da Silva e André Luis Rios Rodrigues

Características seminais e ultrassonografia testicular de touros jovens da raça Nelore dos 14 aos 24 meses de idade _____ 184

Guilherme Fazan Rossi, Naiara Nantes Rodrigues, Dayane Priscila Virsman, Erika Aline Ribeiro Dias, Natália Marins Bastos, Fábio Morato Monteiro, Flávia Fernanda Simili, Roberta Vantini, Gisele Zoccal Mingoti e Joaquim Mansano Garcia

Correlação entre concentração de testosterona sérica e classificação andrológica por pontos (CAP) nas raças Nelore e Tabapuã _____ 188

Tulio César Neves e Ivo Pivato

Degeneração testicular em bovino causada por complicações da babesiose _____ 192

Juliana Horta Wutke Diniz, Deborah Freitas Silva, Ana Carolina Bahia Teixeira, Rodrigo Libério Araujo Palhano, Rogrigo Melo Menezes, Leticia Zoccolaro Oliveira e Gabriel Augusto Monteiro

Desenvolvimento sexual de tourinhos Senepol e respostas adaptativas em ambiente tropical _____ 196

Bruna Ferrari, Caroline Carvalho de Oliveira, Rodrigo Albuquerque Lara Franco, Maryene Beatriz Souza Molina Borges, Fabiana Villa Alves, Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes, Lucas Nascimento Silva, Andrea Alves Egito, Thyara de Deco-Souza e Eliane Vianna da Costa-e-Silva

Ecotextura testicular e sua correlação com o laudo andrológico em touros jovens da raça Nelore – resultados preliminares _____ 200

Ana Paula Luiz de Oliveira, Ricardo Andres Ramirez Uscategui, Yury Tatiana Granja Salcedo, Rodrigo Freitas Bittencourt e Jeanne Broch Siqueira

Efeito de estação sobre o prognóstico reprodutivo de ovinos de diversos grupamentos genéticos no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil _____ 204

Marcos Vargas da Silveira, Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo, Ana Cristina Andrade Bezerra, Joana Carolina Trindade Barbosa, Fernanda Battistotti Barbosa, Gustavo Guerino Macedo e Eliane Vianna da Costa e Silva

Efeitos da temperatura superficial da pele sobre as características de qualidade seminal de touros Nelore _____ 208

Luana Gomes Fernandes, Naiara Nantes Rodrigues, Thais Fernanda Ribeiro, Rogério Ribeiro Vicentini, Marcelo Sant' Ana Borges, Marina de Oliveira Silva, Karoline Maria Gil Bras, André Maciel Crespilho, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante e Fabio Morato Monteiro

Influência do grupo genotípico bovino sobre características dos testículos, epidídimos, fluxos das artérias testiculares e sêmen _____ 212

Naiara Nantes Rodrigues, Guilherme Fazan Rossi, Dayane Priscila Vrisman, Anielly de Paula Freitas, Fabio Morato Monteiro e Maria Emilia Franco Oliveira

Perfil andrológico de ovinos de diversos grupamentos genéticos no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil _____ 216

Marcos Vargas da Silveira, Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo, Ana Cristina Andrade Bezerra, Joana Carolina Trindade Barbosa, Fernanda Battistotti Barbosa, Breno Fernandes Barreto Sampaio e Eliane Vianna da Costa e Silva

Perfil andrológico de touros F1 ½ Angus+ ½ Nelore e repostas termográficas em silvipastoril _____ 220

Ariadne Pegoraro Mastelaro, Fabiana Villa Alves, Alessandra Corallo Nicacio, Eliane Vianna da Costa-e-Silva e Maity Zopollatto

ANDROLOGIA EM ANIMAIS DE COMPANHIA

Associações da biometria corporal, biometria testicular e características seminais de felinos (*Felis catus*) em um ambiente tropical _____ 223

Isabella de Matos Brandão Carneiro, Rodrigo Freitas Bittencourt, Mônica Madrigal Valverde, Elton Amorim Romão, Gleice Mendes Xavier, Karita da Mata Fuchs, Catharina Albuquerque Vieira, Renata Oliveira Barreto e Lara Lôbo Dantas

Características biométricas testiculares e a relação com a qualidade espermática em felinos domésticos _____ 227

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo, Josiana de Fatima Schnitzer, Ana Beatriz Marques de Almeida, Luiz Guilherme Corsi Trautwein, Cristiane Sella Paranzini e Maria Isabel Mello Martins

Características testiculares e seminais de cães da raça *Australian Cattle Dog* _____ 231

Teresinha Inês Assumpção, Arthur Peixoto Medeiros, Gustavo Pires de Oliveira Sussmann Nogueira e Gustavo Guerin Macedo

Cinética computadorizada de espermatozoides felinos (*Felis catus*) colhidos por cateterização uretral e criopreservados com diferentes crioprotetores _____ 235

Elton Amorim Romão, Rodrigo Freitas Bittencourt, Mônica Madrigal Valverde, Catharina Albuquerque Vieira, Adrielle da Silva Lima, Maicon Pereira Lents, Renata Oliveira Barreto, Isabella de Matos Brandão Carneiro, Gleice Mendes Xavier e Kárita da Mata Fuchs

Citometria de fluxo para avaliação da integridade de espermatozoides felinos (*Felis catus*) criopreservados com uso de diferentes crioprotetores _____ 239

Elton Amorim Romão, Rodrigo Freitas Bittencourt, Mônica Madrigal Valverde, Catharina Albuquerque Vieira, Adrielle da Silva Lima, Maicon Pereira Lents, Renata Oliveira Barreto, Isabella de Matos Brandão Carneiro, Gleice Mendes Xavier e Kárita da Mata Fuchs

Colheita farmacológica de sêmen em felinos domésticos: Medetomidina versus Dexmedetomidina _____ 243

Gleice Mendes Xavier, Rodrigo Freitas Bittencourt, Mônica Madrigal Valverde, Vivian Fernanda Barbosa, Renata Oliveira Barreto, Catharina Vieira Albuquerque, Isabella de Matos Brandão Carneiro, Maicon Pereira Lents, Elton Amorim Romão e Pamela Santiago Campos

Comparação entre dois fármacos alfa dois agonistas para a colheita farmacológica de sêmen de gatos domésticos _____ 247

Maitê Cardoso Coelho da Silva, Karitha Marques Ullony, Gediendson Ribeiro de Araújo, Pedro Nacib Jorge-Neto e Thyara de Deco-Souza

Correlação do escore de degeneração testicular e cinética espermática de cães sem alterações clínicas _____ 251

Luiz Guilherme Corsi Trautwein, Emily Pittman de Castro, Jamile Haddad Neta, Anne Kemmer Souza, Guilherme Schiess Cardoso, Giovana Wingeter di Santis e Maria Isabel Mello Martins

Influência do estresse e da estimulação tátil sobre o desempenho e comportamento da prole de coelhos Nova Zelândia _____ 255

Ana Larissa Barbosa Monteiro, Luiza Marin Bernardes, Bruno Zomkowski de Azevedo, Kassy Gomes da Silva, Tâmara Duarte Borges e Leandro Batista Costa

ANDROLOGIA EM ANIMAIS SILVESTRES

Biometria testicular e epididimária dos queixadas (*Tayassu pecari*) _____ 259

Renan Luiz Albuquerque Vieira, Celso Henrique Souza Costa Barros, Paola Pereira das Neves Snoeck, Maíra Guimarães Kersul, Marcus Antônio Rossi Feliciano e Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho

Morfologia dos espermatozoides no trato reprodutivo de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814 _____ 263

Teresinha Inês Assumpção, André Luiz Quagliatto Santos e Graciele Freitas Cardoso

Potencial de diferentes soluções hiposmótica para avaliar a integridade funcional dos espermatozoides do queixada (*Tayassu pecari*) _____ 267

Celso Henrique Souza Costa Barros, William Morais Machado, Renan Luiz Albuquerque Vieira, Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho e Paola Pereira das Neves Snoeck

Testículo ectópico em quati (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766): Relato de caso _____ 271

Kárita da Mata Fuchs, Bruna Fabro dos Santos, Guilherme Rezende Ramos, Weslei Souza Chacon e Cezinande de Meira

Palestras

Reunião Anual da
IV ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal



Número e perspectivas do mercado de sêmen no Brasil

Sergio de Brito Prieto Saud

Presidente da Associação Brasileira de Inseminação Artificial- ASBIA

As estatísticas do mercado de genética sinalizam uma mudança positiva, mesmo que em uma toada menor que a desejada, do uso da inseminação artificial na pecuária brasileira. Nos principais estados produtores de leite, a técnica é aplicada entre 9% e 15% das fêmeas em idade reprodutiva, sendo 7,3% a média nacional conforme apontou o Index ASBIA 2018. Se a recuperação da economia do país continuar ocorrendo em 2019 e o preço do leite não sofrer oscilações negativas, devemos ter uma melhora nesse índice até o final do ano.

E mais vacas inseminadas significa maior demanda por mão de obra qualificada no campo. Falamos muito das tecnologias desenvolvidas nos últimos anos para elevar a qualidade do sêmen produzido no Brasil, mas é importante destacar que todo esse trabalho pode ir por água abaixo se a tarefa de inseminar o rebanho não for bem executada. O sucesso da inseminação, seja pela IA convencional ou pela IATF, está diretamente ligado à adoção dos procedimentos corretos de conservação e manipulação do sêmen. E somente um profissional capacitado conseguirá executar a tarefa com a precisão exigida.

O produtor precisa encarar os custos com a capacitação da sua equipe como um investimento frequente e essencial para ter bons índices de taxa de prenhez no rebanho, traduzindo para o “economês”, mais rentabilidade no negócio. Sabemos que a mão de obra é um problema antigo no agronegócio, mas as soluções estão aí ao alcance de todos. A ASBIA recomenda um padrão de qualidade para os cursos de inseminação aplicados no Brasil, como forma de garantir um bom nível técnico nessas capacitações. Trata-se de um treinamento com aulas teóricas e práticas, de no máximo 40 horas, sobre as vantagens da técnica e as formas corretas de utilizá-la. Os cursos recomendados pela ASBIA são ministrados por técnicos capacitados e devem abordar temas como: Vantagens da Inseminação Artificial; Anatomia e fisiologia reprodutiva dos bovinos; Informações sobre reconhecimento de cio, horário de IA e quando não se deve inseminar uma vaca em cio; Descongelamento, manipulação do sêmen e a correta deposição no aparelho reprodutivo; Aprimoramento prático da técnica de IA; Informações sobre manejo e índices zootécnicos; além das Noções básicas sobre programas de IATF e manejo de botijões criogênicos, onde o sêmen é armazenado.

Quanto mais capacitada é a equipe, melhor será a relação de doses por vaca prenha e menor o custo da técnica para as fazendas. No Brasil, a média praticada é de quase três doses de sêmen, mas com uma mão de obra capacitada podemos reduzir para índices mais próxi-

mos a duas doses ou menos. Isso significa, por exemplo, uma redução de custos da ordem de milhões de reais se levarmos em conta, em um raciocínio simples, que as 4,2 milhões de doses de sêmen de raças leiteiras vendidas no mercado interno em 2018 serão aplicadas dentro da relação dose/vaca ideal. Com essa economia de recursos financeiros nas propriedades rurais, o produtor pode investir ainda mais na tecnificação da produção de leite, saindo de um círculo vicioso para um círculo virtuoso na pecuária leiteira.

Tanto na pecuária leiteira quanto na de corte, a eficiência reprodutiva do rebanho deve receber atenção redobrada, pois tem influência direta na rentabilidade do negócio. Falhas na detecção de cios acabam comprometendo a taxa de serviço e a eficiência reprodutiva dos rebanhos que utilizam Inseminação Artificial (IA) convencional. Os estados nutricional e metabólico também interferem na fertilidade de rebanhos leiteiros. Uma alternativa para melhorar a eficiência reprodutiva é a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), técnica que permite programar as inseminações e os nascimentos e, conseqüentemente, manter a produção constante durante o ano ou aumentar a produção em períodos de entressafra.

Pesquisas indicam que os métodos tradicionais de detecção de cio raramente conseguem índices de eficácia acima de 50% a 70%, com isso, muitas das vacas em cio não são inseminadas. Quando se utilizam protocolos de IATF intensivamente em rebanhos leiteiros é observada diminuição dos intervalos entre partos (IEP) e a primeira IA, e entre o parto e concepção (MONTEIRO JR et al., 2015b). Com isso, reduz-se a média de intervalo entre partos (atualmente a média nacional é de um bezerro a cada um ano e meio), conseguindo, assim, atingir a condição ideal de um bezerro por ano. Numa propriedade onde o IEP é reduzido para 12 meses, temos uma lactação a mais a cada período de 3 anos, ou seja, 50% de aumento de produção leiteira por ano. Ter mais bezerras produzidos significa mais animais para venda ou para reposição no rebanho. Outro ganho financeiro pode vir da concentração dos partos nos períodos de entressafra leiteira. Com a IATF é possível sincronizar lotes de animais para parirem e fornecerem mais leite na época quando este produto tem melhor preço de mercado. A técnica tem evoluído bastante nos últimos anos, sendo mais acessível, inclusive em relação aos custos.

Os melhores índices de IATF podem ser obtidos quando utilizamos protocolos de sincronização mais adequados. Os protocolos são formados pela administração estratégica de hormônios reprodutivos em uma maneira sequencial e tem como objetivo a ovulação do foliculo em um momento pré-determinado. A técnica tem melhores resultados em rebanhos leiteiros quando alguns pré-requisitos são adotados, dentre eles: a adoção de um controle sanitário rigoroso para evitar que doenças como Brucelose e Leptospirose interfiram na reprodução; exame do sistema reprodutor das vacas feito por um médico veterinário para eliminar animais com problemas clínicos (infecções uterinas, cistos ovarianos, etc.); as vacas que serão sincronizadas devem estar em média/ boa condição corporal e ter no mínimo 45 dias de intervalo pós-parto.

Outra recomendação importante é utilizar sêmen de touros melhoradores para que realmente ocorra o avanço genético do rebanho e bons índices de prenhez. É preciso ainda ter cuidado com a manipulação da dose de sêmen, seja na fazenda, durante o transporte ou no

momento da inseminação. Se feita de forma incorreta, pode provocar a perda da qualidade da palheta de sêmen, o que causará um baixo índice do resultado da IA. Em caso de dúvida se houve falhas na conservação que possam comprometer a qualidade do sêmen, recomendamos a análise das doses de sêmen que serão utilizadas na IATF em um laboratório credenciado para este tipo de serviço. A ASBIA oferece este serviço em laboratório próprio localizado, em Brasília.

Certamente, a IATF é uma ferramenta que deve ser utilizada frequentemente nos rebanhos leiteiros e de corte, mas a técnica não deve ser vista como a única solução para problemas de manejo reprodutivo. Para se obter uma boa fertilidade do rebanho, é importante integrar as boas práticas sanitárias e nutricionais a um manejo reprodutivo adequado. Neste caso, a assessoria de um Médico Veterinário e/ou um Zootecnista pode ser de grande ajuda.

Touros CEIP – conceito, critérios de avaliação e uso da genética

Gabriel Armond Crepaldi^{1,2}

gcrepaldi@strepro.com.br

Marcos Gouveia Pertegato²

Abstract: Breeding programs focused on weight gain selects high growth animals and large adult weight. Large females have difficulty in keeping in the herd because they don't get pregnant at the end of the breeding season due to the high nutritional requirement. CEIP programs are characterized by the quality of information. Such programs form rigid contemporaneous groups and perform visual assessments that direct the herd to a standardized carcass model with moderate adult size. The objective is to fetch animals with quick growth and early fat deposition. In recent years, the search for sexual precocity has broken paradigms that Nelore is a late breed with animals borrowing below 12 months of age in pasture with supplementation. Considering these objectives, the use of CEIP genetics should be done by livestock farmers with the objective of producing meat in the predominant production system in Brazil, which is the extensive.

Keywords: CEIP, beef, genetic, herd.

Palavras-chave: CEIP, corte, genética, rebanho.

Introdução

O aumento da competitividade é uma realidade na pecuária de corte brasileira. A busca por animais economicamente produtivos tem levado os criadores a investirem mais na aplicação de tecnologias.

Deste modo, faz-se necessário produzir carne de qualidade, em sistemas de produção que sejam capazes de se manter produzindo de forma rentável. Isso, entre outras coisas, requer o uso de animais adequados às condições do ambiente de produção, dessa forma, a pecuária brasileira irá atender ao mercado consumidor interno e externo.

Conceito

Criado oficialmente em 1995, a partir da publicação da portaria 267, depois regulamentado no mesmo ano através da portaria 22, tornando operacionalmente habilitado. Recentemente foi atualizado pela publicação da Instrução Normativa nº 12, de 2 de fevereiro de 2018.

O CEIP – Certificado Especial de Identificação e Produção – é regulamentado pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para bovinos com aptidão corte,

¹ Universidade de São Paulo.

² ST Repro.

que avaliados geneticamente são classificados como superiores dentro do grupo de animais submetidos à seleção genética, esta baseada em critérios científicos e tecnológicos respeitando aos objetivos e metas da melhoria da qualidade e produtividade do rebanho.

O certificado é outorgado pelo MAPA aos programas de melhoramento genético, associações, consórcios de criadores, empresas agropecuárias e criador individual, aprovados e reconhecidos no projeto técnico CEIP, junto a Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo – SDC, Departamento de Sistemas de Produção e Sustentabilidade – DEPROS.

Inicialmente um projeto poderá emitir apenas 20% de CEIP aos animais avaliados dentro da população de cada safra, machos e fêmeas, podendo evoluir em 0,5% ao ano, desde que comprove tecnicamente ganho genético da população, atingindo até 30% ao longo dos anos.

Hoje temos cadastrados no MAPA 25 programas de CEIP ativos autorizados à emitir o certificado no país, onde 11 deles voltados à seleção de nelore. O produtor poderá ser inscrito em apenas um projeto deles para fins de emissão de certificação especial de identificação e produção.

Os indivíduos portadores do CEIP têm os benefícios de isenção de Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Serviços (ICMS), financiamentos de instituições financeiras públicas ou privadas e possibilita o ingresso em centrais de inseminação artificial para coleta com fins de comercialização de sêmen. No certificado constam as informações de identificação do animal, genealogia, criatório, programa e técnico responsável pela emissão e suas informações genéticas.

Critérios de avaliação

A produção de bovinos de corte no Brasil tem se modernizado nas últimas décadas, resultando em aumentos na produtividade dos sistemas de produção e na melhoria da qualidade do produto. Os avanços científicos e tecnológicos alcançados ligados ao manejo e à alimentação certamente foram decisivos para o aprimoramento do setor, mas muito do ganho produtivo obtido foi consequência da melhoria constante do potencial genético dos animais.

É importante salientar que o avanço genético é possível se utilizarmos as ferramentas corretas na seleção das características produtivas desejáveis. Alguns programas de melhoramento têm realizado seleção por vários anos quase que exclusivamente para ganho de peso e, consequentemente, crescimento, valorizando animais com alto peso adulto (Jorge Junior et al., 2001). No entanto, a seleção exclusiva para ganho de peso, ao longo do tempo, conduz a animais mais pesados a idade adulta, consequentemente, mais exigentes quanto aos requerimentos nutricionais. Dessa forma, concluímos que devemos observar características de precocidade sexual, precocidade e velocidade de crescimento e precocidade de terminação.

Precocidade Sexual

Em geral, a decisão do criador de colocar uma novilha em reprodução, baseia-se em um determinado peso e/ou idade padrão. Quando o sistema produtivo está dado por uma pri-

meira parição aos quatro anos de idade, o nível de desfrute do rebanho fica em torno de 10%. Este índice de desfrute pode ser quase duplicado, se a primeira parição ocorrer aos 3 anos de idade e atingirá 40% com o primeiro parto aos 24 meses de idade e abate dos machos aos 12-13 meses. Fica claro que a oportunidade de utilização de fêmeas sexualmente mais precoces terá reflexo direto na eficiência, rentabilidade e competitividade da pecuária bovina nacional.

A idade à puberdade é uma função do genótipo e do nível de nutrição até a idade de reprodução. SHORT e BELLOWS (1971) encontraram que altas taxas de ganho em peso, obtidas através de altos níveis de alimentação, propiciaram maior precocidade sexual e pesos à puberdade.

Entretanto, segundo GREER et al. (1983), do ponto de vista biológico, a idade à puberdade não é determinada pelo peso e sim por um conjunto de condições fisiológicas que também resultam em um determinado peso. WOLFE et al. (1990) observaram que a seleção para taxa de ganho em peso, não influenciou a idade à puberdade de fêmeas da raça Hereford. Parece que, após um certo peso crítico ser atingido, as diferenças em ganho em peso têm pouca influência sobre a idade à puberdade (WILTBANK et al., 1966). Estes autores observaram que, quando o ganho pós-desmama foi pequeno, pequenas diferenças em ganho em peso tinham um efeito importante sobre a idade à puberdade. Por outro lado, quando o ganho pós-desmama era maior, diferenças em ganho médio diário não afetaram a idade à puberdade.

Outro aspecto a considerar é a condição corporal da vaca ao parto. Diversos trabalhos têm mostrado uma associação entre a condição corporal da vaca (avaliação visual) ao parto e características reprodutivas como, taxa de retorno ao cio, taxa de prenhez, intervalo de partos, etc. (Wiltbank et al., 1962). Isto pode ser extremamente importante em novilhas, principalmente para aumentar a taxa de retorno ao cio, após o primeiro parto.

Estimativas de herdabilidade da idade à puberdade estão em torno de 0,43, indicando que esta característica deverá responder favoravelmente à seleção (Brincks, 1989). A idade à puberdade é uma característica de difícil mensuração, principalmente em condições extensivas. Entretanto, a idade ao primeiro parto é tão herdável quanto aquela e pode ser, facilmente, medida.

Precocidade de Crescimento

A velocidade de crescimento, expressa como ganho médio diário (GMD) em diferentes períodos ou como peso ajustado para determinadas idades, vêm sendo utilizada como critério de seleção em gado de corte há décadas. As herdabilidades apresentam valores médio-altos e as correlações genéticas são positivas; portanto, as respostas diretas e correlacionadas têm sido expressivas.

Precocidade de Terminação

Na prática, o produtor consegue identificar os animais que apresentam a terminação necessária para ser levado ao frigorífico. Os que não estão acabados serão mantidos na propriedade por semanas, meses ou mesmo até a próxima safra, o que significa um custo extra na produção e queda na liquidez da propriedade. O animal com boa terminação, nem sempre é o mais pesado.

Um outro aspecto a considerar, é que, provavelmente, os mesmos touros que produzem novilhos com precocidade de terminação também devem produzir as vacas que se mantêm em melhor condição ou estado corporal. Esta precocidade de terminação, aliada a um peso maduro intermediário, permite que as vacas possam acumular algumas reservas no final do outono (final das águas) passando assim o inverno/seca para, após a parição, voltarem a ciclar mais rapidamente, como observado em vários trabalhos descritos em revisão apresentada por Kunkle et al. (1994).

Diante este pensamento foi desenvolvido pela empresa GenSys o método CPMU, na década de 1990, onde tem gerado informações que são utilizadas em programas de melhoramento no Brasil. Este método se refere as seguintes características de Conformação (C), Precocidade (P), Musculosidade (M) e Umbigo (U).

Na prática as avaliações visuais dos programas de melhoramento seguem um roteiro operacional, na CIA de Melhoramento a execução acontecesse da seguinte forma:

Sistema de Identificação

Sugerimos os seguintes esquemas de identificação para aquelas fazendas que ainda não tenham o sistema padronizado:

Os animais que estão na fazenda, anteriores à implantação da Cia de Melhoramento, permanecerão com a numeração já existente, desde que atendam aos princípios de legibilidade e singularidade, os bezerros nascidos após a implantação do programa receberão uma marcação distinta, denominado sistema sequencial dentro da safra, visando a uniformidade de todos os animais participantes da Cia de Melhoramento exceto aqueles animais registrados, pois possuem uma identificação própria.

Os animais serão identificados por uma letra indicando a safra, seguida de um número sequencial formado por quatro algarismos. Por exemplo: o primeiro animal nascido na safra 2014/2015 receberá o número A0001, da mesma forma o primeiro animal nascido na safra 2015/2016 receberá o número B0001.

Esses métodos têm o intuito de evitar duplicidade de código animal dentro do banco de dados e no manejo da fazenda. Na fazenda o número seria repetido só após todas as letras do alfabeto serem utilizadas, o que torna improvável a existência de duplicidade de animais.

No banco de dados acrescido ao número de manejo (número do animal) encontra-se também o ano de nascimento, concatenados ao código do programa e do rebanho teremos a identificação no sistema A 12, assim após 24 anos ou letras do algarismo, ainda teremos o ano de nascimento para diferenciar a identificação do animal no banco de dados.

Manejo Pré-Desmama

Na rotina normal de cria faz-se um manejo sanitário de bezerros por volta do 4o ou 5o mês de vida, esta é a oportunidade para concentrarmos alguns manejos importantes e preparatórios para a desmama.

- Vacina clostridiose (todos os animais)

- Vermifugação (todos os animais)
- Vacina contra Brucelose (Somente fêmeas)
- Vacina contra Raiva (Endêmica – ocorrência regional)
- Identificação Externa
- Número do animal – (Obrigatória)
- Marca da fazenda (Opcional)
- Carimbo de mês de nascimento (Opcional)
- Conferência do relatório de nascimento (Sexo, Número, Número da Mãe, lote ou Grupo de Manejo)

Este manejo deve ser realizado mensalmente com o(s) lote(s) que atinjam esta idade, assim não haverá acúmulo de atividades e pode-se realizar um manejo normal da fazenda acrescido de atividades do programa de melhoramento.

A necessidade de separação dos machos e fêmeas para a realização da vacina de brucelose, propicia a conferência de sexo do produto com o cadastro de nascimento (Banco de dados).

Grupos Contemporâneos

A expressão das características fenotípicas de um animal é resultado da ação de seus genes e dos efeitos ambientais. Portanto, para que o melhoramento das características de importância econômica seja eficaz, é necessário conhecer os fatores ambientais que influenciam a expressão do potencial genético do indivíduo. As comparações de desempenho dos animais são realizadas com base em grupos de animais, conhecidos como grupo de contemporâneos (GC). Assim sendo, a composição do GC constitui um requisito fundamental para avaliação genética dos animais.

Por definição, grupo contemporâneo, é o grupo de animais do mesmo sexo, que nasceram na mesma época, na mesma fazenda, estiveram juntos no mesmo grupo de manejo, foram submetidos aos mesmos desafios, manejo, ambiente e alimentação durante um determinado período, foram avaliados no mesmo dia e que assim podem ser comparados com justiça.

A formação do GC é de extrema importância para avaliação genética, visto que a avaliação dos animais dentro dos GCs permite que as diferenças genéticas possam ser corretamente comparadas entre os animais de diferentes rebanhos.

Para avaliação genética, são consideradas as seguintes variáveis para formação dos GC:

- A) Ano de nascimento,
- B) Sexo,
- C) Fazenda da avaliação,

D) Data da avaliação e

E) Lote de avaliação.

Na formação de grupos contemporâneos será necessário seguir algumas recomendações:

- Dentro de um mesmo lote de manejo poderá existir animais dos dois sexos, mas para a avaliação visual os mesmos deverão ser apartados em lotes de machos e fêmeas. O ideal é que desde a maternidade se faça lotes por sexo, aumentando o número de animais por grupo contemporâneo melhorando a distribuição das notas na avaliação visual.

- Os animais que irão compor o grupo contemporâneo não poderão ter diferenças de idade superior a 90 dias. O Desejável são diferenças de no máximo 60 dias de idade entre os animais.

- O número mínimo para formação do grupo de manejo é de 30 animais, o que possibilitaria uma melhor distribuição dos escores da avaliação visual, por outro lado, o número máximo irá depender da estrutura da fazenda para garantir o tratamento uniforme de todos os animais.

Um grupo de manejo composto por poucos animais poderá acarretar prejuízos para avaliação genética, pois haverá maiores chances de não conexão do grupo ao grupamento central dos dados. A conectabilidade se estabelece mediante 10 laços genéticos em cada grupo contemporâneo. Não é permitido misturar grupos contemporâneos diferentes e/ou inserir animais que não pertencem ao lote 150 dias antes da avaliação. Além disso, o grupo contemporâneo dos produtos deve ser formado por data de nascimento, e ocasionalmente por sexo, mas nunca por valor genético das matrizes. Para a formação de grupos contemporâneos no sobreano, não se deve reagrupar os animais no pós-desmama de acordo com seus índices ou decas da desmama.

Pesagem em Jejum

Para que um animal tenha o seu peso coletado, anteriormente o mesmo deve ser submetido a um jejum total de 12 a 14 horas, para o esvaziamento do trato gastrointestinal. Assim, o peso mensurado ficará restrito apenas ao peso de sua carcaça.

Conforme demonstrado na Figura 1, resultados de Carvalheiro et al. (1998), cada animal possui um período distinto para perda do conteúdo gastrointestinal, mas após 12 horas já se inicia uma estabilização na perda de peso e o que se mensura é apenas carcaça animal.

Avaliações Visuais CPMUT

Além do peso, características fenotípicas são avaliadas após a “baliza” do lote e posteriormente a avaliação.

A baliza consiste em apresentar todos os animais do lote ou grupo contemporâneo ao técnico (passando todos os animais “fino” pela porteira), para que o mesmo defina os parâmetros de cada característica referente ao lote que será avaliado.

Em cada característica cada animal receberá uma nota de 1 a 5 (com exceção da característica de temperamento que não possui a nota 3). Cada lote e ou grupo contemporâneo deverá realizar a baliza antes de iniciar as avaliações.

Características avaliadas:

- a) Conformação: Escore relativo ao grupo contemporâneo, variando de 1 a 5. Descreve o comprimento corporal do animal, profundidade torácica e arqueamento torácico.
- b) Precocidade de Terminação: Escore relativo ao grupo contemporâneo, variando de 1 a 5. Descreve a velocidade de terminação de carcaça, através da relação de pernas-costelas (silhueta), bem como a habilidade de deposição de gordura sobre a carcaça.
- c) Musculosidade: Escore relativo ao grupo contemporâneo, variando de 1 a 5. Descreve o volume e definição da massa muscular do animal.
- d) Umbigo/Prepúcio: Escore absoluto, varia de 1 a 5, na qual é avaliado o comprimento e direcionamento do umbigo e prepúcio do animal.
- e) Temperamento: Escore absoluto, com escores 1 e 2 para animais de comportamento calmo e escores 4 e 5 para animais mais reativos, que não param de se movimentar durante o manejo e chegam a tentar pegar o avaliador durante o manejo. Esta característica só é avaliada ao sobreano.
- f) Circunferência escrotal: aferida somente nos machos ao sobreano.
- g) Características desclassificantes: A cada evento de avaliação dos animais (desmama ou sobreano), os técnicos observam também características desclassificantes, as quais são inseridas no banco de dados e são consideradas na elaboração da lista de candidatos ao CEIP, bem como na determinação dos acasalamentos.

A seguir as características desclassificantes e suas respectivas siglas: problema de aprumos adquiridos ou congênicos (AP), chanfro (CH), problemas de boca (agnata ou prognata) (BO), despigmentação (DP), hipoplasia testicular e ou problemas testiculares (HT), composição racial (RA), hérnia (HE) entre outros defeitos que possam ocorrer.

Para uma avaliação ser bem-sucedida os animais deverão ser comparados com justiça e igualdade. Por isso nas avaliações visuais fenotípicas devem ser retirados dos lotes: animais doentes, ou que possuem algum defeito adquirido, guacho e animais que já foram desmamados, sendo que os mesmos não conseguirão expressar todo o seu potencial genético penalizando o próprio animal e seus pais.

Desmama

A desmama é um processo estressante para o bezerro e requer manejos especiais para que ele possa quebrar os laços maternos, sem comprometer o seu desenvolvimento no período pós desmama. A propriedade deverá escolher o manejo que se adeque a sua realidade minimizando o stress causado pela desmama.

Este manejo deve ser realizado nos animais com idade, preferencialmente, ao redor dos 205 dias ou 7 meses, podendo variar dentro do intervalo de 150 a 310 dias.

Os animais que participam do programa de melhoramento, não poderão ser desmamados sem a prévia avaliação do técnico avaliador. Caso os animais sejam desmamados sem a referida avaliação, os mesmos não poderão ser avaliados posteriormente e também não serão avaliados ao sobreano, ou seja, serão cortados das avaliações genéticas.

Sobreano

Ao sobreano cada grupo de manejo é trazido ao curral onde novamente os mesmos são submetidos às avaliações de pesagem (após jejum de 12 a 14 horas), medição da circunferência escrotal (no caso de machos) e avaliação visual de Conformação, Precocidade, Musculosidade, Umbigo e Temperamento.

Marcação de CEIP

De acordo com o calendário anual de atividades, são estabelecidas datas limites para o envio de dados, desta maneira o responsável pelo lançamento dos dados deve ficar atento com a atualização e envio de seu banco de dados.

Para a determinação da lista de candidatos ao CEIP será considerada a 3ª rodada de avaliação, neste momento aqueles que já enviaram seus dados receberão o relatório de candidatos à certificação.

Na revisão dos candidatos ao CEIP o técnico utilizará os critérios de Raça, Aprumo e Harmonia. Para cada característica avaliada utiliza-se uma nota de 1 a 5, sendo que a nota 1 é excludente para fins de certificação (CEIP).

Os animais aprovados para o CEIP serão identificados e estes animais receberão o CEIP (Certificado Especial de Identificação e Produção).

Uso da Genética

Investir em touros melhoradores é um ponto de grande importância para o incremento em produtividade e lucratividade das fazendas. De acordo com dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), as fazendas de gado de corte que usam touro melhoradores conseguem obter um retorno econômico de até 5,3 vezes maior que o valor investido na compra do animal (CEPEA, 2017).

Embora muitas propriedades sejam ligadas à paixão e à tradição familiar, a necessidade de manter a propriedade competitiva faz com que o pecuarista busque profissionalizar o seu negócio, aumentando o investimento em genética, com o objetivo de agregar valor à atividade. Nesta conjuntura, touros melhoradores são cada vez mais utilizados para agregar valor à progênie. Tal ação tem refletido de maneira positiva na lucratividade do negócio e potencializado a pecuária de ciclo curto.

O objetivo principal do uso de uma genética melhoradora por meio de reprodutores superiores é atingir os pontos fracos do rebanho. O primeiro passo na escolha de um touro é definir quais as características produtivas necessitam ser melhoradas no rebanho e posteriormente devemos seguir alguns aspectos técnicos importantes sobre melhoramento genético.

Para obter sucesso produtivo no uso de genética CEIP, o pecuarista deve observar a consistência genética do animal utilizado. Sempre prestar atenção nas características avaliadas. As características devem ser olhadas como um todo, pois conjuntamente irão fornecer a informação daquele touro. Para uma pecuária de ciclo curto é muito importante escolhermos um touro de peso ao nascimento adequado (característica de ótimo intermediário), com alta velocidade de crescimento e precocidade de terminação. São alguns exemplos das várias características avaliadas pelos programas, e que estão disponíveis para facilitar a escolha do produtor, tanto para reprodutores quanto para sêmen.

É preciso ficar atentos para que sistema de produção que o reprodutor foi selecionado. O ideal é procurar reprodutores que foram selecionados no mesmo sistema em que serão utilizados.

Um exemplo prático é comparar 2 animais reais com DEP's diferentes e filhos de um mesmo pai. Ao compararmos um touro A, filho de um determinado touro, chancelado com o CEIP, com um touro B, filho do mesmo touro, classificado abaixo do limite para emissão do certificado, chegamos aos seguintes resultados econômicos:

Considerando que a DEP de peso ao desmame do touro A é 17 kg, contra 2 kg do touro B, o que vale para avaliarmos a compra, é a diferença entre eles, de 15 kg, com o uso de 1 touro para 35 vacas, uma taxa de prenhez de 85%, ele irá produzir 30 bezerros/ano, com vida útil de 6 anos, os touros terão produzidos 30 bezerros x 6 anos = 180 bezerros. Multiplicando os 180 bezerros pelo ganho de peso adicional que os filhos do touro A terão e relação aos filhos do touro B, teremos 180 bezerros x 15 Kg = 2.700 Kg de ganho de peso a favor do touro A. Com o preço do kg vivo está ao redor R\$ 6,00, o valor diferencial dos filhos do touro A em relação ao filhos do touro B será de R\$ 16.200. Esse valor é o quanto o touro A vale, a mais, que touro B.

Estendendo a comparação, para cada touro ruim usado num grupo de 35 vacas, deixamos de comprar um touro melhorador. Ao usar o touro melhorador, essa diferença vai direto para o bolso, em forma de lucro.

Considerações Finais

O primeiro passo na escolha de um touro é definir quais características produtivas necessitam ser melhoradas no rebanho e posteriormente devemos seguir alguns aspectos técnicos importantes sobre melhoramento genético.

Não basta, no entanto, que o touro seja geneticamente superior. Para ser melhorador, o touro precisa, antes de tudo, ser um bom reprodutor. Assim, além do valor genético, os touros precisam apresentar boa integridade genital, libido, funcionalidade, capacidade fecundante e que sejam isentos de defeitos desclassificantes, de forma que possam, eficientemente, identificar, cobrir e fecundar as matrizes. Assim sendo, a superioridade genética dos pais será repassada aos descendentes que vão completar o ciclo produtivo quer na indústria frigorífica, para a produção de carne, quer na reposição de touros e matrizes dos rebanhos de cria, base do sistema de produção.

É necessário mudarmos o conceito e passarmos a enxergar esse produto como insumo. Se investirmos nos reprodutores e sêmen proporcionalmente às avaliações genéticas e morfológicas, teremos uma safra melhor de matrizes de reposição, bezerros e bois para abate.

Referências bibliográfica

- [1] Jorge Júnior J, Pita FVC, Fries LA, Albuquerque LG. Influência de alguns fatores de ambiente sobre os escores de conformação, precocidade e musculatura à desmama em um rebanho da raça Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1697-1703, dez. 2001
- [2] Short RE, Bellows RA. Relationships among weight gains, age at puberty and reproductive performance in heifers. *J. Anim. Sci.*, v. 32, p.127-132, 1971.
- [3] Greer RC, Whitman RW, Staigmiller RB, Anderson DC. Estimating the impact of management decisions on the occurrence of puberty in beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v.56, p.30-36, 1983.
- [4] Wiltbank JN, Gregory KE, Swinger LA, Ingalls JE, Rothlisberger JA, Koch RM. Effects of heterosis on age and weight at puberty in beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v.25, p.744-750, 1966.
- [5] Wolfe MW, Stumpf TT, Wolfe PL, Day ML, Koch RM, Kinder JE. Effect of selection for growth traits and heterosis on age and weight at puberty and conception in bovine females. *J. Anim. Sci.* , v.68, p.1595-1602, 1990.
- [6] Wiltbank JN, Rowden WW, Ingalls JE, Gregory KE, Koch RM. Effect of energy level on reproductive phenomena of mature Hereford cows. *J. Anim. Sci.*, v. 21, p. 219-225, 1962.
- [7] Kunkle WE, Sand RS, Rae DO. Effect of body condition on productivity in beef cattle. In: Fields, M.J.; Sand, R.S. **Factors affecting calf crop**. CRC Press, London, p.167-178, 1994.
- [8] Cia de Melhoramento. **Manual operacional**, 2015
- [9] Mapa – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria 267/95**, 1995
- [10] Fries, L. A. Genética para um sistema de produção de ciclo curto. In: 1o. Simpósio da Carne Bovina: da produção ao mercado consumidor, 2003, São Borja, RS. **Anais**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 47-83
- [11] Koury Filho W. **Análise genética de escores de avaliações visuais e suas respectivas relações com o desempenho ponderal na raça Nelore**. 2001. 82 p. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, 2001.

Técnicas de reprodução e impactos no bem-estar animal

Lizière Pereira Buss
Gabriela Lopes Santiago
Felipe José de Carvalho Corrêa

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
comissao.bea@agricultura.gov.br

Resumo: O bem-estar animal pode ser definido como o estado de um animal em relação às suas tentativas de se adaptar ao meio ambiente em que vive e um bom grau de bem-estar animal significa um animal que está seguro, sadio, bem nutrido, livre para expressar comportamentos naturais e livre de estados mentais negativos, como estresse, medo e dor. No Brasil há normativas de boas práticas para o bem-estar dos animais de produção e interesse econômico, além da obrigação ética dos profissionais e produtores.

Palavras-chave: bem-estar animal; biotecnologia; reprodução; legislação.

Keywords: animal welfare; biotechnology; reproduction; legislation.

Bem-Estar Animal

Conforme conceito elaborado por Donald Broom em 1986, o bem-estar animal pode ser definido como o estado de um animal em relação às suas tentativas de se adaptar ao meio ambiente em que vive. Segundo a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), um bom grau de bem-estar animal significa um animal que está seguro, sadio, bem nutrido, livre para expressar comportamentos naturais e livre de estados mentais negativos, como estresse, medo e dor. O termo descreve a maneira como os indivíduos enfrentam o meio ambiente e que inclui sua saúde, suas percepções, seu estado mental e outros efeitos positivos ou negativos que influenciam os mecanismos físicos e psíquicos do animal. Isso inclui tanto a saúde física dos animais como também sua saúde mental e comportamental, suas interações sociais e sua adaptação ao meio ambiente. Em 2016 David Mellor afirma que um animal que tem um bom grau de bem-estar é um animal que tem uma vida que vale a pena ser vivida, ou seja, uma vida onde as experiências positivas suplantam as experiências negativas. Portanto, bem-estar não é apenas evitar dor e sofrimento, mas é proporcionar estados mentais positivos aos animais.

Legislação

O nosso texto constitucional, Art. 225, traz a proteção aos animais como um dever do poder público e da sociedade, e insere esta proteção no contexto mais amplo de proteção ambiental e na garantia de direito a um meio ambiente equilibrado. A Lei nº 8171/1991 aponta que é objetivo da política agrícola proteger o meio ambiente e fazer uso racional de seus recursos. E ainda aponta que é dever do poder público disciplinar e fiscalizar o uso racional do solo, da água, da fauna e da flora. Vale ressaltar que fauna, nestes textos, permite sua leitura ampla, contemplando todos os animais, domésticos, domesticados, nativos, exóticos e silvestres.

A Instrução Normativa nº 56 de 2008 afirma que deverão ser observados os seguintes princípios para preservar o bem-estar dos animais: I - proceder ao manejo cuidadoso e responsável nas várias etapas da vida do animal, desde o nascimento, criação e transporte; II - possuir conhecimentos básicos de comportamento animal a fim de proceder ao adequado manejo; III - proporcionar dieta satisfatória, apropriada e segura, adequada às diferentes fases da vida do animal; IV - assegurar que as instalações sejam projetadas apropriadamente aos sistemas de produção das diferentes espécies de forma a garantir a proteção, a possibilidade de descanso e o bem-estar animal; V - manejar e transportar os animais de forma adequada para reduzir o estresse e evitar contusões e o sofrimento desnecessário; VI - manter o ambiente de criação em condições higiênicas.

Já o Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) deixa muito claro o dever ético dos médicos veterinários e zootecnistas para analisar as situações encontradas nos sistemas produtivos com o objetivo de para evitar sofrimento desnecessário e maus tratos. A Resolução nº 1236/2018 que define maus tratos afirma claramente que é necessário atender as demandas nutricionais, fisiológicas, sanitárias e comportamentais da espécie e que a falha do atendimento de qualquer destes conjuntos de indicadores pode caracterizar maus tratos.

Discussão

Um agente estressor é tudo aquilo de desperta respostas comportamentais e fisiológicas de um organismo em busca da homeostase. A forma como um animal é manejado desde muito jovem tem um efeito muito significativo em suas respostas comportamentais e fisiológicas no futuro, pois muitos estímulos e respostas possuem potencial para serem aprendidos.

No contexto da reprodução de bovinos podemos afirmar que o manejo do rebanho dos pastos para o curral, o manejo no curral, a contenção, o toque retal, a eletro-ejaculação, manobras ginecológicas e obstétricas, além da utilização de instrumentos veterinários, são procedimentos muito comuns e são todos estressores e potencialmente muito dolorosos do ponto de vista dos animais.

Muitas das práticas reprodutivas, como a inseminação artificial (IA), a eletro-ejaculação, a aspiração folicular, entre outras, induzem respostas fisiológicas e comportamentais que nos permitem concluir que o animal pode sim sofrer durante os procedimentos, como aumento de frequência respiratória, cardíaca, vocalizações, expressões faciais e corporais indicativas de dor.

Para mitigar impactos negativos no bem-estar animal e atender aos princípios estabelecidos na Instrução Normativa nº 56/2008 é fundamental que os profissionais conheçam a etologia da espécie com a qual trabalham, estando atentos aos sinais sutis de medo, desconforto e dor, de forma a adotar procedimentos mitigatórios de imediato. Ainda é fundamental um manejo não aversivo, e de preferência com associações positivas, durante a condução e contenção dos animais para os procedimentos. Boas instalações que proporcionem conforto térmico, troncos que evitem pressão excessiva, dor e lesão nos animais também contribuem para maior segurança dos operadores e para um melhor grau de bem-estar animal. Profissionais hábeis e gentis também são importantes para minimizar medo, desconforto e dor nos procedimentos.

Considerações Finais

Podemos afirmar que muitos dos procedimentos de manejo que hoje executamos nos animais de produção precisam de adaptação ou substituição, para que possamos de fato evitar sofrimentos desnecessários. No Brasil já dispomos de determinações normativas para adotar boas práticas para o bem-estar dos animais de produção e interesse econômico, além da obrigação ética dos profissionais e produtores.

Referências bibliográficas

- BRASIL. **Constituição** (1988). Constituição da República Federativa do Brasil: promulgada em 5 de outubro de 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm>. Acesso em: 03 maio 2019.
- BRASIL. **Lei n. 8.171**, de 17 de janeiro de 1991. Dispõe sobre a política agrícola. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L8171.htm>. Acesso em: 03 maio 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 56, de 6 de novembro de 2008. Brasília: **D.O.U. Diário Oficial da União**. Publicado no Dou de 07 de novembro de 2008 - Seção 1
- BROOM, D.M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, London: v.142,p.524-526, 1986.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Define e caracteriza crueldade, abuso e maus-tratos contra animais vertebrados, dispõe sobre a conduta de médicos veterinários e zootecnistas e dá outras providências. Resolução n. 1236, de 26 de outubro de 2018. Disponível em: <<http://portal.cfmv.gov.br/lei/download-arquivo/id/1096>>. Acesso em: 03 maio 2019
- DUKES, H.H. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11ª edição. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1996.
- FERREIRA, J.C.P. Impactos da Biotecnologia no Bem-Estar Animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL, II, 2010, Belo Horizonte (MG), **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife-PE, v. 13, suplemento 1, p. 64 - 69, agosto, 2010
- MELLOR, D.J. 2016. Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “A LifeWorth Living”. **Animals** 6: 1-20.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE ANIMAL. Disponível em: <<http://www.oie.int/es/bienestar-animal/>>. Acesso em: 30 abril 2019
- SANTOS, E. O. Metabolismo do Estresse: impactos na saúde e na produção animal. Disciplina Bioquímica do Tecido Animal no programa de pós-graduação em ciências veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 1-7, 5 maio 2005. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/estresse.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2019.

Qualidade do sêmen e resultados em programas de IATF em bovinos

Érikis Nogueira^{1,2}

eriklis.nogueira@embrapa.br

Camile Sanches Silva²

Juliana Correa Borges Silva¹

Wagner Rodrigues Garcia²

Nathália Albaneze Anache²

Karine Casanova Silva²

José Roberto Potiens³

Eliane Viana da Costa e Silva²

Abstract: The ability to predict male fertility is highly desirable for bulls used in AI. Timed artificial insemination (TAI) represents a breakthrough in the use of AI in Brazil and other countries. Numerous causes contribute to the wide range of results and/or unsatisfactory pregnancy rates in TAI programs, highlighting the factors inherent in the bovine female in addition to several factors inherent to quality of semen used, and in regarding to it, differences reported in fertility could be attributed to variation in sperm qualitative characteristics. Consequently, the success of bovine AI programs largely depends on the use of good quality semen. When only high fertility bulls are used, better conception rates are achieved, reducing costs of reproductive programs. Thus, some authors have shown that semen used in TAI has great impact on pregnancy rates, and various biomarkers of sperm quality are required to predict the fertility of bull spermatozoa. We will discuss results in Brazilian TAI programs, and different methods of post thaw semen evaluation and relations with the P/AI cows to identify the candidate predictors of conception rate.

Keywords: fertility prediction, CASA, flow cytometer.

Palavras-chave: predição de fertilidade, Casa, citometria de fluxo.

Introdução

O uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) promoveu o crescimento da comercialização de sêmen no Brasil, onde os segmentos de corte e leite comercializaram juntos, 13.831.149 doses em 2018, conferindo um incremento de 14,1% nas vendas em relação a 2017. Embora em ascensão, apenas 13,1% do rebanho brasileiro de matrizes foi inseminado no último ano [1]. Destaca-se ainda o crescimento nas exportações deste setor, com a comer-

¹ EMBRAPA Pantanal / Gado de Corte.

² Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. GERA- MS Grupo de estudos e pesquisas em reprodução animal do Mato Grosso do Sul.

³ SELEON Biotecnologia.

cialização de 418.988 doses, evidenciando uma elevação de 22,5% nas vendas, com liderança da raça Girolando nesta categoria.

Apesar dos evidentes avanços na produção de gado de corte e leite conferidos pelo desenvolvimento comercial da IATF, a taxa de prenhez média esperada é estimada entre 40 a 50%. Diversos fatores podem estar relacionados a esses resultados, destacando-se aqueles inerentes à fêmea, como o anestro pós-parto e a baixa condição corporal no início dos protocolos, além de outros fatores inerentes à qualidade do sêmen utilizado nos programas, tais como os padrões de movimento espermático, integridade de membrana plasmática e dose inseminante praticada.

É evidente que o sêmen utilizado na IATF tem grande impacto sobre a taxa de prenhez, ainda que se utilizem aqueles avaliados em testes laboratoriais simples e que atendam aos padrões mínimos de qualidade [2]. Dessa forma, a avaliação espermática laboratorial tem o intuito de analisar o potencial de fertilidade de um indivíduo, determinar e estabelecer características confiáveis que possam ser utilizadas como indicadores de fertilidade [3].

Rotineiramente, a qualidade seminal é estimada por avaliações subjetivas de motilidade, proporção de espermatozoides morfológicamente normais e concentração de espermatozoides por dose [4]. Entretanto, esses métodos podem ser insuficientes para determinar a fertilidade das amostras, uma vez que não são avaliados os processos necessários para a fecundação, tais como a capacitação e a reação acrossômica, e que nenhum teste laboratorial utilizado isoladamente pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen [5].

Além dos atributos qualitativos do sêmen, um aspecto importante para a melhoria do poder correlativo dos bioensaios com espermatozoides *in vitro* para a predição da fertilidade a campo envolve o uso da modelagem estatística, com grandes conjuntos de dados de fertilidade [6].

Resultados gerais em IATF e diferença de prenhez entre touros

Em experimento conduzido recentemente pelo GERA – MS (dados não publicados), 7.139 vacas Nelore na região do Cerrado de Mato Grosso do Sul, foram submetidas a protocolos de IATF e avaliadas de acordo com o escore de remoção de tinta da cauda (ESCT) e tratamento com GnRH no momento da IATF nos animais que apresentavam fraca expressão ou não expressão de cio (ESCT 1 e 2).

Neste experimento, as variáveis: inseminador ($P= 0,5657$), tipo de implante utilizado (CIDR®, DIB®, ou FERTILCARE®; $P= 0,9697$), uso de implante (novo, reutilizado ou monodose; $P= 0,5670$) não apresentaram efeitos na prenhez de IATF (P/IA), porém touros ($n=26$; $P= 0,02$; Fig 1), ESCT ($P<0,0001$), categoria (pluríparas, primíparas ou novilhas; $P<0,0001$), e tratamento (Controle, GnRH no momento da IATF, ou cio; $P= 0,0426$) foram os parâmetros que apresentaram efeitos na P/IA.

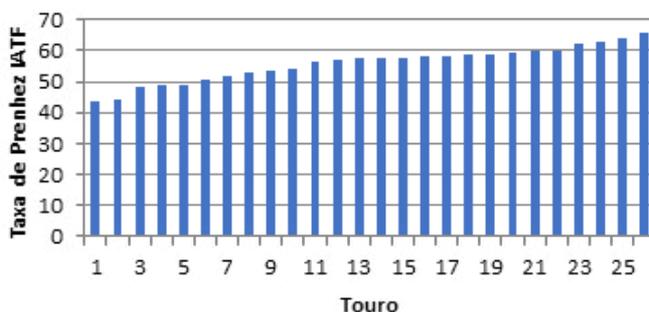


Figura 1 - Efeito do Touro sobre a Taxa de prenhez de vacas de corte submetidas a protocolos de IATF.

Em outro estudo, com 1542 vacas Nelore inseminadas com o mesmo protocolo de IATF, doses de sêmen de 20 touros (10 Angus e 10 Nelore), foram igualmente distribuídas em duas fazendas, pertencentes a dois biomas distintos (Pantanal e Planalto), e os resultados de P/IA foram diferentes entre raças ($P= 0,037$) e entre local ($P= 0,003$), demonstrando que o local apresenta forte influência nos resultados de prenhez de IATF (Tab.1). Também o efeito touro foi pronunciado, com P/IA variando de 22,9 a 59,4% ($P= 0,016$).

Tabela 1 -Taxas de prenhez de vacas zebuínas submetidas à IATF, de acordo com a raça e a local.

	Raça			Local		
	Angus	Nelore	P	Pantanal	Cerrado	P
N	790	759	-	892	657	-
P/IA, %	47,59	53,88	0,037	45,85	56,16	0,003

Com o intuito de promover maior segurança nos resultados de IATF, a CRV Lagoa criou um índice denominado IFERT™, determinado a partir de uma base de dados com mais de 200.000 IATFs e 814 touros que, através de avaliação estatística, é capaz de prever o potencial de fertilidade de reprodutores de corte dentro da IATF e dessa forma, os classificam em quatro níveis: inferior, regular, superior e elite.

Em outro experimento conduzido pelo GERA – MS, touros classificados pelo IFERT™ foram selecionados e seus índices de fertilidade correlacionados com os resultados das avaliações seminais realizadas por meio dos testes convencionais, análise computadorizada (CASA) e citometria de fluxo. Para esse estudo, foram adicionados dados retrospectivos de prenhez de 39.434 vacas inseminadas em tempo fixo, utilizando sêmen de 28 touros Nelore e Angus de diferentes classes de fertilidade (inferior, regular, superior e elite).

As taxas de prenhez ($P<0,001$) e nota do IFERT ($P<0,001$) diferiram por categoria, e foram respectivamente de: inferior: 34,74% e -8,94; regular: 45,85% e -1,43; superior: 50,83% e 3,60; elite: 57,68% e 8,323, demonstrando uma evidente diferença na fertilidade de acordo com as pontuações do IFERT (Fig. 2).

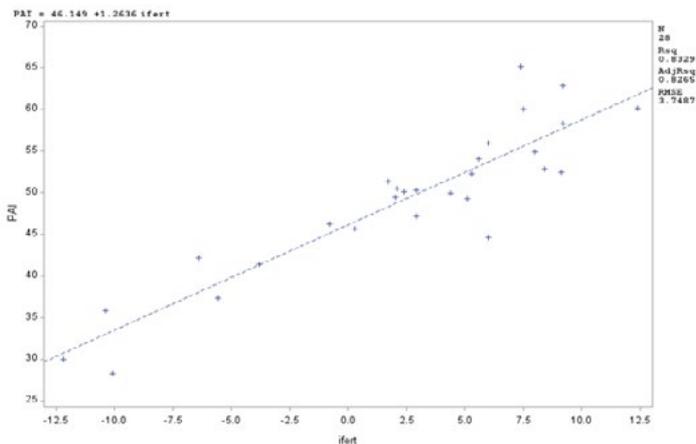


Figura 2- Relação entre a pontuação dos touros pelo sistema IFERTTM e a P/IA de vacas de corte submetidas a protocolo de IATF.

Diferenças na taxa de prenhez de acordo com a categoria da vaca e com a classe de fertilidade do touro foram observadas (Fig. 3), mostrando diferenças entre touros classificados como Elite ou Inferior em todas as categorias avaliadas.

Além da categoria, o escore de condição corporal (ECC) também exerce influência direta sobre a fertilidade, uma vez que os nutrientes são primeiramente direcionados para a manutenção da vaca e do bezerro e, somente após essas supressões é que são destinados para a reprodução das espécies. Apesar disso, os dados mostraram que os touros “Elite” mantiveram sua alta taxa de prenhez independente do ECC, mas este comportamento foi mais evidente em vacas de menor ECC (Fig. 4).

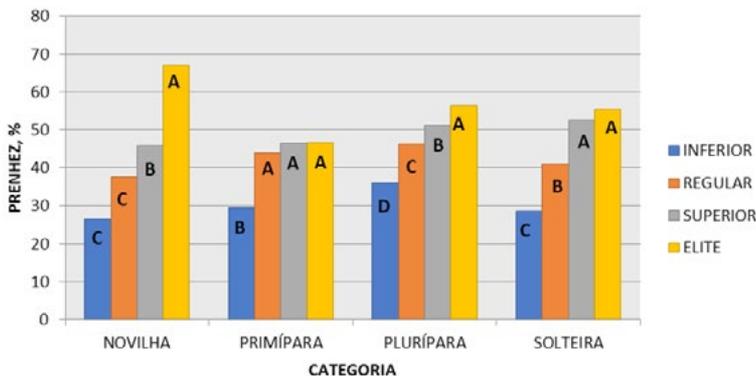


Figura 3- Taxa de prenhez de diferentes categorias de vacas, inseminadas em tempo fixo, com sêmen de touros de quatro classes de fertilidade.

(Letras iguais na mesma categoria de vaca não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)).

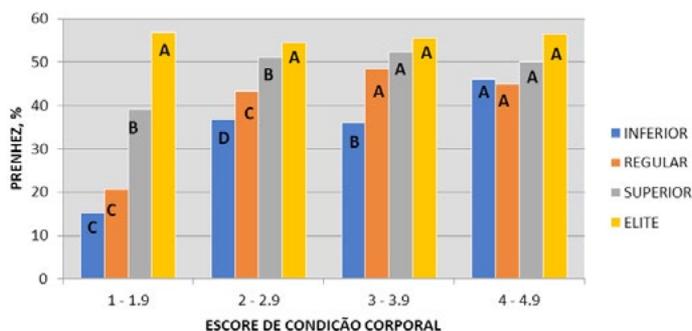


Figura 4 - Taxa de prenhez de acordo com o ECC de vacas, inseminadas em tempo fixo, com sêmen de touros de quatro classes de fertilidade.

(Letras iguais na mesma categoria ECC não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)).

Avaliação laboratorial e correlações com fertilidade

Numerosos são os estudos que buscam correlacionar avaliações laboratoriais de sêmen com taxas de prenhez de IA ou IATF, e até mesmo buscar prever a fertilidade futura do reprodutor, fato este que será cada vez mais demandado tendo em vista o aumento da utilização de touros jovens selecionados através de avaliações genômicas, sobretudo em gado de leite, mas também em gado de corte.

Os parâmetros rotineiramente utilizados para avaliação de sêmen e busca de preditores de fertilidade podem ser observados na Fig. 5 adaptada de [7], que demonstra as principais avaliações das funções do espermatozoide.

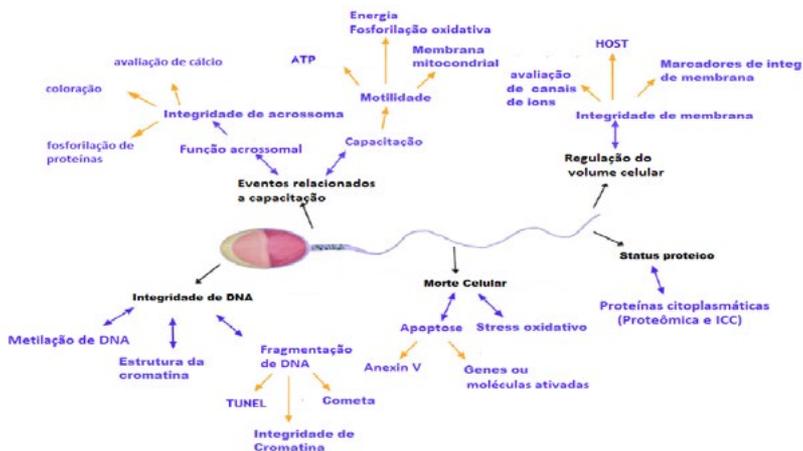


Figura 5 - Principais funções dos espermatozoides. Adaptado de [7].

Nota: ICC (imunohistoquímica); HOST (teste hiposmótico); TUNEL (método de marcação de “nicks” por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase).

Experimentos realizados pelo GERA-MS, com dados laboratoriais de qualidade espermática, oriundos de análises convencionais e computadorizadas de sêmen (CASA- realizadas pelo sistema IVOS 12.3 (Hamilton-Thorne Bioscience®, Beverly, MA, USA)), avaliando as taxas de prenhez considerando a partida utilizada e touros Angus e Nelore, encontramos vários parâmetros que se correlacionam com fertilidade de IATF (VCL-CASA: $P= 0,02$, $R^2= 0,22$; linearidade-CASA: $P= 0,05$, $R^2= 0,11$; concentração espermática: $P= 0,028$, $R^2= 0,130$, Fig.6), mas geralmente com coeficientes de determinação baixos, o que pode não caracterizar forte poder de predição.

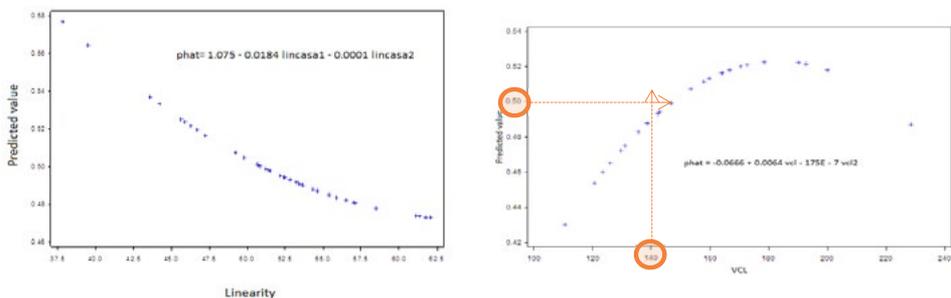


Figura 6- Valor predito para da taxa de prenhez em função da Linearidade no sêmen de touro pós descongelamento ($P= 0,05$; $R= 0,11$) e Valor predito para da taxa de prenhez em função da VCL do sêmen de touro pós descongelamento ($P= 0,02$; $R= 0,107$).

No estudo citado anteriormente (com 28 touros classificados pelo IFERT™), para a determinação da qualidade espermática, três amostras de cada touro foram utilizadas e avaliadas quanto aos testes de motilidade e vigor no descongelamento, concentração e análise morfológica, teste hiposmótico (HOS), teste de termo resistência rápida (TRT), análise computadorizada de sêmen (CASA) e citometria de fluxo. Os resultados foram submetidos à análise multivariada de dados por meio da regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS), e a análise revelou alguns componentes com maiores correlações com a taxa de prenhez. Os modelos apresentaram respectivamente os seguintes R^2 , e fatores de importância, respectivamente: análises convencionais: 0,154 (motilidade pós TTR e defeitos maiores); CASA: 0,380 (motilidade progressiva, VAP e VSL), e citometria de fluxo: 0,259 (MitoTracker Green, integridade de membrana (Annexin V e Alexa Fluor 488 + PI) e integridade acrossomal (FITC/PNA). Entretanto, o modelo completo apresentou o melhor coeficiente de determinação, incluindo seis parâmetros, com avaliações de citometria e CASA ($R^2= 0,458$), demonstrando que modelos com maior números de parâmetros podem melhorar a predição de fertilidade em programas de IATF. Tais resultados carecem ainda de validação a campo.

Olhando Adiante

Sabe-se que o comprimento da bainha mitocondrial (PI) da cauda do espermatozoide correlaciona-se com características reprodutivas de camundongos, peixes e aves [8,9]. Em

bovinos/suínos foi hipotetizado que, à medida que a bainha mitocondrial aumenta, o aumento da produção de energia / metabolismo dos espermatozoides afeta a fertilidade.

Neste estudo, foi avaliada a PI de touros Angus e Nelore utilizados em IATE, com corante Aggresome (Fig. 7), e avaliado em microscopia de fluorescência para determinar se o comprimento da PI pode ser usado como um biomarcador de fertilidade. Foi encontrada diferença no comprimento da bainha mitocondrial de espermatozoide entre touros individuais e raça (Nelore: 9,74 μm vs Angus= 9,33 μm , $P < 0,0001$) e também correlação positiva entre o comprimento da PI e as taxas de prenhez (0,38, $P = 0,0006$; Fig. 8), demonstrando influência na fertilidade[10].

Também correlações entre PI e parâmetros de análise computadorizada (CASA) foram positivas e significativas (motilidade total: 0,261, $P = 0,045$; Motilidade progressiva: 0,311, $P = 0,016$), e negativa com Defeitos maiores (0,215; $P = 0,043$). Estas e outras correlações descobertas aqui poderiam contribuir para melhorar a seleção de touros para uso em IATE, auxiliando a produtividade geral dentro da indústria inseminação artificial em bovinos.

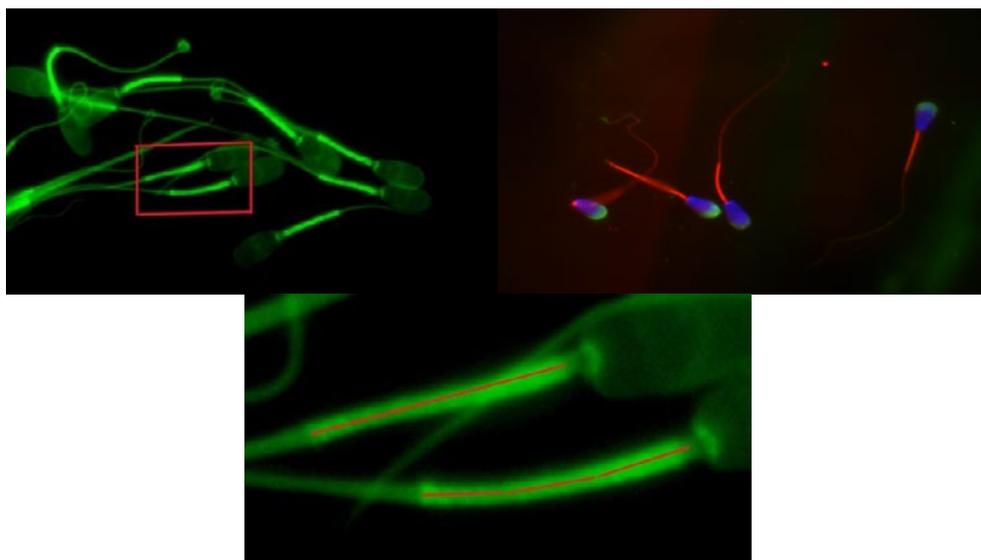


Figura 7- Coloração e avaliação do comprimento de PI de espermatozoides bovinos corados com Aggresome (ProteoStat Aggresome Detection Kit), DAPI e PNA, em microscopia de Fluorescência (Nikon Eclipse 800 e MetaMorph Imaging Software).

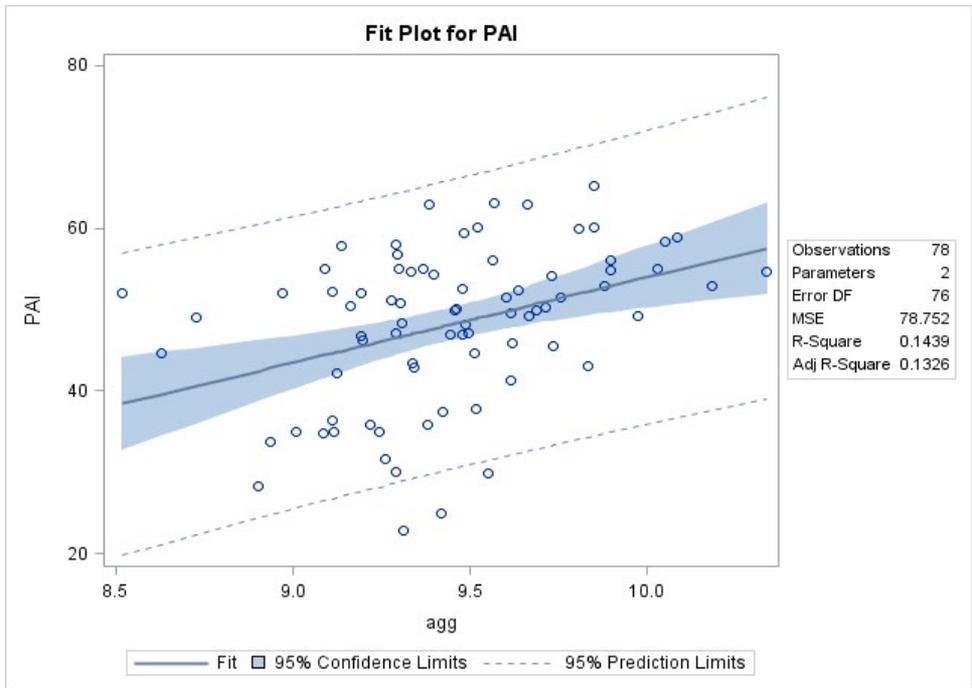


Figura 8- Relação entre Taxa de prenhez de IATF e comprimento da Bainha mitocondrial (n= 78 touros).

Com a finalidade de melhorar a eficiência da produção de carne e leite, faz-se necessário identificar e eliminar touros com anormalidades espermáticas e qualidade inaceitável de sêmen. Além das avaliações de sêmen, também seria interessante identificar mutações deletérias e raras que afetam adversamente a qualidade do espermatozoide e a capacidade de transmitir alto potencial de desenvolvimento a embriões e problemas de fertilidade a progênie. As mutações são transmitidas para a progênie através dos pais, e a maioria das mutações de perda de função (LOF) produz perda embrionária devido à falha na implantação ou desenvolvimento. Estas perdas na prenhez não são facilmente percebidas, manifestando-se como defeito genético. A transmissão de alguns destes alelos de LOF pode ocorrer, em níveis elevados, em uma população pelo uso extensivo de IA, pelo fato dos touros possuírem essa mutação e, a mesma ainda não ter sido identificada nesses animais. Ressalta-se o fato de que poucos touros têm o genoma inteiro sequenciados (menos de 4000 em todo o mundo) [11,12]. No Quadro 1, podemos observar haplótipos ou mutações que podem apresentar efeitos deletérios na reprodução, por promoção de mortalidade embrionária.

Quadro 1- Haplótipos ou mutações responsáveis por mortalidade embrionária descobertos por scanning de Genoma para haplótipo ou por insuficiência de genótipo homozigoto.

Breed	Haplotype	OMIA ¹ 9 913 ID	Gene(s) ²	Frequency (%)	BTA ³	Region (bp)
Ayrshire ⁴	AH1	1934	<i>UBE3B</i>	13.00	17	65 921 497
	AH2	2134	<i>RPAP2</i>	9.80	3	51 267 548
Brown Swiss ⁴	BH1	1825	–	6.67	7	42 811 272 to 47 002 161
	BH2	1939	<i>TURD1</i>	7.78	19	11 063 520
Holstein – United States ⁴	HH0	151	<i>FANCI</i>	2.76	21	21 184 869 to 21 188 198
	HH1	1	<i>APAF1</i>	1.92	5	63 150 400
	HH2	1823	–	1.66	1	94 860 836 to 96 553 339
	HH3	1824	<i>SMC2</i>	2.95	8	95 410 507
	HH4	1826	<i>GART</i>	0.37	1	1 277 227
	HH5	1941	<i>TFB1M</i>	2.22	9	93 223 651 to 93 370 998
	HHC	1340	<i>SLC35A3</i>	1.37	3	43 412 427
	HCD	1965	<i>APOB</i>	2.50	11	77 958 995
	BY	151	<i>FANCI</i>	3.60	21	20 200 000 to 22 300 000
	HH1	1	<i>APAF1</i>	2.60	5	61 400 000 to 66 200 000
Holstein – France ⁵	HH2	1823	–	1.70	1	93 000 000 to 97 400 000
	HH3	1824	<i>SMC2</i>	2.50	8	94 000 000 to 96 500 000
	HH4	1826	<i>GART</i>	3.60	1	1 900 000 to 3 300 000
	HH5/HH6	1340	<i>SLC35A3</i>	3.90-4.60	3	45 800 000 to 52 600 000
	HH13	1836	–	3.70	18	56 400 000 to 58 400 000
	05-1351/05-1476	1907	–	1.60-2.02	5	106 713 645 to 114 405 063
	07-501	1909	–	1.92	7	34 633 456 to 36 127 497
	08-1276/08-1301/08-1326/08-1351	–	–	1.48-1.54	8	83 888 935 to 89 859 523
	11-926/11-976/11-1001/11-1026	1910	–	1.35-1.37	11	55 345 639 to 63 759 322
	19-151	1911	–	1.95	19	13 154 786 to 14 478 389
Holstein – New Zealand ²	21-276/21-301/21-326	–	–	1.94-2.05	21	20 477 690 to 24 844 501
	–	2036	<i>TF1</i>	3.52	11	102 485 897 to 102 515 271
	–	2037	<i>RABGGTB</i>	2.13	3	69 316 067 to 69 322 906
	–	2038	<i>RNF20</i>	1.82	8	92 911 255 to 92 935 750
Jersey – United States ⁴	JH1	1697	<i>CWC15</i>	12.10	15	15 707 169
	JH2	1942	–	1.30	26	8 812 759 to 9 414 082
Jersey – New Zealand ⁷ Montbeliarde ⁶	–	2035	<i>ORFC1</i>	6.59	26	24 700 354 to 24 737 868
	MH1	1827	<i>SHBG</i>	9.00	19	27 600 000 to 29 400 000
	MH2	1828	–	7.00	29	27 900 000 to 29 100 000
	MH3	1842	<i>SLC37A2</i>	5.10	2	31 500 000 to 32 800 000
	MH5	1844	–	7.10	6	73 300 000 to 74 400 000
	MH6	1845	–	2.60	7	80 100 000 to 81 700 000
	MH8	1847	–	3.50	13	76 400 000 to 77 600 000
	NH1	1851	–	1.80	24	38 100 000 to 39 200 000
Normande ⁵	NH2	1852	–	3.80	1	145 700 000 to 146 800 000
	NH5	1829	–	1.90	7	3 600 000 to 4 600 000
	NH6	1855	–	1.90	15	59 800 000 to 61 100 000
	A27	1901	<i>RNASEH2B</i>	6.50-16.00	12	20 101 696 to 20 755 193
	Nordic Red Cattle ⁹	–	<i>BTRD9, GLO1, DNAH8</i>	–	23	12 291 761 to 12 817 087
	Angus ¹⁰	–	–	–	–	–
Fleckvieh ¹¹	ANH1	–	–	2.30	1	27 786 985 to 29 095 768
	ANH2	–	–	7.60	4	82 467 969 to 83 996 686
	ANH3	–	–	2.30	8	62 040 920 to 63 000 189
	ANH4	–	–	3.20	12	59 989 293 to 61 258 655
	ANH5	–	–	3.80	15	82 317 986 to 83 144 172
	ANH6	–	–	4.50	17	46 514 063 to 47 462 424
	ANH7	–	–	4.40	29	43 043 207 to 44 243 444
	FH1	1957	–	2.90	1	1 668 494 to 6 187 555
Belgian Blue ⁷	FH2	1958	<i>SLC2A2</i>	4.10	1	97 239 973
	FH3	1959	–	3.30	10	26 929 817 to 35 479 280
	FH4	1960	<i>SUGT1</i>	3.30	12	11 131 497
	–	2042	<i>EXOSC4</i>	1.33	14	1 947 198 to 1 949 074
	–	2043	<i>MED22</i>	1.15	11	104 305 076 to 104 311 650
	–	2039	<i>MYH6</i>	4.99	10	21 325 414 to 21 344 965
–	2041	<i>RPIA</i>	1.89	11	47 220 160 to 47 254 704	
–	2040	<i>SNAPC4</i>	5.13	11	103 884 749 to 103 905 548	

Herança mendeliana em vários animais. Taxonomia ID-9913- representa bovino

Múltiplos genes listados representam uma deleção

Cromossomo *Bos taurus*

(Adaptado [12])

A identificação destas mutações, apesar de difícil e onerosa, deve ser buscada nos programas de Inseminação Artificial, com identificação de animais com baixos resultados de prenhez e geralmente pior qualidade seminal, que pode ser ocasionado por LOFs.

Considerações Finais

Enfatizada a importância da qualidade do sêmen para a melhoria da eficiência reprodutiva dos processos de inseminação artificial, a avaliação de sêmen é importante para identificar amostras com maior potencial fertilizante. A utilização de bancos de dados mais robustos, pode melhorar a predição de fertilidade em amostras de sêmen utilizadas em IATF.

Ferramentas genômica e identificação de animais com baixa fertilidade podem contribuir, para retirada de animais com mutações deletérias dos rebanhos.

Referências bibliográficas

- [1] ASBIA. Associação Brasileira de Indústrias de Inseminação Artificial. Index ASBIA. Uberaba, 2019. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/certificados/index/>. Acesso em: 10 de jan. 2019.
- [2] ANDERSSON, M.; TAPONENA, J.; KOSKINENA, E.; DAHLBOMB, M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen–thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, p.1583-1588, 2004.
- [3] AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, H.P. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **J. Androl.**, v.14, p.397-405, 1993.
- [4] ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; PERES, K. R.; NEVES, L. C. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. Londrina: [s.n.], p.157-164, 2006.
- [5] ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta. Sci. Vet.** v. 31, p.230-231, 2003.
- [6] UTT, M. D. Prediction of bull fertility. **Anim. Reprod. Sci.** v. 169, p. 37-44, 2016.
- [7] PAYAN-CARREIRA, R.; FONTBONNE, A.; MIR, F.; BORGES, P. Molecular markers in sperm analysis. In: success in artificial insemination - quality of semen and diagnostics employed. Intech Open, v 6: 93-115, 2013. Doi: 10.5772/52231.
- [8] ALAVI, S.M.H.; DROZD, B.; HATEF, A.; FLAJŠHANS, M. Sperm morphology, motility, and velocity in naturally occurring polyploid European weatherfish (*Misgurnus fossilis* L.). **Theriogenology**, v.80, p. 153–160, 2013.
- [9] FISHER, H. S.; JACOBS-PALMER, E.; LASSANCE, J.M.; HOEKSTRA, D H. E. The genetic basis and fitness consequences of sperm midpiece size in deer mice. **Nature Commun.** v.7 , p.1–9, 2016.
- [10] NOGUEIRA, E.; SANCHES, C.; COSTA E SILVA, E.V.; MENDES, A.; DODE, M.A.N.; WILEY, G.; KERNS, K.; SUTOVSKY, P. Identification of seminal parameters predictive of conception rates in *Bos indicus* cows submitted to timed-artificial insemination- partial results. **Anim. Reprod.**, v.15, n.3, p.463, 2018.
- [11] TAYLOR, J.F.; SCHNABEL, R.D.; SUTOVSKY, P. Identification of genomic variants causing sperm abnormalities and reduced male fertility. **Anim. Reprod. Sci.** v. 194, p:57-62, 2018.
- [12] TAYLOR, J.F.; SCHNABEL, R.D.; SUTOVSKY, P. Review: Genomics of bull fertility. **Animal**, v.12. s.1, p-172-183, 2018.

Agradecimentos: EMBRAPA Cenargen (Dra Margot Alves Nunes Dode; Andriele Thainar Mendes Cunha), UFMS (Prof Breno Fernandes Barreto Sampaio), CAPES- O presente trabalho foi realizado em parte com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Sêmen suíno no Brasil: biotecnologias e mercado

Carlos Henrique Cabral Viana¹
cabralviana@hotmail.com

Mariana Groke Marques²
Pedro Nacib Jorge Neto³

Abstract: The swine industry in Brazil and worldwide has been highlighted by the efficient animal protein production capacity. This is supported by the selection pressure, combined with the ease of dissemination of genetic material around the world. The technique of artificial insemination has been the stepping stone for the rapid genetic gains achieved in the past twenty five years. Scientific advances in the field of evaluation, processing and swine semen conservation, as well as in the techniques of insemination itself, allowed an increase in the number of inseminating doses per ejaculate of superior sires and, consequently, the number of offspring of genetically superior breeding animals. Caring for the welfare, nutrition and sanity of boars is fundamental to improving the quality of ejaculates and preservation of inseminating doses. The technology embraced by semen centers in the areas of automated semen analysis parameters data collection, sire traceability has contributed to improve dramatically the decision-process inside the center this guaranteeing the quality of the doses that are offered to the producers. Improved technologies applied to semen media and the investigation of the effects of bacterial contamination, contributed to increasing the viability of the inseminating doses. Today, more than 99% of the inseminations are performed with cooled semen, due to the better fertility over frozen semen which remains viable albeit difficult in its logistics. Frozen semen today is being used to store particular strains of genetic materials by genetic companies or transfer genetic material over long distances when live animal are prohibited to enter. Technologies such as intrauterine AI (IUAI), AI synchronization and fixed-time AI (FTAI) make it possible to reduce the number of spermatozoa and inseminations, without reducing the reproductive results, with refrigerated or frozen semen.

Keywords: Semen; swine; biotechnology; market; Brazil.

Palavras-chave: Sêmen; suíno; biotecnologia; mercado; Brasil.

Introdução

A suinocultura tem se destacado no cenário mundial como uma atividade com alto potencial para produção de carne em curto intervalo de tempo. As características da espécie que contribuíram para este destaque foram a alta fertilidade e a prolificidade, aliadas a um rápido crescimento, eficiência alimentar e rendimento de carcaça, todas melhoradas pela alta pressão de seleção e um curto intervalo entre gerações.

¹ FMV-PUCMinas Poços de Caldas.

² CNPSA-EMBRAPA.

³ FMVZ-USP.

As biotecnologias da reprodução, particularmente a inseminação artificial (IA), tiveram um papel fundamental no melhoramento genético de suínos, aumentando a pressão de seleção e facilitando a difusão de material genético, seja em uma dimensão continental ou entre granjas relativamente próximas, mas sanitariamente isoladas.

A suinocultura moderna por se tratar de uma criação de animais em regime de confinamento, tem uma alta exigência sanitária. Além disso, é caracterizada por ser uma atividade de alto investimento, sendo o maior custo a alimentação (baseada em milho e soja, muito valorizados no mercado internacional) e com baixa margem de lucro, podendo-se assim classificá-la como uma atividade de alto risco. Neste contexto, manter um bom estado sanitário dos animais aumenta a lucratividade do rebanho, uma vez que diminui as perdas relacionadas a animais mortos e doentes, melhorando assim a margem de lucro. Além da sua função fundamental na difusão de material genético, a IA corrobora com a manutenção do status sanitário do rebanho, uma vez que tem um risco muito mais baixo de transmissão de agentes patogênicos, quando comparada à aquisição de animais.

Portanto, a IA tem contribuído para rentabilidade e o progresso da atividade no Brasil e no mundo. Basicamente, os avanços na biotecnologia relacionada ao sêmen suíno têm visado uma maior pressão de seleção, explorando melhor os reprodutores com maior diferencial de seleção, aumentando o número de filhos destes animais.

Isso tem sido possível pela melhoria da qualidade e produtividade das doses de sêmen produzidas. A tecnificação das centrais produtoras de sêmen nas partes de ambiência para alojamento de machos (levando em conta as questões de bem-estar e sanitárias), nos procedimentos de coleta (com manequins de coleta automatizados), de análise de sêmen (com sistemas de avaliação de motilidade, morfologia e viabilidade celular automáticos) e da melhoria e praticidade dos novos sistemas de envase, refrigeração e transporte das doses, são fatores que corroboram para a produção de maior número de doses por ejaculado, com a diminuição do número de espermatozoides por dose inseminante.

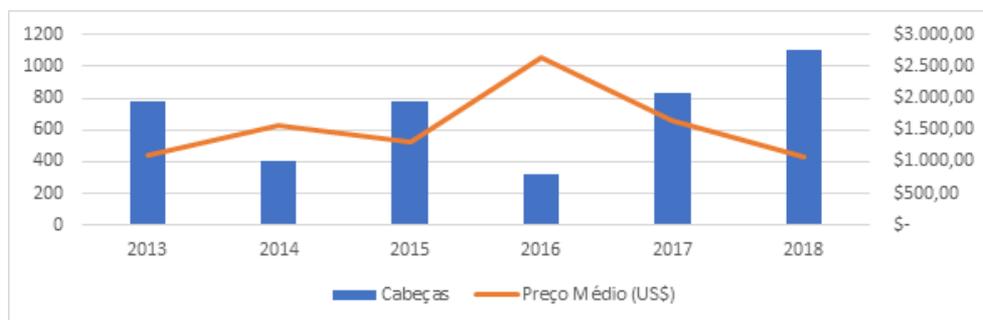
Associadas às mudanças nas doses inseminantes, surgiram biotécnicas complementares, com o objetivo de garantir o desempenho reprodutivo em tempos de mão de obra escassa. Entre elas estão a IA intrauterina (IAUI), sincronização da IA e a IA em tempo fixo (IATF), além das técnicas de congelamento de sêmen.

Diante do exposto, esta revisão objetiva revisar os avanços da biotecnológicos relacionados ao sêmen suíno e sua aplicação no Brasil.

O mercado brasileiro da inseminação em suínos

A suinocultura é o segmento na produção animal que, após a criação de perus, mais faz uso da inseminação artificial, em relação ao percentual de fêmeas inseminadas. Diferentemente da bovinocultura, não há informações de mercado sobre o volume de sêmen suíno importado pelo Brasil, nem da quantidade de inseminações realizadas anualmente com sêmen fresco.

Tabela 1. Importação de reprodutores suínos ao Brasil em número de cabeças e valor médio de aquisição por reprodutor.



Fonte: Comex Stat - MDIC

Através da tabulação de estatísticas de importações oficiais de sêmen e de cateteres de inseminação disponibilizados para consulta pública pela Receita Federal, através do Portal Siscomex e do Comex Stat do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços, foi possível observar que no ano de 2016, foram importadas 2.603 doses ao custo de U\$59.519,22, oriundas dos Estados Unidos (44,8%), Suíça (44%) e Holanda (11,2%). Em 2017 foram importadas 2.754 doses ao custo de U\$40.472,78, oriundas do Canadá (43,6%), Espanha (43,6%) e da Holanda (16,1%). Em 2018, foram importadas o total de 2.083 doses no montante de U\$98.226,74 e oriundas da Suíça (45,6%), Estados Unidos (20,7%) e da França (13,7%).

Em relação aos cateteres, no período de outubro de 2017 e setembro de 2018, foram comercializados (importação e fabricação nacional) 12,7 milhões de unidades. Considerando o plantel brasileiro ajustado de 1,802 milhão de matrizes em criações tecnificadas no Brasil em 2018 (1,72 milhão de matrizes em 2015 segundo a ABCS, acrescido do aumento de produção de carne suína de 4,8% entre 2015 e 2018 segundo a ABPA) e considerando 2,5 ciclos (partos por porca por ano) com 3 inseminações realizadas por ciclo, pode-se estimar que 94,2% do plantel brasileiro foi inseminado em 2018.

Durante o triênio 2016-2018 foram importados 2.251 reprodutores suínos no valor total de U\$3.417.002,00 e no valor médio de U\$1.517,99 por reprodutor. Houve crescimento linear no volume importado, assim como redução linear nos custos por reprodutor, sendo importados 332 reprodutores em preço médio de U\$2.630,43 em 2016; 831 reprodutores no valor médio de U\$1.661,93 em 2017; e 1.098 reprodutores no valor médio de R\$1.082,83 em 2018 (Tabela 1).

Biotechnologia aplicada ao sêmen suíno no Brasil

Tanto no Brasil, como em todos os outros países onde a suinocultura é bastante tecnificada, utiliza-se o sêmen líquido refrigerado, em função do alto volume e número de espermatozoides requeridos para garantir boas taxas de parição e um alto número de leitões nascidos por parto.

Fatores que afetam a qualidade do sêmen refrigerado

Dentre os fatores que afetam a produção e a qualidade do sêmen, podemos citar o ambiente de alojamento, alimentação e manejo. Normalmente, tudo o que afeta a condição metabólica do reprodutor, tem potencial de afetar a qualidade do ejaculado e a conservação do sêmen [11].

Dos fatores ambientais, o estresse térmico parece ter maior influência sobre a qualidade do sêmen. Reprodutores expostos a 34,5°C por 8 horas e 31,0°C por 16 horas, diariamente, por 90 dias, tiveram menor motilidade espermática e maior patologia espermática, com consequente redução da fertilidade, em comparação com o controle, mantidos a 23,0°C [16]. Além disso, não apenas o estresse térmico constante, mas também as flutuações de mais de 10°C (25–35°C) entre o dia e a noite, e uma umidade relativa do ar acima de 90%, podem diminuir a produção e a qualidade de espermatozoides [15].

O processamento e procedimentos para a conservação do sêmen até a inseminação, são de extrema importância, especialmente, em relação ao cuidado sanitário. As grandes centrais de sêmen brasileiras, seguindo os padrões internacionais, estão implementando sistemas de controle de qualidade em cada passo, desde a coleta até o armazenamento, incluindo temperatura e tipo de diluente [12,13,14].

Os cuidados para evitar ou minimizar a contaminação bacteriana do sêmen são fundamentais para sua conservação e para evitar infecções uterinas pós cobertura. Neste contexto, a higiene na colheita de sêmen é fundamental, pois compromete toda continuidade dos resultados. A automação da colheita tem sido introduzida na maioria das grandes centrais brasileiras. Este sistema inclui, a abertura pneumática de portas de acesso e identificação eletrônica do cachaco e aumento do número de ejaculados por tempo de trabalho, sem diminuição na qualidade dos ejaculados [17].

A contaminação bacteriana é bastante deletéria para a qualidade do sêmen, seja pela ação direta ou de toxinas, causando aglutinação de espermatozoides e reduzindo a motilidade [18]. Outros efeitos atuam na longevidade do sêmen durante o armazenamento e na capacidade fecundante e, consequentemente, nos resultados reprodutivos [19].

Em relação ao tempo de conservação das doses, a maioria dos diluentes no mercado fornece uma manutenção da viabilidade espermática durante 72 horas de armazenamento, embora a motilidade e a fertilidade diminuam quando o sêmen é armazenado durante mais de 4 dias [14, 21].

Sêmen congelado

Na atualidade, estima-se que menos de 1% das inseminações, no mundo, sejam realizadas com sêmen congelado. No entanto, a utilização do sêmen congelado tem sido fundamental para a transferência de material genético entre países distantes [22].

Em termos gerais, entre 1 e 3 bilhões de espermatozoides congelados e descongelados por IA são utilizados em um volume de 20 a 80 ml. Taxas de parição de 20 a 92,7% e tamanhos de leitegada variando de 5,7 a 13 leitões foram obtidos [6, 29].

No entanto, os resultados usando sêmen congelado ainda são inferiores àqueles obtidos usando sêmen refrigerado. O uso combinado de sêmen congelado e IAUI, sem [22] ou com [23] indução da ovulação [24] aponta para a possibilidade de aplicar esta tecnologia reprodutiva em condições de campo com consideráveis benefícios econômicos.

Inseminação artificial intrauterina

A IA em suínos tem sido realizada por mais de 40 anos no Brasil, tradicionalmente usando doses com 3 bilhões de espermatozoides viáveis em volume de 80 a 100ml, depositadas no interior da cérvix, fluindo para o corpo do útero [2, 3 e 4]. Com o surgimento da IA intrauterina, também chamada de pós-cervical, o sêmen é depositado diretamente no corno uterino, com o auxílio de um cateter, que passa diretamente por dentro da pipeta tradicional de IA. Com isso é possível reduzir tanto o número de espermatozoides, quanto o volume por dose de sêmen, melhorando o rendimento dos reprodutores com maior diferencial de seleção [5]. Há também a redução tanto do tempo necessário para a realização da IA, quanto da perda de sêmen por refluxo, quando comparada com a IA tradicional [7].

Como principais dificuldades na transição entre a IAT e a IAUI, ocorre a adaptação dos funcionários a uma técnica um pouco mais complexa de ser realizada, pela necessidade de passagem do cateter interno, que é o que alcança a luz uterina, com um maior risco de lesão da porção final da cérvix e, também, de contaminação do útero [6]. A IAUI também se mostra mais difícil de ser realizada em marrãs em comparação às porcas, no que diz respeito à transposição cervical [9], em função de uma menor dimensão do trato reprodutivo desta categoria.

O número total de espermatozoides viáveis e volume da dose na IAUI mais comumente usados são de 1,5 bilhões e 50ml, sem prejuízos nos resultados reprodutivos, mas alguns autores tem mostrado bons resultados, mesmo com um número total de espermatozoides e volume tão baixos quanto 500 milhões em 50ml [10].

Deste modo, atualmente parece haver um consenso de que a IAUI é a técnica de escolha para a IA comercial em suínos e que realmente tem contribuído para rentabilidade na suinocultura mundial [6]. No Brasil, a IAT vem gradualmente sendo substituída pela IAUI. A IAUI pode ser complementar a outras biotecnologias reprodutivas, como o uso de sêmen congelado e da IATF.

Inseminação artificial em tempo fixo

A IATF, em todas as espécies, é baseada na sincronização da ovulação, através da terapia hormonal, dentro de um espaço de tempo conhecido, de modo que se possa determinar um momento fixo para a IA e proporcionar a fecundação, sem perda de viabilidade dos gametas, alcançando bons resultados reprodutivos. Nos suínos, a indução hormonal da ovulação tem registros desde a década de 60, na Alemanha Oriental, em larga escala em porcas e marrãs, contribuindo para a organização do manejo reprodutivo nas granjas, com bons resultados reprodutivos [25]. A utilização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em suínos

visa minimizar os erros associados com a detecção de cio, reduzindo a variação entre o cio e o intervalo de ovulação, além da possível diminuição do número de doses de sêmen por fêmea, diminuindo os custos de produção, apesar do custo dos hormônios.

Pois uma vez que se consiga eficiência na sincronização da ovulação, sem prejuízo no número de ovulações e viabilidade dos oócitos, é possível diminuir o número de inseminações, o número de espermatozoides e volume da dose de sêmen sem prejuízo na taxa de fecundação, parição e tamanho da leitegada. Isso é provável devido à maior passagem de espermatozoides pela junção útero-tubária, que vai aumentando com a proximidade do momento da ovulação [26, 27], o que a torna complementar na utilização de IAUI.

Os hormônios usados na IATF em suínos são altrenogest (progestágenos de aplicação oral), eCG (indutor do crescimento folicular), hCG, análogos de GnRH e LH suíno (todos indutores da ovulação), em suas mais variadas combinações, sendo o altrenogest mais utilizado para marrãs e as combinações entre eCG e os indutores da ovulação, em porcas após o desmame. Em porcas, principalmente primíparas, as terapias objetivaram inicialmente a redução do IDC (intervalo desmame-cio) e, mais recentemente, a diminuição do número de IA por porca [28].

A melhoria do controle do ciclo estral com hormônios exógenos também auxilia na utilização de outras ferramentas como a utilização do sêmen congelado, o que viabiliza a importação de sêmen oriundo de outros países, apoiando o desenvolvimento de programas nacionais de melhoramento genético. Já foi observado que a associação de protocolos de IATF (eCG mais GnRH) com o sêmen congelado pode melhorar os índices de não retorno ao cio, demonstrando que 61,19% das fêmeas não retornaram ao cio após 28 dias da IA sendo mais eficiente que o grupo que não recebeu hormônios exógenos (30,76%) [30].

Considerações Finais

Muitas biotecnologias da reprodução já estão disponíveis para utilização a campo na suinocultura. Deve-se avaliar qual a melhor a ser utilizada em cada situação levando em consideração principalmente a situação da granja e possíveis custos e benefícios, tendo sempre em mente que boas condições sanitárias, de manejo e de alimentação são pré-requisitos para a aplicação de qualquer destas biotecnologias.

Referências bibliográficas

- [1] Knox, RV. Impact of swine reproductive technologies on pig and global food production. *Adv Exp Med Biol* 2014; 752:131-60. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8887-3_7.
- [2] Riesenbeck, A. Review on international trade with boar semen. *Reprod Domest Anim* 2011;46(Suppl. 2):1-3. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01869.x>.
- [3] Toniolli, R. Recentes avanços na tecnologia de sêmen e em inseminação artificial em suínos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.105-113, abr./jun. 2010. Disponível em www.cbra.org.br
- [4] Toniolli, R, Costa e Moreira FR, Chaves, RN, Aires, FP, Ferreira, JL, Silva, MC. Efeito da incubação e temperatura de diluição sobre o sêmen suíno *in natura*. *Rev Ciênc Anim*, v.15, p.99-105, 2005

- [5] Knox, RV. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* 2016; 85: 83-93.
- [6] García-Vazquez, FA, Mellagi, APG, Ulguim, RR, Hernandez-Caravaca, I, Llamas-Lopez, PJ, Bortolozzo, FP. Post-cervical artificial insemination in porcine: The technique that came to stay. *Theriogenology* 129 (2019) 37-45
- [7] Hernandez-Caravaca, I, Izquierdo-Rico, MJ, Matas, C, Carvajal, JA, Vieira, L, Abril, D, Soriano-Úbeda, C, García-Vazquez, FA. Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows. *Anim Reprod Sci* 2012;136:14-22. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.007>.
- [8] Diehl, GN, Amaral Filha, WS, Kummer, R, Koller, F, Bernardi, ML, Wentz, I, Bortolozzo, FP. Nova pipeta para inseminação intra-uterina em suínos. *Ciência Rural* 2006;36:179-85. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000100027>.
- [9] Hernandez-Caravaca, I, Llamas-Lopez, PJ, Izquierdo-Rico, MJ, Soriano-Úbeda, C, Matas, C, Gardon, JC, García-Vazquez, FA. Optimization of post-cervical artificial insemination in gilts: Effect of cervical relaxation procedures and catheter type. *Theriogenology* 2017;90:147-52. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.027>.
- [10] Araújo, EB, Costa, EP, Costa, AHA, Lopes, FG, Macedo, GG, Paula, TAR. Reproductive performance of sows submitted to intrauterine insemination. *Braz J Anim Sci* 2009;38:1460-7.
- [11] Rodriguez, AL, Van Soom, A, Arsenakis, I, Maes, D. **Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen** *Porcine Health Management* (2017) 3-15 DOI 10.1186/s40813-017-0062-5.
- [12] Schulze, M, Ammon, C, Rudiger, K, Jung, M, Grobbel, M. Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*. 2015;83:430-7.
- [13] Lopez Rodriguez, A, Rijsselaere, T, Vyt, P, Van Soom, A, Maes, D. Effect of dilution temperature on boar semen quality. *Reprod Domest Anim*. 2012;47:63-6.
- [14] Vyt, P, Maes, D, Dejonckheere, E, Castryck, F, Van Soom, A. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim*. 2004;39:8-12.
- [15] Kunavongkrit, A, Suriyasomboon, A, Lundeheim, N, Heard, TW, Einarsson, S. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. *Theriogenology*. 2005;63:657-67.
- [16] Wettemann, RP, Wells, ME, Omtvedt, IT, Pope, CE, Turman, EJ. Influence of elevated ambient temperature on reproductive performance of boars. *J Anim Sci*. 1976;42:664-9.
- [17] Aneas, SB, Gary, BG, Bouvier, BP. Collect automated boar collection technology. *Theriogenology*. 2008;70:1368-73.
- [18] Althouse, GC, Lu, KG. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*. 2005;63:573-84.
- [19] Maroto Martin, LO, Munoz, EC, De CF, Van, DE, Echemendia-Blanco, D, Rodriguez, JM, et al. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Anim Reprod Sci*. 2010;120:95-104.
- [20] Vyt, P, Maes, D, Dejonckheere, E, Castryck, F, Van Soom, A. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim*. 2004;39:8-12.
- [21] Kuster, CE, Althouse, GC. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep and X-CELL extenders. *Theriogenology*. 1999;52:365-76.
- [22] Didion, BA, Braun, GD, and Duggan, MV. 2013. Field fertility of frozen boar semen: A retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Anim. Reprod. Sci*. 137: 189-196.
- [23] Chanapiwat, P, Olanratmanee, E, Kaeoket, K, Tummaruk, P. Conception Rate and Litter Size in Multiparous Sows after Intrauterine Insemination Using Frozen-Thawed Boar Semen in a Commercial Swine Herd in Thailand *J. Vet. Med. Sci*. 76(10): 1347-1351, 2014.
- [24] Gonzalez-Peña, D, Knox, RV, Pettigrew, J, Rodriguez-Zas, SL. Impact of pig insemination technique and semen preparation on profitability. *J Anim Sci* 2014; 92: 72-84. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6836>.
- [25] Hühn, U, Jöchle, W, Brüssow, KP. Techniques developed for the control of estrus, ovulation and parturition in the east german pig industry: a review. *Theriogenology*, v. 46, n. 6, p. 911-24, 1996.

- [26] Viana, CHC. **Avaliação dos intervalos inseminação-ovulação e desmame-cio e da duração do cio como parâmetros na determinação de programas alternativos de inseminação artificial em suínos.** 2001. 76 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [27] Soede, NM, Wetzels, CCH, Zondag, W, De Köning, MAI, Kemp, B. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, n. 1, p. 99-106, 1995.
- [28] De Rensis, F, Kirkwood, RN Control of estrus and ovulation: Fertility to timed insemination of gilts and sows. **Theriogenology**, 86 (2016) 1460–1466.
- [29] Didion, BA, Braun, GD, Duggan, MV. **Animal Reproduction Science** 137 (2013) 189–196
- [30] Souza, AP, Silva, Z Superti, BFV; Marques, MG. Caminhos da Biotecnologia na Reprodução de suínos. **Suinocultura Industrial**, São Paulo, p. 18 - 23, 01 set. 2016.

Protocolos sanitários para doadores de sêmen: mercado interno e exportação

Liria Hiromi Okuda

Laboratório de Vírus de Bovídeos/CPSA/Instituto Biológico
okuda@biologico.sp.gov.br

Resumo: O Brasil vive uma condição ímpar na exportação de animais vivos e produtos, como sêmen e embriões, graças ao melhoramento genético, nutrição, sanidade e bem-estar. Como parte dos acordos internacionais, os protocolos sanitários diferem entre países e em função das doenças presentes nos países importadores e, no caso do sêmen, os principais patógenos envolvidos na esfera reprodutiva, além de febre aftosa e estomatite vesicular por conta do Programa Nacional de Erradicação da febre aftosa. Os testes diagnósticos seguem o Manual de Técnicas Diagnósticas e Vacinas da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Os Centros de Coleta e Processamento de Sêmen, além de atenderem a Instrução Normativa 40/2007 do MAPA (referente aos requisitos sanitários mínimos como brucelose, tuberculose, campilobacteriose, tricomonose e BVD), também passaram a incluir os exames para IBR/IPV, língua azul (BTV) e leucose bovina (BLV), justamente para atenderem o mercado externo.

Palavras-chave: sêmen, risco sanitário, patógeno, bovino.

Keywords: semen, sanitary risk, pathogen, bovine.

Introdução

O rebanho bovino brasileiro está estimado em cerca de 212 milhões de cabeças [1], resultado dos contínuos investimentos em melhoramento genético (pela aplicação de biotecnologias como a inseminação artificial e transferência de embriões), nutrição, bem-estar e ao controle sanitário dos reprodutores. Consequentemente, todo esse trabalho tem garantido ao Brasil, um momento ímpar, com aumento das exportações de animais vivos e seus produtos.

As exportações brasileiras de sêmen bovino destinam-se aos países membros que integram o Mercosul e associados como Bolívia, Peru, Colômbia e Equador. Considerando que a situação sanitária diverge entre países, os exames sanitários para sêmen podem ser distintos.

A transmissão de alguns patógenos pelo sêmen é conhecida e por esse motivo são incluídos nos requisitos para atender os protocolos sanitários, seja para trânsito interno como exportação [2,3]. Desta forma, os reprodutores devem ser submetidos a um rigoroso controle sanitário, desde a fazenda de origem (pré-quarentena), sua entrada (quarentena) como durante sua permanência nos Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS).

Para atender a demanda de diagnóstico e monitoramento para o comércio nacional e internacional de sêmen é recomendado que os laboratórios executantes possuam acreditação

na norma ISO/IEC 17025, que garantem a certificação sanitária dos reprodutores e das partidas de sêmen produzidas. O Instituto Biológico (localizado na cidade de São Paulo), acreditado nesta norma internacional, atende cerca de 90% das CCPS do Brasil garantindo a qualidade sanitária do produto comercializado, seja para comércio interno como para exportação. O Laboratório de Virose de Bovideos do Instituto Biológico, somente de janeiro a abril de 2019 analisou 1288 partidas de sêmen, sendo 416 para IBR/IPV, 119 para BVD, 444 para BTV e 309 para leucose bovina. Os exames de febre aftosa e estomatite vesicular são realizadas quando no ingresso dos reprodutores (pre-quarentena ou quarentena) ou no período da quarentena da exportação.

Protocolos sanitários preconizados pela OIE

Os protocolos sanitários para comercialização de sêmen bovino são preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal [3] com base no risco de transmissão dos patógenos (seja de forma direta ou indireta), assim como de importância econômica e para saúde pública, os quais incluem exames na pré-quarentena e quarentena. Ainda no estabelecimento dos acordos sanitários entre os países importador e exportador podem ser incluídos doenças que o país exportador possui, como forma de evitar a entrada de novo agente infeccioso no país importador.

Na tabela 1 estão discriminados os exames exigidos pela OIE.

Tabela 1. Exames exigidos para admissão de reprodutores no CCPS, segundo OIE (2018).

Doença	Pré-quarentena		Quarentena		Monitoramento (anual)	
	Teste sorológico	Teste direto	Teste sorológico	Teste direto	Teste sorológico	Teste direto
Brucelose	Sim	N/A	Sim	N/A	Sim	N/A
Tuberculose bovina	N/A	Sim	N/A	Sim	N/A	Sim
BVDV	Sim	Sim: avaliar P.I.	Sim: avaliar soroconversão	Sim: avaliar fase aguda de infecção ou P.I.	Sim: avaliar soroconversão	Sim: Testar TODAS as partidas de semen do animal que soroconverteu, desde ultimo teste soronegativo
Campilobacteriose	N/A	N/A	N/A	Sim *Animal < 6m e mesmo grupo: somente 1 teste *Animal > 6 m e contato com fêmeas: 3 testes semanais negativos	N/A	Sim

>continua

Doença	Pré-quarentena		Quarentena		Monitoramento (anual)	
	Teste sorológico	Teste direto	Teste sorológico	Teste direto	Teste sorológico	Teste direto
Tricomonose	N/A	N/A	N/A	Sim *Animal < 6m e mesmo grupo: somente 1 teste *Animal > 6 m e contato com fêmeas: 3 testes semanais negativos	N/A	Sim
IBR/IPV	Sim	N/A	Sim	N/A	Sim	N/A
Língua azul	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Legenda: N/A: não se aplica; P.I.: persistentemente infectado, m: meses; BVDV: vírus da diarreia viral bovina, IBR/IPV: rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa

No caso da BVDV, a questão é quanto a soroconversão, pois animais P.I.s não são admitidos na CCPS. Desta forma, caso algum touro residente apresente soroconversão, todas as partidas de sêmen produzidas devem ser analisadas para garantir que não houve eliminação.

Quanto a IBR/IPV somente animais soronegativos são admitidos na CCPS, ou seja, se ocorrer soroconversão, o mesmo deverá ser retirado e as partidas de sêmen devem ser analisadas e se positivas, incineradas.

Protocolos sanitários preconizados pelo Brasil

O Brasil segue as diretrizes estabelecidas pela OIE quanto aos requisitos sanitários de ingresso dos reprodutores nas CCPS, os quais estão publicadas na Instrução normativa/MAPA 48 de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [4]. Conforme tabela 2, nota-se que IBR/IPV e Língua azul, não estão incluídas nas doenças obrigatórias que as CCPS devem analisar na admissão de reprodutores. Estas são somente exigidas para atender os requisitos sanitários para importação de sêmen bovino, conforme publicado na Instrução normativa/MAPA 47 de 2007 [5].

No caso de exportação de sêmen, de acordo com o país importador, as exigências sanitárias podem ser distintas ou até mesmo maior e, portanto, os exames requeridos podem variar, não existindo um protocolo sanitário universal. Na tabela 3 estão listadas as principais doenças que são realizadas para exportação de sêmen.

Tabela 2. Exames exigidos para admissão de reprodutores no CCPS [4].

Doença	Pré-quarentena		Quarentena		Monitoramento (anual)	
	Teste sorológico	Teste direto	Teste sorológico	Teste direto	Teste sorológico	Teste direto
Brucelose	Sim	N/A	Sim	N/A	Sim	N/A
Tuberculose bovina	N/A	Sim	N/A	Sim, após 60 dias do último teste realizado	N/A	Sim
BVDV	Não	Não	Não	Sim: avaliar fase aguda de infecção ou P.I.	Não	Não
Campilobacteriose	N/A	N/A	N/A	Sim: 3 testes semanais negativos	N/A	Sim
Tricomonose	N/A	N/A	N/A	Sim: 3 testes semanais negativos	N/A	Sim

Legenda: N/A: não se aplica; P.I.: persistentemente infectado

Tabela 3. Exames realizados para exportação de semen [5]

Doença	Quarentena	
	Teste sorológico	Teste direto
Brucelose	Sim	N/A
Tuberculose bovina	N/A	Sim, após 60 dias do último teste realizado
BVDV	Sim	Se necessário para avaliar fase aguda
Campilobacteriose	N/A	Sim
Tricomonose	N/A	Sim
Febre aftosa	Sim	N/A
Estomatite vesicular	Sim	N/A
IBR/IPV	Não	Sim: das partidas de sêmen
Língua azul	Não	Sim: sangue total ou partidas de sêmen
Leucose bovina	Não	Sim: sangue total ou das partidas de sêmen

Legenda: N/A: não se aplica; P.I.: persistentemente infectado

Como no Brasil a maioria das doenças de impacto econômico é endêmica, há dificuldade na aquisição de animais soronegativos e, portanto, para o ingresso de touros torna-se imprescindível à pesquisa destes agentes visando o controle sanitário das partidas de sêmen.

Com o avanço do programa de controle e erradicação de febre aftosa no Brasil, as exigências sanitárias impostas por países importadores também têm se tornado mais restritivas e, desde então, exames como estomatite vesicular, língua azul e leucose bovina passaram a ser exigidos para comercialização internacional de sêmen bovino, dependendo do país importador. De certa forma essas medidas contribuem para que os CCPS passem a adotar como

exame de rotina, o controle de touros e partidas de sêmen, principalmente para IBR/IPV, BTV e BLV.

Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

A diarreia viral bovina (BVD) é uma das doenças prescritas no controle de touros residentes de centrais de inseminação artificial no Brasil. É causada pelo vírus da Diarreia viral bovina (BVDV) pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* [6].

Animais sorologicamente positivos para BVD podem ser admitidos nas centrais de inseminação artificial, porém, é proibido o ingresso de animais persistentemente infectados (PI) ou imunotolerantes [3,4], daí a importância de sempre se associar diagnóstico sorológico e virológico. Para tanto, durante a quarentena, os animais devem ser submetidos a dois testes, com intervalo de vinte dias (no mínimo), para avaliar a frequência de anticorpos e pesquisa do vírus em amostra de sangue com anticoagulante. Adicionalmente, todos os animais são reavaliados a cada seis meses ou anualmente (sorologia e detecção do vírus), com a finalidade de verificar possíveis novas infecções. O teste de referência para detecção de anticorpos anti-BVD é a vírusneutralização. Para a pesquisa do vírus realiza-se o isolamento viral com identificação pela imunoperoxidase (ou imunofluorescência), ELISA antígeno ou PCR [4], sendo que estes últimos dois métodos são os mais indicados tendo em vista a elevada sensibilidade e especificidade dos testes, bem como rapidez no diagnóstico. Touros sorologicamente positivos para BVD normalmente possuem altos títulos de anticorpos (acima de 160) e os mesmos estão protegidos contra possíveis infecções pela BVDV. O problema reside em animais não reagentes ou com baixos títulos de anticorpos anti-BVD, que poderia sugerir a presença de um animal PI, demonstrando a importância de se associar testes sorológicos e virológicos para interpretação dos resultados.

Vírus da Rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV)

A IBR/IPV, causada pelo alfa-Herpêsvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) pertencente a família *Herpesviridae* e gênero *Alphaherpesvirinae* [7] é um dos principais agentes associados aos problemas reprodutivos e respiratórios, justamente, por se tratar de uma doença endêmica no Brasil e pelo fato de que o animal se torna portador para o resto da vida [8,9]. Portanto, o risco de se admitir touros sorologicamente positivos para IBR/IPV é grande, sendo mundialmente proibido em CCPS. No Brasil, como não existe um programa oficial para controle dessa enfermidade, ainda são admitidos touros portadores de anticorpos para IBR/IPV. Desta forma, como medida de controle em touros de CCPS, recomenda-se analisar todas as partidas de sêmen produzidas, tanto de touros negativos como positivos, uma vez que não é possível determinar o momento de reativação e nem a ocorrência de infecção de um touro suscetível.

Dados do Laboratório de Vírus de Bovídeos/CPSA do Instituto Biológico (não publicados) apontam frequência de touros soropositivos em torno de 73% (201/276), pela vírusneutralização, com títulos de anticorpos variando de 4 a 1024. Essa elevada positividade reflete os resultados observados no campo, também em virtude da vacinação dos animais.

Os testes sorológicos, como a virusneutralização e ELISA indireto não diferenciam anticorpos vacinais de infecção. Assim, visto que no Brasil autoriza-se a comercialização de vacinas convencionais (vírus completo) e não as deletadas, não se recomenda realização do teste sorológico para IBR/IPV para exportação de sêmen. Por esse motivo a PCR em tempo real é o método recomendado para detecção do vírus da IBR/IPV nas partidas de sêmen produzidas.

O fato de as CCPS investirem em bem-estar animal e nutrição parece diminuir o efeito da reativação viral de touros portadores e nas vacas manequins e, portanto, menores taxas de sêmen positivos são observados. Em touros residentes e latentes para o BoHV-1, quando ocorre a reativação viral, a excreção do BoHV no sêmen é baixa, pode ser uma única vez ou intermitente. Por sua vez, em touros primo-infectados, o tempo de excreção viral é maior podendo durar até uma três dias ou mais dependendo da imunidade do animal [10].

Caso seja detectada uma partida de sêmen positiva para BoHV, o lote todo produzido deve ser incinerado.

Língua azul

A língua azul (*bluetongue*, BT) é uma doença infecciosa que afeta ovinos, caprinos, bovinos e diversas espécies de ruminantes silvestres. Sua transmissão ocorre por mosquitos do gênero *Culicoides* [11] e, portanto, apresenta caráter sazonal, embora as alterações climáticas estejam contribuindo para manutenção do vetor, por quase todo o ano.

Tarta-se de uma doença de notificação obrigatória de acordo com o Código Sanitário de Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal e está incluída na lista de enfermidades infecciosas cujas conseqüências sócio-econômicas podem ser graves e de grande importância sobre o comércio internacional de animais e seus subprodutos. Para movimentação de animais, inclusive entre os países que compõem o Mercosul (Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai), é obrigatória análise para pesquisa de vírus ou de anticorpos dos animais ou de seus produtos [12].

O vírus da língua azul (*bluetongue virus*, BTV) pertence à família *Reoviridae*, gênero *Orbivirus* e, atualmente existem 30 sorotipos, sendo três considerados atípicos. No Brasil são relatados a presença dos sorotipos 3, 4, 8, 10, 12, 14 e 18 [13].

O diagnóstico da Língua Azul em touros de CCPS é baseado na pesquisa de anticorpos (IDGA ou ELISA) ou pesquisa do BTV em amostras de sangue com anticoagulante ou sêmen (detecção do RNA viral pela RT-PCR em tempo real), sendo preconizado, no mínimo, 2 testes. Os testes sorológicos visam a vigilância epidemiológica e a emissão de certificados para o comércio internacional de animais e de seus produtos [3]. Entretanto, considerando que o país é endêmico para BTV [14], o teste sorológico não é o mais indicado, sendo recomendando a pesquisa do vírus no sangue total ou nas partidas de sêmen.

Vírus da Leucose bovina

A leucose bovina (BL) é uma doença infecto-contagiosa, de caráter crônico, causada pelo vírus da Leucose bovina (BLV) pertencente à Família *Retroviridae*, subfamília *Ortho-*

retrovirinae, gênero *Deltaretrovirus* [15]. O impacto econômico reside, principalmente, no comércio internacional de sêmen e embriões, impostos por países livres da doença. Segundo as normas do Código Sanitário de Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal [3], o comércio internacional de bovinos ou sêmen devem ser procedentes de rebanho livre de BLV, ou o animal apresentar sorologia negativa 30 dias antes do embarque pelo teste de ELISA. Considerando que a doença é endêmica no país, principalmente em rebanhos leiteiros, o teste sorológico também não é o mais indicado. Isso porque existe grande risco do animal ser positivo e, por se tratar de um retrovírus, este permanecerá por toda a vida do animal com chances de ser ativado, em situações de baixa imunológica. Ainda, o tempo da viremia e a soroconversão podem ser longas. Após a infecção, o vírus começa a ser detectado por volta de 18 dias após infecção e a soroconversão ocorre até 50 dias pós infecção [16]. Porém, dependendo do estatus imunitário do animal, essa condição de soroconversão pode ser aumentada. Recomenda-se para exportação de sêmen, a pesquisa do BLV em amostras de sangue com anticoagulante durante a quarentena da exportação bem como análise das partidas de sêmen. Por ser um Retrovírus, o mesmo se aloja nos linfócitos. Ou seja, somente na presença de leucócitos infectados é que se detectaria a presença do BLV no sêmen, o que pode ser decorrente de mau procedimento durante a coleta (que poderia promover um trauma, por exemplo) e, portanto, infiltração de leucócitos no sêmen ocasionando PCR positiva.

Normas para colheita e encaminhamento de material para diagnóstico

- **Ficha clínica:** encaminhar os dados clínicos e epidemiológicos, idade e procedência dos animais. Mencionar vacinações, tratamentos com antibióticos ou carrapaticidas, cujos resíduos no sangue podem interferir nas provas diagnósticas.
- **Soro:** enviar cerca de 5 mL de soro não hemolisado, em frascos estéreis e remetidos sob refrigeração. O exame sorológico é importante para determinar a ocorrência e incidência das doenças. No caso de amostras pareadas, devem ser colhidas com intervalo de cerca de 20 dias. Pode ser utilizado como diagnóstico confirmatório de infecção, quando se observa um aumento do título de anticorpos, em quatro vezes ou mais.
- **Sangue para detecção viral:** colher 5 mL de sangue com anticoagulante EDTA de todos os touros na quarentena (2 colheitas com intervalo mínimo de 20 dias) para identificação e eliminação de possíveis animais persistentemente infectados (PI) para BVDV ou animais em viremia para BTV e BLV.
- **Sêmen *in natura* ou industrializado:** encaminhar 0,5 ml de sêmen *in natura* ou até 4 palhetas de sêmen industrializado de 0,25 ou 0,5 ml, dependendo do número de patógenos a ser analisado.

Técnicas diagnósticas

Finalidade: Pesquisa de anticorpos		
Doença	Matriz	Método diagnóstico
Brucelose	Soro	AAT, 2-ME ou Fixação de complemento
Febre aftosa		ELISA 3ABC e confirmatório pelo ensaio imunoenzimático de eletrotransferência (EITB)
Estomatite vesicular (sorotipos COCV e VSAV)		Virusneutralização
Língua Azul (BT)		IDGA ou ELISA
IBR/IPV		Virusneutralização
BVD		Virusneutralização ou ELISA
Leucose Bovina		ELISA
Finalidade: Pesquisa do agente infeccioso		
Doença	Matriz	Método diagnóstico
Tuberculose bovina	Pele	Prova intradérmica simples e comparada
Campilobacteriose	Suabe prepucial	Isolamento e identificação bioquímica
Tricomonose	Lavado prepucial	Isolamento
IBR/IPV	Sêmen: todas as partidas (touro negativos e positivos)	PCR em tempo real
BVD	Sangue total	ELISA antígeno RT-PCR
Língua Azul (BT)	Sangue total ou Sêmen	RT-PCR em tempo real
Leucose Bovina	Sangue total ou Sêmen	PCR

Considerações Finais

Os protocolos sanitários para atendimento de exportação de sêmen devem-se muito as imposições restritivas do comércio internacional, nem sempre atreladas aos programas oficiais do governo e devem ser continuamente revistos e atualizados, pois os patógenos são dinâmicos e se munem de estratégias para perpetuar nos hospedeiros, adaptando-se muitas vezes as novas condições climáticas. Assim, todos os atores envolvidos (órgãos de defesa sanitária animal, laboratórios acreditados e CCPS) devem estar preparados para responder em tempo tela, as demandas exigidas pelo mercado.

Referências bibliográficas

- [1] IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Resultados do Censo Agropecuário 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>.
- [2] Afshar, A.; Eaglesome, M. D. Viruses Associated with Bovine Semen. *The Vet Bul* 1990; 60: 2: 93-109
- [3] OIE - World Organisation for Animal Health. Terrestrial Animal Health Code. Collection and processing of bovine, small ruminant and porcine semen. Paris: OIE, 2018. Disponível em: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_coll_semen.htm
- [4] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Requisitos zoossanitários para habilitação dos centros de coleta e processamento de sêmen bovino e bubalino e certificado zoossanitário para comercialização de sêmen destas espécies entre os estados partes do Mercosul. Instrução Normativa, no.48, de 17 de junho de 2003.2003.
- [5] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Requisitos sanitários para a importação de sêmen bovino e bubalino oriundo de países Extramerco-sul. Instrução Normativa, no.40, de 04 de setembro de 2007
- [6] International Committee Taxonomy Of Virology (ICTV). Family *Herpesviridae*. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
- [7] Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. Family Herpesviridae. In: _____ (Ed.). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, 2004. 1162p.
- [8] Richtzenhain, L.J.; Alfieri, A.; Leite, R.C.; Weiblen, R.; Moro, E.; Umehara, O. Pesquisa de anticorpos séricos contra o herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) em fêmeas bovinas de propriedades com histórico de problemas reprodutivos localizados em 21 Estados brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 3., 1999, São Paulo. Resumos. Arq. Inst. Biol., 66:127.
- [9] Lemaire M., Weynants V., Godfroid J., Schynts F., Meyer G., Letesson J.J. & Thiry E. (2000). Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1885–1894
- [10] Okuda, L. H.; Stefano, Eliana De; C.N. Camargo; Shimo-zono, Odair Shinya; Rodrigues, L H.; Pituco, E. M. Ocorrência de HVB-1 em partidas de sêmen de uma Central de Inseminação Artificial, Brasil. Resultados preliminares. In: 17ª Reunião Anual do Instituto Biológico, 2004, São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico, 2004. v. 71.
- [11] OIE - World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018. Disponível em: <http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- [12] SICE. Organization of American State's Foreign Trade Information System. Resoluções do Grupo Mercado Comum. MERCOSUL/GMC/RES. N° 16, de 2005 - Requisitos Zoossanitários para o Intercâmbio entre os Estados partes de sêmen bovino e bubalino. Disponível em: <http://www.sice.oas.org/trade/mrcsrs/resolutions/res1605p.asp>. Acesso em: 27 de setembro de 2010
- [13] Lobato, Z.I.P, Guedes, MIMC, Matos, ACD. Bluetongue and other orbiviruses in South America: gaps and challenges. *Vet. Ital.*, 51 (2015), pp. 253-262, 10.12834/VetItf.600.2892.1
- [14] NOGUEIRA, A. H. C. ; STEFANO, E. ; MARTINS, M. S. N. ; OKUDA, L. H. ; LIMA, M.S. ; SILVA, T.G. ; HEINZ, O. H. ; ALVES, J. E. L. ; SAVINI, G. ; PITUCO, E. M. Prevalence of Bluetongue virus serotype 4 in cattle in the State of Sao Paulo, Brazil. *Vet Ital*, 2016, 52 (3), 319-323. doi: 10.12834/VetItf.570.2721.1.
- [15] Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.D. (Eds.). *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses*. 7th Report. San Diego: Academic Press, 2000. 1167p. Chapter 00.061: Family Retroviridae.
- [16] Choi, K. Y., Monke, D., & Stott, J. L. (2002). Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14(5), 403-406.

Novas tecnologias para colheita de sêmen de felídeos domésticos e selvagens

Regina Celia Rodrigues da Paz

Laboratório de Pesquisa em Animais de Zoológico, Faculdade de Medicina Veterinária,
Universidade Federal de Mato Grosso, reginacrpaz@gmail.com

Abstract: The artificial vagina and electroejaculation are common semen collection methods in domestic cats. In wild cats the most used technique is electroejaculation and can also be used semen collected from epididymis, after orchiectomy, or death, in endangered animals. The semen collection method should provide good quality of ejaculates and minimum stress to the animal, in this way, semen collection for urethral catheterization method after pharmacological induction emerges as a viable alternative in felines, being successfully used in domestic and wild cats. This new collection methodology has the advantage of eliminating specific equipment and to reduce costs, as well as, makes the semen collection easier for domestic cats that do not accept artificial vagina and free-living wild cats. However, most of the anesthetic protocols for urethral catheterization semen collection increase the risk of side effects, especially on the cardiovascular system, indicating that new alternative and safer protocols need to be tested in wild animals.

Keywords: pharmacological collection, urethral catheter, dexmedetomidine.

Palavras-chave: coleta farmacológica, cateter uretral, dexmedetomidina.

Introdução

A colheita de sêmen em felinos pode ser realizada pelos métodos ejaculatório utilizando-se vagina artificial ou eletroejaculação; ou pelos métodos não ejaculatórios utilizando-se a colheita de sêmen do epidídimo após o óbito ou orquiectomia. Recentemente uma nova metodologia de colheita de sêmen em felinos vem sendo testada com resultados promissores, trata-se da colheita farmacológica por sondagem uretral.

Considerando que o método de colheita deve prover ejaculados com qualidade e o mínimo estresse ao animal, a colheita de sêmen pelo método do cateterismo uretral, após indução farmacológica, surge como uma alternativa viável em felinos, sendo utilizado com sucesso em gatos domésticos e felinos selvagens.

Essa nova metodologia de colheita tem a vantagem de eliminar a necessidade de equipamentos específicos, e com isso reduzir os custos; bem como facilitar a colheita em gatos

domésticos que não aceitam a vagina artificial e em felinos selvagens de vida-livre, uma vez que não necessita de treinamento prévio.

Métodos ejaculatórios

Dentre os métodos ejaculatórios podemos citar a recuperação de sêmen após o coito, a manipulação digital, a colheita de sêmen por vagina artificial e a eletroejaculação, sendo apenas os dois últimos viáveis para gatos domésticos. A recuperação de sêmen após o coito em felinos, diretamente da vagina da fêmea, é muito difícil de ser realizada, devido ao pequeno volume do ejaculado ($\sim 0,03\text{mL}$). A manipulação digital para a colheita de sêmen também é uma técnica difícil de ser realizada, devido ao tamanho reduzido do pênis. Em gatos domésticos o pênis ereto apresenta comprimento de $21,2 \pm 2,2\text{mm}$ e diâmetro de $5,1 \pm 0,5\text{mm}$ [1], o que torna praticamente impossível a colheita de sêmen por este método.

Colheita de sêmen por vagina artificial em gatos domésticos foi reportado primeiramente na década de 1970 [2] e vem sendo utilizada até hoje por proporcionar ejaculados normais, uma vez que simula o coito. Apresenta a vantagem de ser de baixo custo, pois a vagina artificial para gatos domésticos pode ser facilmente confeccionada utilizando-se um bulbo de pipeta *Pasteur* e um microtubo cônico plástico sem tampa, não havendo a necessidade de contenção física ou química. Entretanto, como desvantagem podemos citar a necessidade da presença de fêmea no cio ou tratada com estrógeno e treinamento prévio do macho.

A eletroejaculação também foi utilizada pela primeira vez em gatos domésticos na década de 1970 [3] e desde então este tem sido o método mais utilizado em felinos, tornando-se a técnica de eleição para machos adultos que não aceitam a vagina artificial. A eletroejaculação também é a técnica mais utilizada em felinos selvagens, devido ao fato de poder ser realizada em animais anestesiados, uma vez que a utilização de vagina artificial necessita de treinamento intensivo dos animais, tornando-se uma prática perigosa se não for bem executada [4].

O aparelho utilizado para a geração dos eletrochoques é semelhante ao utilizado para eletroejaculação em bovino, com eletrodos retais bipolares, com três tiras longitudinais em cobre (5cm de comprimento com distância de 0,4cm entre elas e saliência de 0,2cm), com medidas específicas para gato doméstico (diâmetro 1cm e comprimento total 12cm) [5]. Os eletrodos utilizados em felinos selvagens seguem o mesmo padrão das tiras longitudinais em cobre, porém com diâmetro diferente para cada espécie (Tabela 1).

A série de eletrochoques segue protocolo padrão, no qual são utilizados 80 estímulos elétricos divididos em 3 séries: 30 (10 estimulações em 2, 3 e 4V), 30 (10 estimulações em 3, 4 e 5V) e 20 (10 estimulações em 4 e 5V) [6], devendo haver descanso de 10 minutos entre as séries. Em grandes felinos a última série de estímulos pode chegar a 6V, caso não se consiga a ejaculação do animal com estímulos em 5V [7], no entanto, o risco de contaminação por urina aumenta em voltagens mais elevadas. Em estudo realizado em gatos domésticos o número de espermatozoides nos ejaculados coletados com 4 ou 8V foi significativamente

maior comparado aos 1 e 2V, no entanto, por vezes estímulos com 8V resultaram em contaminação por urina [8].

Em gatos domésticos há uma variação considerável relacionada ao volume do ejaculado e o número de espermatozoides ejaculados de acordo com estimulação elétrica [9]. A contaminação do ejaculado por urina ocorre com relativa frequência e também parece estar relacionada a voltagem excedendo o mínimo necessário para ejaculação [6,10,11]. Sendo assim, a cada série, os tubos devem ser trocados, com a finalidade de se evitar possíveis contaminações com urina. Em felinos todos os ejaculados são utilizados, sendo o volume total de sêmen a soma dos volumes de cada ejaculado.

Uma das alternativas para minimizar este problema seria a drenagem da urina por cateterização ou cistocentese, antes do início dos eletrochoques. Se o objetivo for apenas a confirmação da presença de espermatozoides no ejaculado, pode-se proceder a cistocentese ou cateterização com posterior infusão de solução fisiológica na bexiga, antes do início dos eletrochoques. Caso não seja possível obter o ejaculado após a série de eletrochoques, faz-se a drenagem e análise da solução fisiológica de origem vesical, a qual pode conter espermatozoides.

Diferentes protocolos anestésicos têm sido descritos na literatura para realizar eletroejaculação em felinos. Os fármacos mais comumente utilizados são a cetamina associada a xilazina, diazepam, acepromazina; ou agentes inalatórios como halotano e isoflurano; ou propofol. A associação de fármacos tiletamina-zolazepam tem sido preconizada para a realização deste procedimento por não determinar alterações significativas no ejaculado.

Do ponto de vista ético a eletroejaculação vem sendo cada vez mais questionada, sendo restrita em alguns países. Diante desse panorama, foi realizado um estudo com 10 gatos domésticos para determinar o impacto da eletroejaculação na mucosa retal. A avaliação foi realizada por endoscopia e análise histológica; e concluíram que a eletroejaculação não induziu lesão significativa, confirmando ser uma técnica segura para colheita de sêmen em gatos [12].

No entanto, mesmo comprovando-se ser uma técnica segura, é certo que o procedimento de eletroejaculação, por vezes, não apresenta resultados satisfatórios em felinos, seja pela contaminação do ejaculado por urina ou devido a ejaculados com grande volume e baixa concentração espermática, quando comparados a outros métodos de colheita.

Tabela 1. Características seminais de felídeos neotropicais coletados por eletroejaculação.

Espécie	Eletrodo (diâmetro/cm)	Nº de Ejaculados	Volume (ml)	Concentração (x10 ⁶ /ml)	Motilidade (%)
Jaguatirica <i>L. pardalis</i>	1.0 ¹	5 ¹ 38 ³	0.3±0.1 ¹ 0.62±0.08 ³	28.0±17.0 ¹ 53.8±17.8 ³	72.0±12.5 ¹ 70.4±2.3 ³
Gato-do-mato-pequeno <i>L. tigrinus</i>	1.0 ¹	18 ³	0.11±0.02 ³	78.5±33.8 ³	62.1±5.7 ³
Gato-do-mato <i>L. guttulus</i>	1.0 ¹	10 ⁴	0.094±0.076 ⁴	151.1±87.4 ⁴	61.0±18.75 ⁴
Gato maracajá <i>L. wiedii</i>	1.0 ¹	11 ¹ 27 ³	0.2±0.1 ¹ 0.31±0.05 ³	79.9±28.1 ¹ 14.2±5.3 ³	86.0±3.3 ¹ 62.8±5.3 ³
Gato Mourisco <i>H. yagoroundi</i>	1.0 ¹	3 ¹ 21 ³	0.1±0.1 ¹ 0.08±0.02 ³	12.5±9.4 ¹ 7.2±4.0 ³	50.0±9.9 ¹ 57.8±2.5 ³
Gato palheiro <i>L. colocolo</i>	1.0 ¹	5 ¹ 2 ³	0.3±0.1 ¹ 0.08±0.01 ³	10.8±5.7 ¹ 364.0±326.0 ³	36.7±6.6 ¹ 81.3±6.3 ³
Gato-do-mato-grande <i>L. geoffroyi</i>	1.0 ¹	8 ¹ 24 ³	0.2±0.1 ¹ 0.21±0.03 ³	300.0±233.2 ¹ 66.5±24.4 ³	73.0±4.4 ¹ 64.0±4.7 ³
Suçuarana <i>P. concolor</i>	1.6 ¹	12 ¹	2.8±0.5 ¹	20.2±4.7 ¹	52.0±8.0 ¹
Onça-pintada <i>P. onca</i>	3.0 ¹ 2.3 ²	5 ¹ 38 ²	2.7±0.6 ¹ 5.7±1.71 ²	12.0±1.9 ¹ 13.16±10.76 ²	82.0±5.8 ¹ 56.9±9.35 ²

¹Howard, 1993 [6]; ²Paz et al., 2000 [7]; ³Morais, 2001 [13], ⁴Iglesias, 2019 [14]

Métodos não ejaculatórios

Dentre os métodos não ejaculatórios utilizados em felinos podemos citar duas técnicas: a colheita de sêmen do epidídimo e a colheita farmacológica de sêmen por cateterismo uretral.

Em gatos domésticos a colheita de sêmen do epidídimo vem sendo utilizada como modelo experimental para felinos selvagens, devido ao fato de poder ser realizada em animais que vieram á óbito ou foram submetidos a vasectomia, tornando-se uma ferramenta importante na conservação de espécies ameaçadas.

Existem várias técnicas para colheita de sêmen do epidídimo, sendo o tamanho do animal determinante para sua escolha. Em grandes felinos pode-se realizar a lavagem do epidídimo introduzindo-se meio de cultura (HEPES e/ou HAM'S F10, ou solução salina) com auxílio de uma seringa e coletando-o na extremidade oposta diretamente na placa de Petri [4].

Em animais de grande e médio porte a colheita pode ser feita por compressão (Squeezing), onde o epidídimo é comprimido em direção aos vasos deferentes com o auxílio de uma pinça ou lâmina histológica, conduzindo seu conteúdo diretamente em uma placa de Petri aquecida contendo meio diluidor [15].

Em pequenos felinos o fatiamento do epidídimo (Slicing) pode ser uma alternativa quando os métodos anteriores se tornam inviáveis em consequência do tamanho reduzido do testículo, no entanto, esta técnica pode apresentar contaminação da amostra, o que por vezes inviabiliza o uso dos espermatozoides. Nesta técnica a cauda do epidídimo é dissecada, fatiada com o auxílio de uma lâmina de bisturi e colocada em placa de Petri aquecida contendo meios diluidores [16]. Após 10-15 minutos de incubação os tecidos são removidos e a suspensão deve então ser filtrada ou centrifugada para recuperação dos espermatozoides.

Para qualquer uma das técnicas citadas é necessária a dissecação completa do epidídimo, removendo todos os tecidos adjacentes e vasos sanguíneos para se evitar a contaminação da amostra.

A refrigeração dos testículos a 5°C logo após o óbito ou retirada dos mesmos por castração é recomendada, sendo que espermatozoides vivos podem ser recuperados em até doze horas [6]. No entanto, nossa experiência tem indicado que a recuperação de células viáveis dentro do período de 2 horas é melhor quando os testículos são mantidos a 37°C em placa aquecedora.

Em animais vasectomizados o sêmen é coletado por aspiração diretamente da cauda do epidídimo, com agulha e seringa descartáveis. A seringa deve conter meio de cultura HEPES acrescido de HAM'S F10, sendo que os espermatozoides são recuperados após centrifugação do material coletado.

A aplicação de técnicas de colheita de sêmen para gatos domésticos ainda ocupa um lugar discreto em gatis comerciais, concentrando a atual procura por reprodução assistida apenas para algumas raças específicas. Devido ao fato da eletroejaculação ser uma técnica não aceita por alguns proprietários, havia dificuldade na colheita de sêmen por vagina artificial em machos destreinados. Neste contexto, a nova técnica de colheita farmacológica do sêmen por cateterismo uretral surge como uma alternativa viável para solucionar este problema.

A colheita de sêmen farmacológica baseia-se no fato dos agentes α -adrenérgicos atuarem em α -adrenoreceptores determinando a contração dos vasos deferentes [17], o que pode determinar uma alta concentração de espermatozoides liberados na uretra, após a administração de fármacos como a medetomidina, tornando possível a colheita de sêmen sem ejaculação, fato observado primeiramente em equinos [18,19].

Vários estudos demonstraram que o uso de fármacos α -2-adrenérgicos (detomidina, medetomidina e dexmedetomidina), utilizados na indução anestésica em felinos, levam à liberação espontânea de células espermáticas na uretra, devido à contração causada nos ductos deferentes, facilitando assim a colheita de sêmen nestes animais [20-23, 30, 37].

Dessa forma, foi descrita a técnica de colheita farmacológica de sêmen por cateterismo uretral em gatos domésticos, utilizando-se como protocolo anestésico a associação dos fármacos medetomidina (100 μ g/kg) e cetamina (5mg/kg); e um cateter uretral (Tom cat – 1,0mmx13,0cm), o qual foi inserido a aproximadamente 9,0 cm dentro da uretra, permitindo que o sêmen penetrasse no cateter por capilaridade, resultando na possibilidade de colheita de sêmen sem ejaculação em felinos [20].

Posteriormente, um estudo foi realizado administrando medetomidina ($100\mu\text{g}/\text{kg}$) em uma grande população de gatos domésticos (214 casos) para colheita de sêmen por cateterismo utilizando-se um cateter urinário (Tom cat) inserido 9 cm dentro da uretra. Em seguida foi administrada $5\text{mg}/\text{kg}$ de cetamina para realização de orquiectomia e posterior colheita e avaliação do sêmen do epidídimo. Os resultados obtidos confirmaram a incidência de alto índice de teratospermia nos gatos avaliados, sendo que o sêmen coletado do epidídimo mostrou maior índice de anormalidades, confirmando o método como viável e indicando-o para uso na rotina de avaliação de infertilidade no macho [24].

Em trabalho avaliando-se a criopreservação do sêmen, a colheita farmacológica obteve resultados semelhantes e, em alguns aspectos, até melhores comparados a espermatozoides coletados do epidídimo, indicando que a qualidade do sêmen pós congelamento não diferiu de acordo com a técnica de colheita utilizada [25].

A colheita de sêmen por cateterismo uretral após indução farmacológica apresenta baixo volume de sêmen, porém alta concentração espermática quando comparada a eletroejaculação, que se caracteriza por proporcionar elevado volume de sêmen e baixa concentração espermática [22]. Em estudo comparando as técnicas de colheita de sêmen do epidídimo (Slicing) e colheita farmacológica por cateter uretral os resultados foram similares quanto à capacidade de fertilização, indicando a obtenção de células viáveis para IA ou FIV [26].

A técnica de colheita de sêmen por cateterismo uretral após administração de medetomidina tem sido registrada como uma técnica inovadora, pouco invasiva e com resultados favoráveis. No entanto, ainda existem controvérsias quanto a sua viabilidade. Em trabalho realizado comparando três metodologias de colheita de sêmen (farmacológica, eletroejaculação e epidídimo/Slicing) em gatos domésticos, os melhores resultados foram obtidos com eletroejaculação, sendo a colheita do epidídimo comparável aos resultados obtidos com eletroejaculação e a farmacológica apresentando os piores resultados de acordo com os parâmetros espermáticos avaliados [27].

Outro fator que deve ser levado em conta é a necessidade de altas doses de medetomidina para obtenção do sêmen. Comparando as características de sêmen coletado por cateterismo uretral, utilizando doses de 130 e $50\mu\text{g}/\text{kg}$ de medetomidina, houve comprometimento significativo do volume de sêmen, motilidade e concentrações espermáticas na dose mais baixa ($50\mu\text{g}/\text{kg}$) [28], sendo que alta qualidade do sêmen, apresentando boa concentração espermática apesar do baixo volume, somente foi conseguida com doses iguais ou superiores a $100\mu\text{g}/\text{kg}$ [21, 22, 23, 24, 25].

A necessidade de altas doses de medetomidina pode aumentar os riscos dos efeitos colaterais, especialmente no sistema cardiovascular, podendo inviabilizar sua utilização em alguns animais. Houve significantes efeitos hemodinâmicos no coração de felinos, como redução dos batimentos cardíaco e queda da função sistólica quando a dose de $130\mu\text{g}/\text{kg}$ de medetomidina foi utilizada [29]. Devido a essas razões cada vez mais os estudos avançam no sentido de prover protocolos anestésicos mais seguros.

Uma alternativa seria a utilização da dexmedetomidina por apresentar similaridades a medetomidina quanto à sedação e analgesia, apresentando maior especificidade para alfa-

-2-receptores, e, portanto, necessitando de doses mais baixas. O tratamento com o sedativo dexmedetomidina, para a colheita de sêmen por cateterismo, foi realizado com sucesso em gato doméstico (*Felis catus*) utilizando a dose de 0,025mg/kg de dexmedetomidina associada a 10mg/kg de cetamina IM [30]. Comparação entre a associação cetamina (10mg/kg IM) e xilazina (1mg/kg IM) também foi realizada, indicando que a xilazina, sendo 10 vezes menos específica para α -2-receptores, não exerceu o efeito desejado para colheita de sêmen [30].

Pré-medicação anestésica com 5 μ g/kg de dexmedetomidina em associação a 0,2mg/kg de metadona (IM) proporcionou nível de sedação adequado. A anestesia foi induzida com propofol até atingir plano cirúrgico para que o cateter fosse introduzido. Após a retirada do cateter 15 μ g/kg de atipamezole, antagonista α -2-adrenérgico, foi administrado (IM) para reverter os efeitos da dexmedetomidina [31]. Com este protocolo valores de concentração, motilidade e volume foram similares a dose de 130 μ g/kg de medetomidina e melhores comparados a dose de 50 μ g/kg, porém a concentração foi menor comparada a dose de 100 μ g/kg de medetomidina [28], no entanto, determinou a diminuição de efeitos colaterais, indicando portanto, ser um protocolo mais seguro.

De acordo com os promissores resultados encontrados em gatos domésticos a colheita farmacológica de sêmen por cateter uretral passou a ser aplicada em felinos selvagens. A metodologia foi primeiramente testada em leões (*Panthera leo*) obtendo-se resultados positivos. Para tanto, foi utilizada a dose de 12mg de medetomidina e 150mg de cetamina (IM) em dardos de 3mL, sendo que após 20 a 40 minutos um cateter urinário para cães foi introduzido e guiado por ultrassom até a próstata sem atingir a bexiga urinaria, evitando-se assim a contaminação por urina. Massagem retal adicional e estimulação da próstata durante a ultrassonografia transretal auxiliaram na eliminação de espermatozoides na uretra, tornando a técnica viável para a espécie [32].

Colheita de sêmen farmacológica também foi realizada com sucesso em jungle cat (*Felis Chaus*) 20 a 40 minutos após administração de 1mg de medetomidina e 5mg de cetamina (IM). Um cateter (Tom cat – 2,0mmx130mm) foi introduzido na uretra e guiado por ultrasson até a uretra prostática (~12-14cm) e o sêmen coletado por capilaridade [33].

Em amur leopardo cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*), uma espécie ameaçada de extinção endêmica da Península Coreana, foi possível a colheita de sêmen por cateterismo utilizando-se as doses 0,05mg/kg de medetomidina e 4mg/kg de cetamina, utilizando cateter Tom cat (1,0mmx110mm). Os efeitos da medetomidina foram revertidos imediatamente após a colheita com a aplicação de atipamizole na dose 0,2mg/kg [34].

O primeiro relato de utilização de colheita farmacológica de sêmen em felinos neotropicais ocorreu em onça-pintada (*Panthera onca*) [35,36] e suçuarana (*Puma concolor*) [36], as quais foram anestesiadas com a associação medetomidina (0,08-0,1mg/kg) e cetamina (5mg/kg), sendo que após a colheita o antagonista α -2-adrenérgico atipamizole (0,25mg/kg) foi administrado. Colheita com sonda uretral semi-flexível sem janela lateral para gatos (Tom cat - 1,0mmx130mm) foi realizada 20-40 minutos após anestesia, e possibilitou a sondagem da uretra e a colheita do sêmen. Massagens da próstata via transretal estimulando a glândula

auxiliaram na liberação dos espermatozoides na uretra e consequentemente no aumento do volume do ejaculado. O sêmen coletado apresentou bons resultados quanto as avaliações realizadas (Tabela 2 e 3).

Em estudo realizado com gato-do-mato (*Leopardus guttulus*) verificou-se que a administração intramuscular da associação cetamina (15mg) e Detomidina (0,15mg), com manutenção em anestesia inalatória com Isoflurano (1-2%), foi eficiente para colheita de sêmen por cateterismo, apresentando um volume menor de sêmen com maior concentração, comparados aos dados obtidos por eletroejaculação [37].

Como relatado a metodologia já foi aplicada em diferentes espécies de felinos, no entanto, os protocolos utilizados necessitam da administração de altas doses de detomidina ou medetomidina, para que haja eliminação do sêmen, o que pode aumentar o risco de efeitos colaterais, especialmente no sistema cardiovascular [31,32]. Em estudo realizado em *Leopardus guttulus* a dose de 0,008mg/kg de dexmedetomidina associada a 10mg/kg de cetamina foi eficiente para colheita de sêmen por cateterismo, sendo que o sêmen apresentou bons resultados nas avaliações de motilidade e concentração espermática (Tabela 2 e 3), reduzindo os efeitos colaterais indesejáveis [14].

Por ser uma técnica simples e rápida também pode ser utilizada em associação à eletroejaculação, como alternativa para otimizar a colheita de sêmen em espécies selvagens com interesse reprodutivo. Desta forma, realiza-se primeiramente a sondagem do animal e após a retirada do cateter aplica-se a série de eletrochoques. Isto promove um “esgotamento” do sêmen no animal em um único evento anestésico, obtendo-se assim, um volume maior de sêmen e otimizando material essencial para aplicação das tecnologias de reprodução assistida. Esse “esgotamento” também é **positivo quando aplicado em animais de vida livre**, onde há impossibilidade de capturas sistematizadas para obtenção deste material.

Tabela 2. Doses dos agentes α -2adrenérgicos (medetomidina, detomidina e dexmedetomidina) e do antagonista α -2adrenérgico (atipamizole) utilizados para colheita farmacológica de sêmen por cateter uretral em felinos selvagens.

Espécie	Medetomidina	Detomidina	Dexmedetomidina	Atipamizole
Leão <i>P. leo</i>	12mg ¹	-	-	-
Jungle cat <i>F. Chaus</i>	1mg ²	-	-	-
Amur <i>P. bengalensis</i>	0,05mg/kg ³	-	-	0,20mg/kg ³
Onça-pintada <i>P. onca</i>	0,08-0,1mg/kg ^{4,5}	-	-	0,25mg/kg ^{4,5}
Suçuarana <i>P. concolor</i>	0,08-0,1mg/kg ^{4,5}	-	-	0,25mg/kg ^{4,5}
Gato-do-mato <i>L. guttulus</i>	-	0,15mg ⁶	0,008mg/kg ⁷	-

¹Luerdes et al. 2012 [32], ²Kheirkhah et al. 2017 [33], ³Dong-Hyu et al. 2018 [34], ⁴Araujo et al. 2017 [35], ⁵Araujo 2016 [36], ⁶Paz et al. 2017 [37], ⁷Iglesias 2019 [14].

Tabela 3. Características seminais de felídeos selvagens coletados por cateter uretral após indução farmacológica.

Espécie	Cateter (diâmetro/mm)	Volume (µg)	Concentração (x10 ⁶ /mL)	Motilidade (%)
Leão <i>P. leo</i>	2,6-3,3 ¹	422,86±296,07 ¹	1,94±1,61 ¹	88,83±13,27 ¹
Jungle cat <i>F. Chaus</i>	2 ²	69±27,92 ²	75,13±17,05 ²	77,13±14,15 ²
Amur <i>P. bengalensis</i>	1 ³	6,7±3,7 ³	1698±758 ³	84,1±9,7 ³
Onça-pintada <i>P. onca</i>	1 ^{4,5}	347,2±295,6 ^{4,5}	2635,2±1598,1 ^{4,5}	77,0±11,4 ^{4,5}
Suçuarana <i>P. concolor</i>	1 ⁵	106,7±30,5 ⁵	524,1±54,3 ⁵	70,0±0,0 ⁵
Gato-do-mato <i>L. guttulus</i>	1 ⁶ 1 ⁷	23,0 ⁶ 35,9±19,85 ⁷	1370 ⁶ 552,8±482,13 ⁷	85,0 ⁶ 71,0±18,27 ⁷

¹Luerdes et al. 2012 [32], ²Kheirkhah et al. 2017 [33], ³Dong-Hyu et al. 2018 [34], ⁴Araujo et al. 2017 [35], ⁵Araujo 2016 [36], ⁶Paz et al. 2017 [37], ⁷Iglesias 2019 [14].

Considerações Finais

Com os recentes avanços na utilização de fármacos cada vez mais específicos foi possível inovar as metodologias de coleta de sêmen não ejaculatórias, como na recente técnica de coleta farmacológica de sêmen por cateterismo uretral descrita em felinos, facilitando assim a aplicação das Tecnologias de Reprodução Assistida.

Essa técnica tem apresentado inúmeras vantagens; sendo menos traumática, pouco invasiva e apresentando baixa contaminação por urina em gatos domésticos. Em felinos selvagens, ainda apresenta como vantagem não necessitar de equipamento especializado ou treinamento prévio, sendo uma colheita fácil e rápida de ser realizada, podendo facilmente ser utilizada a campo em animais de vida-livre. Além disso, tem se mostrado eficiente não somente para aplicação das Tecnologias de Reprodução Assistida, mas também para acessar condições clínicas de infertilidade dos machos.

No entanto, os protocolos anestésicos utilizados ainda apresentam alguns efeitos colaterais indesejáveis, indicando que novos protocolos alternativos, mais seguros, para a colheita de sêmen via cateterismo uretral, necessitam ser testados em espécies selvagens.

Referências bibliográficas

- [1] Watson PF, Glover TE. Vaginal anatomy of the domestic cat (*Felis catus*) in relation to copulation and artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility** 1993;47:355-359.
- [2] Sojka NJ, Jennings LL, Hamner CE. Artificial insemination in the cat (*Felis catus*). **Lab Anim Care** 1970;20:198-204.

- [3] Scott PP, Cats. In: Hafez ESE, editor. **Reproduction and breeding techniques for laboratory animals**. Philadelphia: Lea and Febiger; 1970. p.192-208.
- [4] Paz, RCR. **Reprodução de Felinos Domésticos e Selvagens**. 1th ed. Cuiabá: EdUFMT, 2013.
- [5] Platz CC, Seager SW. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **J Am Vet Med Assoc** 1978;173:1353-5.
- [6] Howard JG. Semen collection and analysis in carnivores. In: Fowler ME. **Zoo & Wild Animal Medicine Current Therapy**. 3th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1993. p.390-399.
- [7] Paz RCR, Zugue RM, Barnabe VH, Morato RG, Felipe PAN, Barnabe RC. Capacidade de penetração de semen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em óocitos heterólogos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2000;37(6):462-466.
- [8] Pineda MH, Dooley MP, Martin PA. Long term study on the effects of electroejaculation o seminal characteristics of the domestic cat. **Am J Vet Res** 1984;45:1038-40.
- [9] Zambelli D, Cunto M. Semen collection in cats: techniques and analysis. **Theriogenology** 2006;66:159-65.
- [10] Pineda MH, Dooley MP. Effect of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat. **Am J Vet Res** 1984;45:1520-1525.
- [11] Martin, I.C.A. The principles and practice of eletroejaculation of mammals. **Symposium of Zoological Society of London**, 1978;43:127-152.
- [12] Furthner E, Cordonnier N, Le Dudal M, Fontbonne A, Freiche V. Is electroejaculation a safe procedure in cats? An endoscopic and histological prospective blinded study. **Theriogenology** 2018;119:69-75.
- [13] Morais RN. Reproduction in small felid males. In: Folwer ME; Cubas ZS, editors. **Biology, medicine and surgery of south American wild animals**. 1th ed. AMES: Iowa State University Press; 2001. p-312-316.
- [14] Iglesias GA. Comparação entre coletas de sêmen em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*) pelos métodos de cateterismo uretral e electroejaculação. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Mato Grosso; 2019.
- [15] Iranpour FG, Valojerdi MR. The epididymal sperm viability, motility and DNA integrity in dead mice maintained at 4-6°C. **Iranian Journal of Reproductive Medicine** 2013;11:195-200.
- [16] Lengwinat T, Blottner S. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science** 1994;35:291-301.
- [17] MacDonald A, McGrath JC. The distribution of adrenoceptors and other drug receptors between the two ends of the rat vas deferens as revealed by selective agonists and antagonists. **Br J Pharmacol** 1980;71:445-458.
- [18] Turner RMO, McDonnell SM, Hawkins JF. Use of pharmacologically induced ejaculation to obtain semen from stallion with a fractured radius. **JAVMA** 1995;12:1906-8.
- [19] Mc Donnell SM, Odian MJ. Imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. **Theriogenology** 1994;41:1005-1010.
- [20] Zambelli D, Prati F, Merlo B, Cunto M. Collection of semen by urethral catheterization after pharmacologically induced spermatozoa releasing in the domestic cat. In: 5th biannual congress, European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR) 2006. p. 300.
- [21] Zambelli D, Cunto M, Prati F, Merlo B. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. **Theriogenology** 2007;68:796-803.
- [22] Zambelli D, Prati F, Cunto M, Lacono E, Merlo B. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. **Theriogenology** 2008;69:485-90.
- [23] Zambelli D, Raccagni R, Cunto M, Andreani G, Isani G. Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. **Theriogenology** 2010;74:1396-1402.

- [24] Prochovska S, Nizański, W Ochota M, Partyka A. Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats – A retrospective study of 214 cases. **Theriogenology** 2015;84:1565–1571.
- [25] Prochowska S, Nizanski W, Partyka A. Comparative analysis of *in vitro* characteristics of fresh and frozen-thawed urethral and epididymal spermatozoa from cats (*Felis domesticus*). **Theriogenology** 2016; 86:2063-2072.
- [26] Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, Zambelli D, Anastasi P, Hoogewijs M, Van Soom A. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: A comparison of two collection techniques. **Theriogenology** 2010;74:31–39.
- [27] Jelinkova K, Vitasek R, Novotny R, Bartoskova A. A comparison of quality parameters of fresh feline ejaculates collected by three different collection techniques. **Reprod Dom Anim** 2018;1–7.
- [28] Cunto M, Keuster DG, Bini C, Cartolano C, Pietra M, Zambelli D. Influence of different protocols of urethral catheterization after pharmacological induction (Ur.Ca.P.I.) on semen quality in the domestic cat. **Reprod Dom Anim** 2015;50:999–1002.
- [29] Romagnoli N, Zambelli D, Cunto M, Lambertini C, Ventrella D, Toaldo MB. Non-invasive evaluation of the haemodynamic effects of high dose medetomidine in healthy cats for semen collection. **J Feline Med Surg** 2016;18:337–343.
- [30] Swanson WF, Bateman HL, Vansandt LM. Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. **Reprod Dom Anim** 2016;51(Suppl. 3):1-6.
- [31] Pisu MC, Ponzio P, Rovella C, Baravalle M, Veronesi MC. Usefulness of an injectable anaesthetic protocol for semen collection through urethral catheterisation in domestic cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery** 2017;19(10):1087–1090.
- [32] Lueders I, Luther I, Scheepers G, Van der Horst G. Improved semen collection method for wild felids: urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). **Theriogenology** 2012;78:696–701.
- [33] Kheirkhah MS, Mollapour sisakht M, Mohammadsadegh M, Moslemi HR. Sperm evaluation of Jungle Cat (*Felis chaus*) obtained by urethral catheterization (CT) after medetomidine administration. **Theriogenology** 2017;91:17-20.
- [34] Dong-Hyuk J, Jeong-Ho K, Ki-Jeong N. Characterization and cryopreservation of Amur leopard cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) semen collected by urethral catheterization. **Theriogenology** 2018;119:91-95.
- [35] Araujo GR, Paula TAR, Deco-souza T, Morato RG, Bergo LCF, Silva LC, Sampaio D. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. **Animal Reproduction Science** 2017;195:1-7.
- [36] Araujo GR. **Criopreservação de sêmen de grandes felinos, mantidos em cativeiro e capturados em vida livre com o uso de armadilhas de laço**. 2016. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa; 2016.
- [37] Paz R C R, Adania C H, Paulino J S, Iglesias G A, Vansandt L, Swanson W F. Descrição de coleta de sêmen em Leopardus guttulus pelo método de cateterismo uretral. **Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)** 2017:119.

Biotecnologia para processamento de sêmen de cães: refrigeração e transporte

Isabel Candia Nunes da Cunha

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
cunhaicn@uenf.br

Abstract: The interest in breeding of dogs, both for the purpose of breeding or as an experimental model for the preservation of wild canids, is a wide field for Veterinarians. As in other domestic animal species, cooling to 4–5°C is an appropriate method for short term preservation of diluted semen. The procedure is a suitable option for semen shipping in connection with artificial insemination solving the problems of transport distance and sanitary borders. Self-made, usually based in skim milk and/or egg yolk, and commercial extenders diluents are widely used for chilling and transporting semen. A range of commercial systems for semen preservation and transport are currently available in the market, however, semen shipment should occur as rapidly as possible and environmental temperature fluctuations could influence semen quality. When chilled semen is used in up to 24 hs for artificial insemination procedure, fertility rates comparable to when we use fresh semen in an artificial insemination procedure could be expected.

Keywords: dog, sperm, chilling, shipment.

Palavras-chave: cão, semen, refrigeração, transporte.

Introdução

O interesse na reprodução dos cães, tanto com objetivo de melhoramento e difusão de diferentes raças ou como modelo experimental para a preservação de canídeos silvestres é um vasto campo para os Médicos Veterinários da atualidade. Para que os Médicos Veterinários possam atingir esta fatia do mercado com sucesso faz-se necessário estudo e o aprimoramento de biotecnologias de avaliação, manipulação e conservação do sêmen dos canídeos, assim como, o conhecimento e controle do ciclo estral, com desenvolvimento de métodos precisos para a detecção da ovulação e de técnicas acessíveis e menos cruentas para o depósito do sêmen no trato genital da fêmea.

Os primeiros animais gestantes por inseminação artificial (IA) foram cães, inseminados com sêmen a fresco, em estudos conduzidos pelo abade Lazzaro Spallanzani no ano de 1780, na Itália. Provenientes desta experiência nasceram três produtos vivos e normais [1]. A IA com sêmen fresco em cães é ainda hoje utilizada em substituição à cobertura natural, nos casos onde se deseja a reprodução de mais de uma fêmea com um único ejaculado, ou realização de cobertura entre cães que não se acasalam naturalmente com excelentes resultados [2].

Na década de 50, uma gestação decorrente de IA com sêmen canino preservado em leite pasteurizado e refrigerado por sete dias, foi descrito por Harrop (1954). A refrigeração é um processo de preservação do sêmen a uma temperatura de 5°C por um período determinado, necessário em alguns casos como, quando o macho e a fêmea se encontram em lugares distantes, de difícil acesso, ou nos casos de impedimento legal da entrada de animais em outro estado ou país, antes de um determinado período de observação. Podemos ainda utilizar o sêmen refrigerado, quando pretendermos utilizar um ejaculado em mais de uma inseminação artificial para várias fêmeas ou em vários dias de inseminação de uma mesma fêmea [1].

A técnica de preservação de sêmen mais estudada em cães é a congelação do sêmen, tendo sido Rowson (1954) a descrever o 1º sucesso na congelação de sêmen canino. Coincidentemente, Seager (1969) anunciou a primeira prenhez, resultante de uma inseminação artificial com sêmen congelado em cães [3]. Entretanto, existem ainda algumas dificuldades encontradas na padronização desta metodologia para o sêmen canino, devido, principalmente, as particularidades inerentes à espécie. Estudos realizados com sêmen congelado de cães mostraram que, aparentemente, o espermatozoide descongelado não demonstra a mesma motilidade e vigor do sêmen fresco ou refrigerado [4;5], conseqüentemente, a sobrevivência no trato genital feminino é reduzida, sendo necessárias técnicas mais aprimoradas para o depósito do sêmen no trato reprodutivo da fêmea para que resultados otimizados sejam atingidos [6].

A diminuição da temperatura leva a célula a um estado de quiescência, reduz o metabolismo e proporciona diminuição de gastos energéticos e da produção de catabólitos tóxicos, o que contribui para a preservação celular. Entretanto, da mesma maneira que a refrigeração pode diminuir ou paralisar algumas reações bioquímicas celulares, pode, também, acelerar outras, levando a danos ou mesmo a morte celular [3].

O termo Estresse Térmico, ou Choque Térmico, define um conjunto de alterações ocorridas nos espermatozoides dos mamíferos quando resfriados rapidamente da temperatura corpórea até temperaturas próximas a 5°C, que tem como consequência um decréscimo irreversível da motilidade espermática, mudanças na bioquímica e no funcionamento das células espermáticas incluindo: diminuição da taxa da glicólise, da respiração celular e da frutólise, aumento na degeneração do ácido desoxirribonucléico e liberação de material intracelular. A maioria das alterações causadas pelo estresse térmico se inicia na membrana espermática. A alteração da temperatura, assim como alterações de osmolaridade, pressão ou pH podem determinar mudanças na estrutura e organização da bicamada de fosfolipídios. A redução de temperatura de 37°C a valores próximos de 4-5°C, que é a temperatura de refrigeração do sêmen canino, pode levar ao rearranjo de alguns fosfolipídios semelhantes dentro da bicamada, que podem agrupar-se e assumir configuração hexagonal do tipo II, na qual, as cabeças polares hidrofílicas dos fosfolipídios se agrupam formando micelas, com suas caudas hidrofóbicas voltadas para o lado externo. Com este rearranjo as propriedades básicas da membrana biológica, como permeabilidade seletiva e difusão lateral de proteínas, não são mantidas alterando a funcionalidade da membrana em questão [3].

Em muitas espécies animais a refrigeração a 4-5°C é um método viável para preservação de sêmen por curtos períodos e na espécie canina é um método opcional para transporte de

sêmen, para resolver problemas que envolvem deslocamento de um dos membros do casal e/ou processos de quarentenas, devido exigências sanitárias [7].

Diluidores para refrigeração de sêmen, em geral, são constituídos de gema de ovo e/ou leite, em composição similar ou igual à receita original publicada por Kenney et al. em 1975 [8]; estes podem ser manipulados no laboratório, a partir de fórmulas descritas na literatura, ou adquiridos de empresas comerciais [9]. Os manipulados no laboratório possuem a vantagem do conhecimento detalhado de todos os seus componentes e resultam em taxas de prenhez comprovadas, mas impõe o inconveniente da necessidade do material e laboratório dentro das especificações necessárias para sua produção, já os diluidores comerciais podem ser facilmente adquiridos e apresentam resultados constantes de fertilidade na comparação entre diferentes laboratórios [9].

Caixas de transporte comerciais são uma excelente opção para transporte de sêmen de cães visto que são descartáveis e não exigem retorno ao Médico Veterinário que realiza a remessa de sêmen. Cunha e colaboradores [10] realizaram estudo que objetivou verificar a estabilidade da temperatura interna em caixas comerciais submetidas a condições extremas de temperatura, mimetizando condições tropicais (40°C), e demonstraram que a temperatura interna das caixas é claramente influenciada pela temperatura ambiente. Neste estudo, por meio de observações seriadas da temperatura no interior das caixas de transporte, verificaram que a temperatura das amostras variou de 0,5 °C (nas primeiras 2h de estocagem, nas caixas mantidas sob temperatura ambiente) até 37°C (após 48hs de estocagem da caixa sob 40°C), e alertaram para o fato de que flutuações de temperatura no interior da caixa são prejudiciais a durabilidade das características seminais, desta forma devemos sempre levar em consideração a interação entre a caixa de transporte, a amostra e o ambiente ao qual ela será submetida.

Quando se opta pela inseminação artificial com sêmen refrigerado, proveniente de transporte ou não, métodos mais sensíveis para a detecção da ovulação devem ser utilizados, como a dosagem sérica de progesterona ou ainda controle ultrassonográfico da maturação folicular, e ainda, devem ser preconizadas técnicas de deposição do sêmen no trato genital da fêmea que assegurem boas taxas de fertilidade. Em geral, as taxas de fertilidade após uma inseminação com sêmen refrigerado por 24 horas são similares as obtidas com a inseminação artificial com sêmen a fresco [2], enquanto que as taxas de fertilidade de inseminações artificiais com sêmen submetido ao armazenamento e/ou transporte maior do que 48 horas podem ser diminuídas.

Considerações Finais

A refrigeração do sêmen canino é a técnica de escolha para preservar o sêmen canino por um tempo curto, assim como para transporte de amostras a curtas distâncias. Quando forem utilizadas caixas comerciais de transporte de sêmen devem ser avaliadas não só a temperatura em que a amostra foi enviada, mas também as temperaturas ambientais a que estas amostras serão submetidas.

Referências bibliográficas

- [1] Cunha ICN, Lopes MD. Estudo do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores a base de leite e glicina-gema. *Revista de Educação Continuada do Crmv Sp, São Paulo*, v. 3, n. 1, p. 37-42, 2000.
- [2] Santos MC, Rocha AA, Quirino CR, Cunha ICN. A eficácia dos testes in vitro de sêmen para prever o sucesso da prenhez após a inseminação artificial na cadela. *Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), Uberlândia, MG, 09 a 10 de junho de 2017* [recurso eletrônico] / organizado por Juliana Corrêa Borges Silva ... [et al.]. – Dados eletrônicos. – Corumbá: Embrapa Pantanal, 2017. 201 p. (Documentos / Embrapa Pantanal, ISSN 1981-7223 ; 146).
- [3] Cunha ICN. Criopreservação do sêmen de cães. Botucatu, 2002. 149p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- [4] Linde-Forsberg C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in dog. *Semin. Vet. Surg. Small Anim.*, v.10, p.58, 1995.
- [5] Fuente-Lara A, Hesser A, Christensen B, Gonzales K, Meyers S. Effects from aging on semen quality of fresh and cryopreserved semen in Labrador Retrievers. *Theriogenology* 132 (2019) 164-171.
- [6] Mason, SJ. A retrospective clinical study of endoscopic- assisted transcervical insemination in the bitch with frozen-thawed dog semen *Reprod Dom Anim* 2017; 52 (Suppl. 2): 275-280.
- [7] Rodenas C, Parrilla, Roca J, Martinez EA, Lucas X. Quality of chilled and cold-stored (5°C) canine spermatozoa. *Theriogenology* 82 (2014) 621-626.
- [8] Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* 107 (2008) 268-275.
- [9] Goericke-Pesch S, Klaus D, Failing K, Wehrend A. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Animal Reproduction Science* 135 (2012) 97-105.
- [10] Cunha ICN.; Henning H, Urhausen C, Beyerbache M, Günzel-Apel AR. A commercial box for dog semen transport: What happens inside when the environmental temperature is increasing? *Animal Reproduction Science* 147 (2014) 86-92 87.

Sêmen sexado: como incrementar os índices de fertilidade?

Gabriel Armond Crepaldi^{1,2}
gcrepaldi@strepro.com.br

Marcos Gouveia Pertegato²
Pietro S. Baruselli¹
José Nélio S. Sales³

Abstract: This review aims to present the history of development of sexed semen in AI and Timet AI programs and with its advances in laboratory development and managements and protocols. Based on the presented data, it is verified that the pregnancy ratio between conventional and sexed semen that was approximately 60% could reach 90% in some bulls with an average of 80%. In addition, it is possible to perform an Timed AI protocol with 3 managements and the most appropriate time to perform the insemination is 60 hours after the removal of the device (10 to 12 hours before ovulation). New means of production and new concentrations per dose were tested. The mean called Ultra was more efficient than the previous ones and the concentration of 4 million cells the most viable. Therefore, the use of sexed semen in insemination programs is in constant progress and each time more viable.

Keywords: semen, sexed, Timed AI, artificial insemination.

Palavras-chave: sêmen, sexado, IATF, inseminação artificial.

Introdução

A determinação do sexo em bovinocultura de corte e de leite pode ser um dos fatores determinantes para melhorar o desempenho produtivo e econômico da atividade. Em fazendas produtoras de leite, o principal foco está na geração de fêmeas. Porém, em fazendas de corte comerciais, o macho é o sexo de interesse devido maior potencial de produção. Em fazendas de corte mais tecnificadas, busca-se a produção de fêmeas nas melhores vacas com o objetivo de incrementar o melhoramento genético e produção de machos nas piores vacas com o objetivo de melhorar a produtividade e não reproduzir genética inferior. Considerando os diferentes objetivos de produção, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de se prever e/ou manipular a proporção do sexo dos bezerros. Uma biotecnologia já disponível em escala comercial é a utilização do sêmen sexado. A separação dos espermatozoides Y dos espermatozoides X é possível devido às diferenças no conteúdo do DNA das células espermáticas, sendo realizada por citometria de fluxo. Existem diferenças entre as raças de bovinos quanto quantidade DNA presente no cromossomo Y e essas dife-

¹ Universidade de São Paulo.

² ST Repro.

³ Universidade Federal de Lavras.

renças devem ser levadas em consideração quando do emprego dessa tecnologia. (Revisado em Garner, 2006).

Pesquisas realizadas com novilhas indicam que a taxa de concepção após observação de cio e IA com sêmen sexado é de cerca de 70 a 90% da taxa atingida após o uso de sêmen convencional (revisado em: Seidel et al., 1999). Seidel et al. (1999) relataram, em uma combinação de vários experimentos, que as taxas de concepção de novilhas holandesas inseminadas com sêmen sexado variaram de 40% a 68% e com sêmen convencional de 67% a 82%. Porém, Seidel e Schenk (2008) observaram que, apesar da taxa de prenhez ser menor no sêmen sexado, a variação dessa taxa foi maior no sêmen convencional (43 a 62%) do que no sêmen sexado (31 a 42%). Desta forma, essa revisão tem como objetivo apresentar informações de pesquisas que avaliaram a utilização de sêmen sexado após a detecção de cio ou tempo fixo.

Adequação do momento da IA

Uso da radiotelemetria (Heat Watch) para a detecção do cio em programas de IA com sêmen sexado.

A utilização do sêmen sexado em novilhas Jersey inseminadas em diferentes momentos em relação ao início do cio identificado por radiotelemetria (Heat Watch®) foi avaliada por Sá Filho et al., 2010a. Nesse estudo 638 novilhas Jersey foram inseminadas em diferentes momentos após o início do cio (12 a 16h; 16 a 20h; 20 a 24h e 24 a 30h). A taxa de concepção foi maior ($P=0,03$) nas novilhas inseminadas entre 16 e 24 horas em relação às inseminadas entre 12 e 16 horas. Valores intermediários foram obtidos em inseminações realizadas entre 24 e 30 horas após o início do cio (Figura 1).

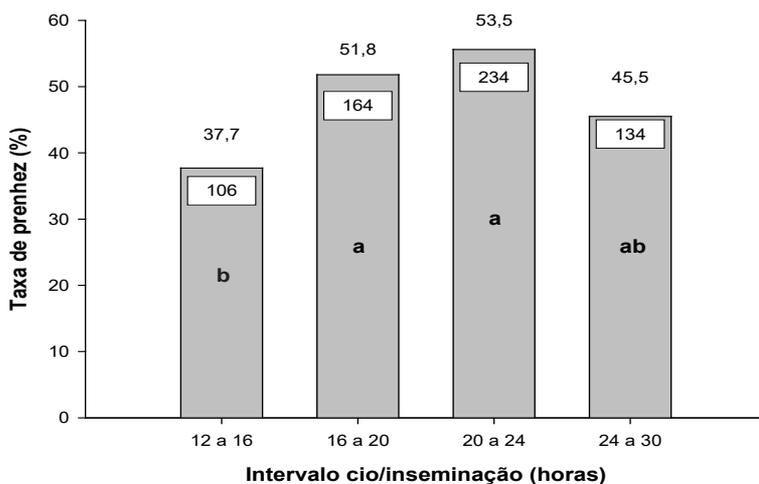


Figura 1. Taxa de concepção de novilhas Jersey de acordo com o intervalo entre início do cio e inseminação utilizando sêmen sexado ($a \neq b$; $P < 0,05$).

Em outro estudo realizado, Sales et al. (2010) avaliaram a utilização do sêmen sexado ou convencional de três diferentes touros em novilhas Jersey inseminadas após o início do cio identificado por radiotelemetria (Heat Watch®). Foi observada maior taxa de concepção para o sêmen convencional [64,2% (238/371)] em relação ao sêmen sexado [49,5% (189/382); $P = 0,001$]. Além disso, houve efeito de touro na taxa de concepção [Touro A = 50,0% (108/216) b; Touro B = 63,4% (211/333)a e Touro C = 53,5% (107/200)b; $P=0,008$]. Desta forma, é possível notar que alguns touros apresentaram menores diferenças na taxa de concepção quando a inseminação artificial foi realizada com sêmen sexado ou convencional (Figura 2).

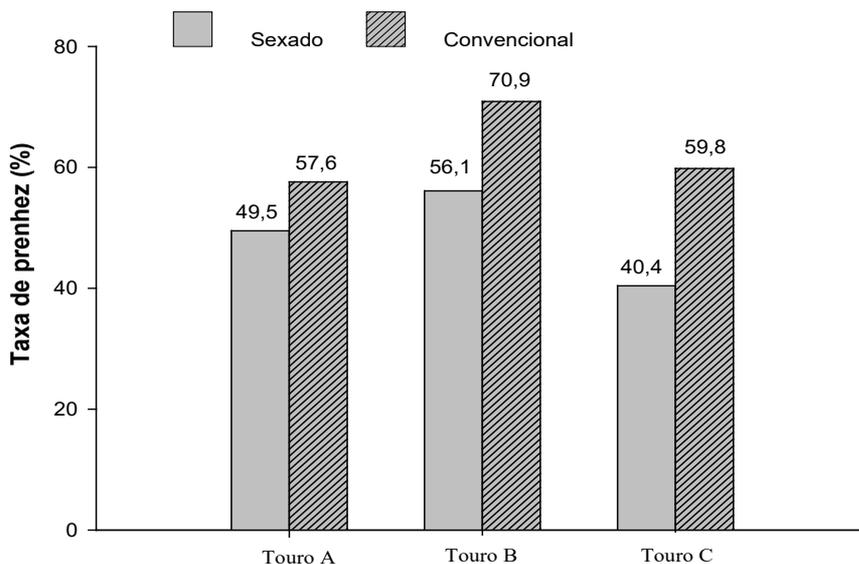


Figura 2. Taxa de concepção de novilhas Jersey submetidas à inseminação artificial de acordo com o touro (A, n=216; B, n= 333 e C, n=200) e o tipo de sêmen (sexado ou não sexado). Verificou-se efeito de touro ($P = 0,008$) e de sêmen ($P = 0,001$).

Os resultados são indicativos de que a adequação do momento das inseminações em relação ao início do cio melhora a taxa de concepção, apesar do processo de sexagem estar reduzindo a eficiência da técnica em novilhas. Vale ressaltar a diferença individual de fertilidade entre touros. (Revisado Borchersen e Peacock, 2009).

IA com sêmen sexado após a detecção de cio

A taxa de concepção após o uso de sêmen sexado atinge cerca 80% da taxa de concepção em inseminações com sêmen convencional (DeJarnette et al., 2008), sendo encontrado em outro estudo, 70% em novilhas e 83% em vacas (Norman et al., 2010). Apesar dos menores índices de prenhez, a utilização do sêmen sexado foi efetiva em aumentar a quantidade de produtos do sexo desejado (sexado = 90%; convencional = 49%).

A menor quantidade de espermatozoides por dose de sêmen sexado poderia ser outro fator envolvido com a redução nos índices de fertilidade. Um primeiro estudo, Bodmer et al., (2005), utilizando a mesma concentração de espermatozoides por inseminação em vacas em lactação, obteve taxas de concepção semelhantes entre as fêmeas inseminadas com sêmen sexado (27.6%, n=105) ou convencional (28.1%, n=64). Sá Filho et al., 2010a avaliou a utilização de dupla inseminação em novilhas Jersey recebendo o primeiro, segundo ou terceiro serviço. As novilhas (n=576) foram distribuídas em três tratamentos (1Dose12h, 2Dose12h ou 2Dose12/24h). Nos grupos 1Dose12h (n=193) ou 2Dose12h (n=193) as novilhas foram inseminadas com uma ou duas palhetas contendo 2.1 milhões de espermatozoides 12 horas após a detecção de cio, respectivamente. O grupo 2Dose12/24h (n=190) as novilhas receberam duas doses com 12 horas de intervalo entre as inseminações (primeira 12 horas e a segunda 24 horas após a detecção do cio). Não foram observadas diferenças entre os grupos na taxa de concepção [1Dose12h= 45.1%; 2Dose12h= 44.0%; 2Dose12/24h= 49.5%]; P=0.51]. Entretanto, verificou-se efeito significativo do número de serviços (P=0.004) na taxa de concepção [Primeiro= 55.3%a; Segundo= 46.1%a; Terceiro= 34.8%b; P=0.004]. Portanto, em novilhas Jersey, o aumento da quantidade de espermatozoides por inseminação após observação de cio de 2,1 para 4,2 milhões e a realização da IA em dois momentos com intervalo de 12 horas não alteram a taxa de concepção.

Outra possibilidade para tentar aumentar a taxa de concepção de novilhas inseminadas com sêmen sexado seria a utilização de GnRH no dia da inseminação artificial. Em estudo conduzido por Sá Filho et al. (2010a), os autores observaram que o tratamento com GnRH no dia da inseminação artificial com sincronização prévia com duas prostaglandinas não melhora a taxa de concepção em novilhas Jersey inseminadas com sêmen sexado [GnRH= 47.2% (100/212) vs. Não GnRH= 51.7 % (104/201); P=0.38].

Outro possível fator que poderia influenciar a taxa de prenhez utilizando sêmen sexado seria o local de deposição no útero. Em novilhas de leite, Kurykin et al. (2007) compararam a taxa de prenhez em diferentes locais de deposição do sêmen sexado no trato uterino. Nesse experimento, as novilhas foram inseminadas 80-82h após a segunda dose de PGF2 α (primeira dose de PGF2 α 14 dias antes da segunda dose) com sêmen sexado (2.2 x 10⁶ espermatozoides/palheta). O lado do ovário com o folículo pré-ovulatório determinado por exame ultrassonográfico. As taxas de prenhez foram similares entre os diferentes locais de deposição do sêmen sexado no trato uterino de novilhas de leite.

Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com sêmen sexado

Poucas publicações tentam relacionar taxas de concepção após o uso de sêmen sexado em vacas de corte e de leite inseminadas em tempo fixo. Uma hipótese para a diminuição dos índices de fertilidade após o uso de sêmen sexado é o menor tempo de viabilidade, associado com diferentes padrões de motilidade espermática (Schenk et al., 2006). Alguns autores relataram que o sêmen sexado necessita de menos tempo para a capacitação devido ao processo de sexagem por meio da separação por citometria de fluxo (Lu et al., 2004). Uma das possibilidades de diminuir a variação do momento da ovulação é o emprego de técnicas de sincronização, o

que poderia colaborar na eficiência de programas de inseminação artificial com sêmen sexado. Vacas de corte e de leite sincronizadas com progestágenos e estradiol ovulam cerca de 70-72h após a retirada dos implantes (Souza et al., 2006, Baruselli et al., 2006, Sales et al., 2012).

Otimizações de Manejo e protocolos

Baseado nestas evidências, um primeiro estudo em vacas Nelore (*Bos indicus*, n=389) paridas entre 30 e 60 dias, no qual a inseminação foi realizada em tempo fixo com o sêmen convencional (40×10^6 espermatozoides/dose) ou com sêmen sexado (2.1×10^6 espermatozoides/dose) em dois diferentes momentos relativos à retirada do implante auricular contendo 3mg de Norgestomet, 54h ou 60h. Nossa hipótese foi que a IATF próxima à ovulação aumentaria a taxa de concepção utilizando sêmen sexado por apresentar menor período de viabilidade e tempo para capacitação no trato reprodutivo. Nesse experimento, o sêmen foi preparado levando em consideração cada ejaculado. No laboratório, os ejaculados foram divididos, sendo metade submetida ao congelamento tradicional e a outra metade, ao processo de sexagem seguida de congelamento. Não foi observada diferença na taxa de concepção quando a IATF com sêmen sexado foi realizada 60 horas após a retirada do implante de norgestomet (Figura 3). Além disso, constatou-se que não houve diferença estatística na taxa de concepção entre o uso do sêmen convencional (58,9%), sexado-X (52,0%) e sexado-Y (49,0%), indicando eficiência semelhante para o sêmen sexado em ambos os sexos. Os resultados da sexagem fetal realizados por ultrassonografia 60 dias após IATF demonstraram 93,9% de eficiência de obtenção do sexo desejado. Apesar de não ter sido verificada diferença estatisticamente significativa, o atraso na IATF aumentou 9,0% a taxa de concepção no grupo de animais inseminados com o sêmen sexado.

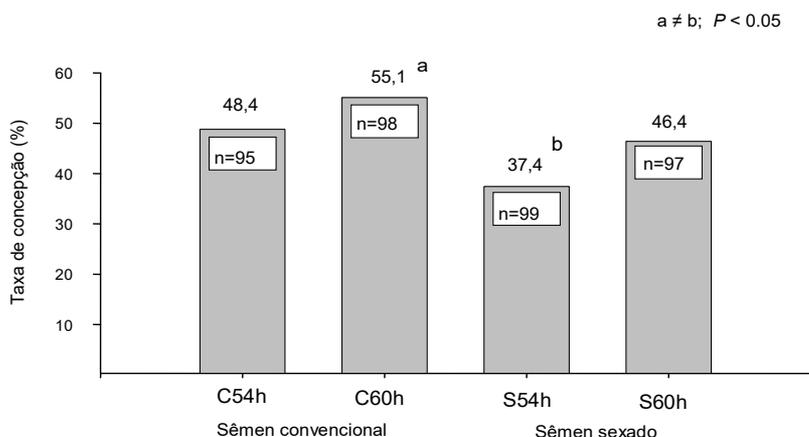


Figura 3. Efeito do momento da IA (54h ou 60h após a retirada do implante auricular contendo Norgestomet) e do tipo de sêmen (convencional ou sexado) na taxa de concepção após IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) pós-parto.

Com base nos resultados do experimento anterior, outro estudo foi realizado para verificar o efeito de maior atraso para a realização da IATF (60 vs 64 horas após a retirada; Souza et al., 2008). Foram utilizadas 383 vacas Nelore com período pós-parto de 50 dias. O sêmen foi preparado seguindo o mesmo delineamento dos experimentos anteriores. Os resultados demonstram que ocorre redução na taxa de concepção quando a IATF é realizada 64 horas após a retirada do implante (figura 4). Assim, os resultados sugerem que o momento mais adequado para realização da IATF com sêmen sexado possa ser 60h da retirada da fonte de progesterona /progestágeno (10 a 12 horas antes da ovulação).

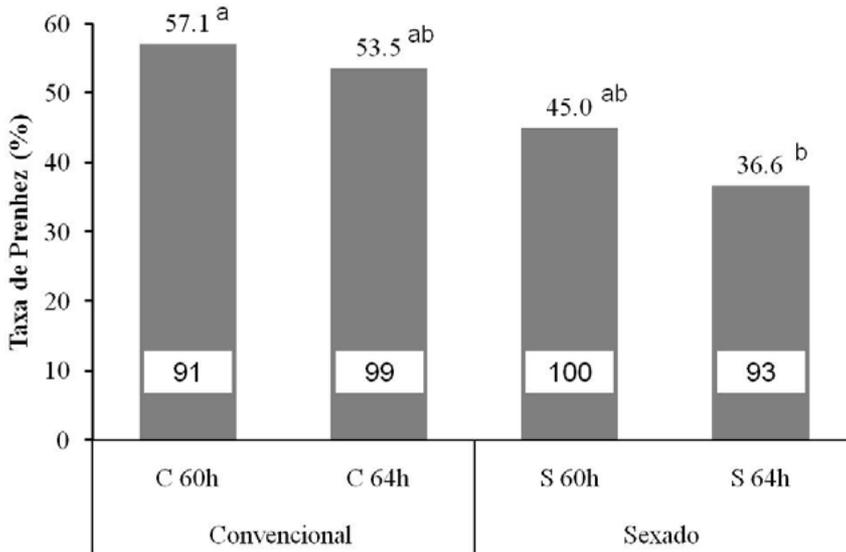


Figura 4. Efeito do momento da IA (60h ou 64h após a retirada do implante de progestágeno) e do tipo de sêmen (convencional ou sexado) na taxa de concepção após IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) no pós-parto.

Em função dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, Neves, (2010) avaliou qual seria o melhor momento para realizar a IATF com sêmen sexado em relação ao momento da ovulação. Nesse estudo, 339 vacas de cortes lactantes foram distribuídas aleatoriamente para receber a IATF com sêmen sexado 36, 48 ou 60 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Exames ultrassonográficos foram realizados de 12/12 horas em todos os animais para determinar o momento da ovulação. As ovulações ocorreram em média $71,8 \pm 7,8$ horas após a retirada do dispositivo. Observou-se maior taxa de prenhez nas vacas inseminadas próximas à ovulação. Os resultados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Risco de prenhez de acordo com o intervalo entre a IATF e a ovulação em vacas de corte lactantes inseminadas com sêmen sexado (adaptado de Neves, 2010).

Intervalo IATF /ovulação	Taxa de prenhez (%) No./No.	Risco de prenhez (95% IC) ¹	P
> 24	5,8 5/87 ^c	0,24 (0,08-0,70)	<0,01
> 12 a 24	19,4 21/108 ^b	Referência	
> 0 a 12	37,9 36/95 ^a	2,34 (1,22-4,51)	0,01
Após a ovulação	36,4 8/22 ^{ab}	1,80 (0,64-5,03)	0,27

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna, difere estatisticamente (P < 0.05).

¹ IC = Intervalo de confiança.

Em outro estudo realizado no Texas – EUA, avaliou-se o efeito do atraso no momento da IATF (60 horas após a retirada) com sêmen sexado em novilhas Jersey cíclicas sincronizadas e inseminadas em tempo fixo (Sales et al., 2011). Os animais foram sincronizados com P4+ BE + PGF no dia 0; retirada do implante + PGF no dia 8; BE no dia 9 e IATF no dia 10 (54 ou 60 horas da retirada do implante). Houve uma tendência a haver interação entre o tipo de sêmen e o momento da IATF na taxa de concepção (P=0,06), sendo observado aumento na taxa de concepção quando a IATF foi realizada com sêmen sexado 60 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. No entanto, esse efeito não foi verificado para o sêmen convencional (Figura 5).

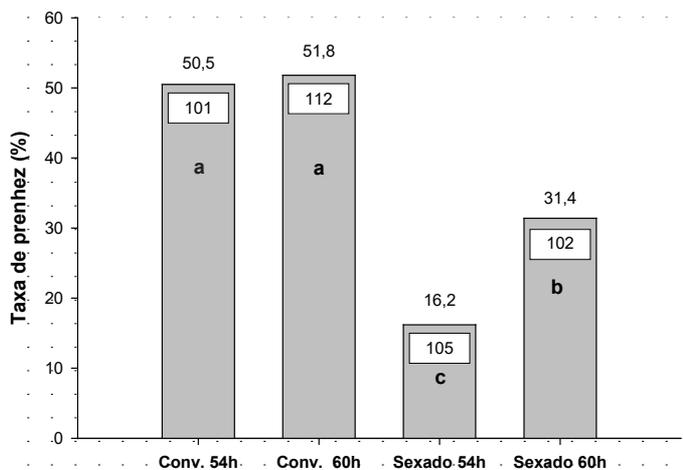


Figura 5. Efeito do momento da IA (54h ou 60h após a retirada do dispositivo de progesterona; 16 a 18 h ou 10 a 12 h antes da ovulação) e do tipo de sêmen (sexado e convencional) na taxa de concepção após IATF em novilhas Jersey.

Nesse experimento foram empregados 3 touros. Verificou-se diferença na taxa de concepção entre os touros utilizados no experimento, indicando mais uma vez que pode haver diferenças entre reprodutores quando da utilização de sêmen convencional e sexado (Figura 6).

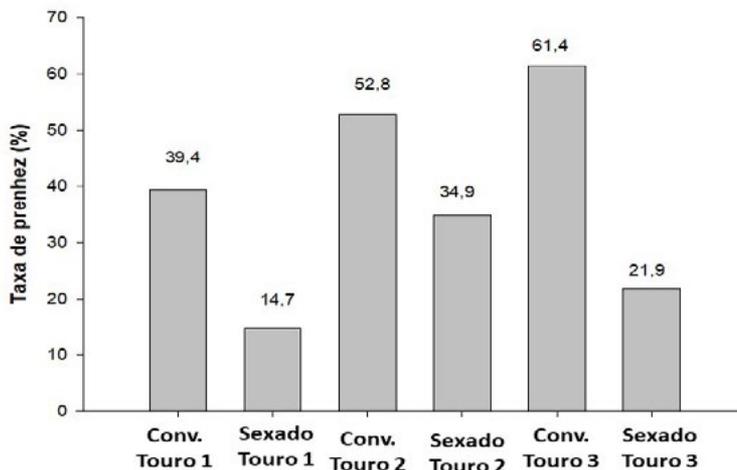


Figura 6. Taxa de concepção de Novilhas Jersey inseminadas em tempo fixo de acordo com o touro e o tipo de sêmen (sexado ou convencional). Verificou-se efeito de touro ($P = 0,001$) e de sêmen ($P = 0,001$).

Após a determinação do melhor momento para a realização da IATF com sêmen sexado, outros estudos foram realizados com o objetivo de verificar o efeito do diâmetro folicular no momento da IATF e a expressão de estro na taxa de concepção. Estudos anteriores demonstraram que fêmeas com folículo de maior diâmetro no momento da IATF (Sá Filho et al., 2010b) e vacas que expressaram estro antes da IATF (Sá Filho et al., 2011) apresentam melhores índices de concepção com sêmen convencional.

Quando essa metodologia (diâmetro do folículo na IATF) foi empregada utilizando sêmen sexado (Sá Filho et al., 2012) observou-se interação ($P=0,02$) entre o tipo do sêmen e o tamanho do folículo dominante [Convencional $\geq 9\text{mm} = 58,9\%$ (126/214); Convencional $< 9\text{mm} = 49,5\%$ (101/204); Sexado $\geq 9\text{mm} = 56,8\%$ (134/236) e Sexado $< 9\text{mm} = 31,2\%$ (59/189); Figura 7]. Nesse estudo, verificou-se que a diferença entre os tipos de sêmen (convencional e sexado) na probabilidade de prenhez aos 30 dias pós IATF diminuiu à medida em que o diâmetro dos folículos na IATF aumenta ($P=0,001$; Figura 8). No estudo em que se avaliou a expressão do estro em protocolos de IATF com sêmen sexado, verificou-se que não houve interação entre o tipo do sêmen e a ocorrência de estro entre a retirada do dispositivo de progesterona e a IATF ($P=0,87$; Figura 9). Porém, verificou-se diferença estatística entre sêmen convencional e sexado ($P=0,05$) e entre a ocorrência de estro ou não ($P=0,003$) na taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF.

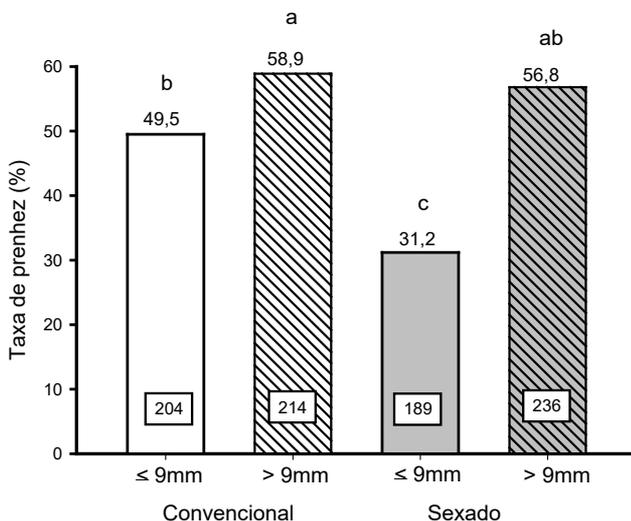


Figura 7. Taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* de acordo com o tipo de sêmen (convencional ou sexado) e o diâmetro do FD (≤ 9 mm ou > 9 mm) na IATF. Verificou-se interação entre o tipo de sêmen e o diâmetro do FD na IATF ($P = 0,02$). a,b,c Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

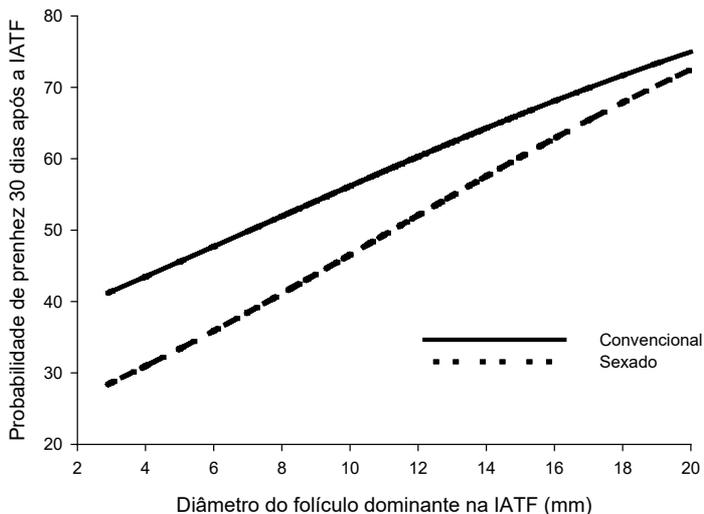


Figura 8. Probabilidade de prenhez 30 dias após a IATF em vacas *Bos indicus* ($n = 1344$) de acordo com o tipo de sêmen [Convencional ($n = 673$) e Sexado ($n = 671$) e o diâmetro do FD na IATF [Convencional = $\exp(-0,6018 + 0,0850 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF} / 1 + \exp(-0,6018 + 0,0850 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF}))$; $P < 0,0001$) e Sexado = $\exp(-1,2449 + 0,1107 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF} / 1 + \exp(-1,2449 + 0,1107 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF}))$; $P < 0,0001$].

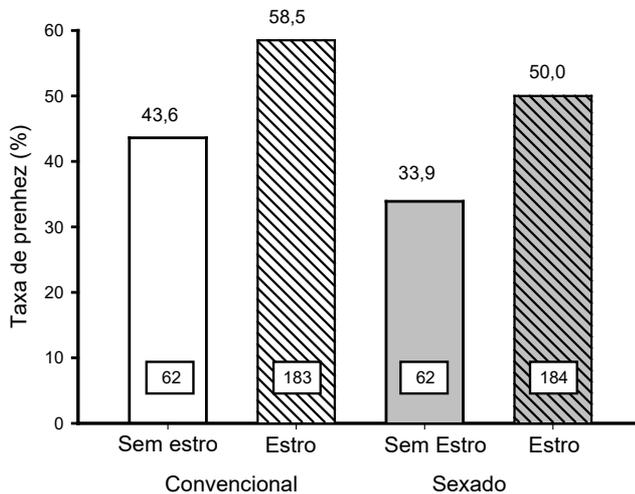


Figura 9. Taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* de acordo com o tipo de sêmen (convencional ou sexado) e a ocorrência de estro (presença ou não de estro) entre a retirada do dispositivo de progesterona e a IATF. Não houve interação entre o tipo de sêmen e a ocorrência de estro ($P=0.87$).

Com o intuito de reduzir o número de manejos nos protocolos de IATF com sêmen sexado, vacas Nelore lactantes foram submetidas a dois diferentes protocolos de sincronização da ovulação (BED9 e RBE9; $n=593$, Sá Filho et al. 2010c). No BED9, os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona associado à administração i.m. de 2 mg de benzoato de estradiol (D0). No D8, o dispositivo de progesterona foi removido, administraram-se i.m. 0,25 mg de cloprostenol sódico e 300UI de eCG. Vinte e quatro horas após a retirada do dispositivo, administraram-se i.m. 1 mg de benzoato de estradiol (BE). A IATF foi realizada entre 60 e 63 horas após a remoção do dispositivo. No grupo RBE9, as fêmeas foram sincronizadas utilizando o mesmo protocolo descrito para o grupo BED9, porém permaneceram com o dispositivo intravaginal durante nove dias, administraram-se 1 mg de BE no momento da retirada do dispositivo e a IATF com sêmen sexado foi realizada entre 50-53 horas após a remoção do dispositivo. Não foi verificado efeito do protocolo de sincronização sobre a taxa de prenhez (BED9 = 47,1%; 140/297 vs. RBE9 = 41,0%; 121/295; $P = 0,25$). Concluiu-se que é possível reduzir o número de manejos sem afetar a eficiência do protocolo de sincronização da ovulação em vacas inseminadas com sêmen sexado.

Otimizações Laboratoriais

Recentemente foi desenvolvida tecnologia com nanopartículas para da remoção dos espermatozoides com menor viabilidade. Neste sentido foram realizados dois experimentos utilizando vacas Nelore lactantes que receberam o mesmo protocolo para IATF em [2mg de

BE + dispositivo de progesterona (P4) no D0; retirada do dispositivo e aplicação de PGF2 α + 300 UI de eCG + 1mg de CE no D8 e a IATF foi realizada 60 horas após a retirada do dispositivo de progesterona, no D11; Baruselli et al., (2017)]. No experimento 1, 796 vacas foram inseminadas com sêmen de três diferentes touros da raça Nelore direcionados para produção de sêmen sexado (fêmea) e sêmen convencional do mesmo ejaculado. Os grupos experimentais foram: 1) Convencional, sêmen congelado sem sexagem contendo 20x10⁶ de espermatozoide; 2) Legacy, sêmen sexado com 2.1x10⁶ de espermatozoides (método anterior de sexagem); 3) Sex-Ultra 2.1 sêmen sexado com 2.1x10⁶ de espermatozoides (método atual de sexagem); 4) Sex-Ultra 4.0, sêmen sexado com 4.0x10⁶ de espermatozoides (método atual de sexagem com aumento da concentração de 2.1 para 4 milhões de espermatozoides por palheta). Não foi encontrada diferença na taxa de prenhez entre os touros (P=0,15), entre as fazendas (P=0,46), nem a interação touro e grupo (P=0,84) e fazenda e grupo (P=0,95). Entretanto, houve diferença na taxa de prenhez à IATF conforme o método utilizado [Sêmen Convencional = 56%a (112/199), Sexado Legacy 2.1 = 28%c (58/206), Sexado Ultra 2.1 = 38%bc (72/191) e Sexado Ultra 4.0 = 43%b (86/200); P < 0,0001(Figura 10)].

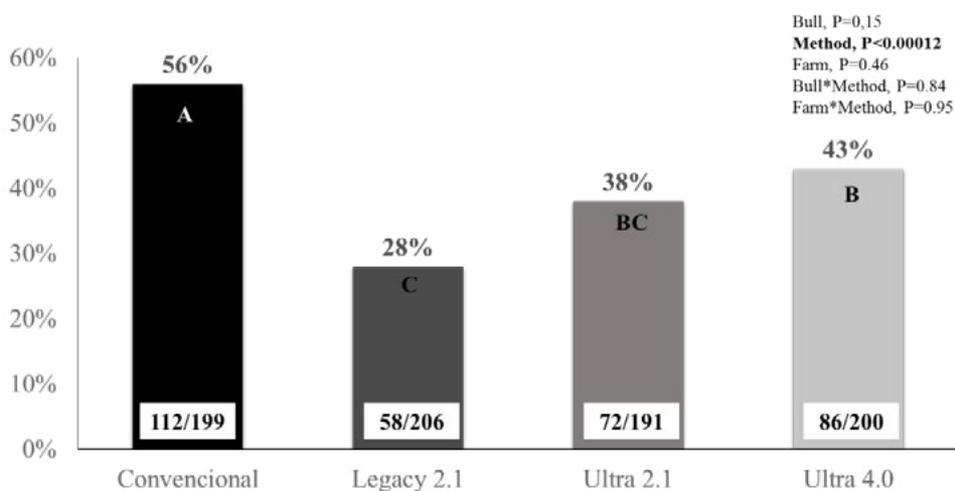


Figura 10. Taxa de prenhez à IATF de vacas Nelore lactantes inseminadas utilizando diferentes tecnologias de sexagem (Sêmen convencional, Sexado Legacy 2.1, Sexado Ultra 2.1 ou Sexado Ultra 4.0).

No experimento 2 (n=613 vacas), foram utilizados três touros da raça Aberdeen Angus para produção de sêmen sexado (macho) e sêmen convencional. O mesmo ejaculado de cada touro foi distribuído conforme os seguintes grupos experimentais: 1) Convencional, sêmen congelado sem sexagem com 20x10⁶ de espermatozoides; 2) Sex-Ultra: 4.0x10⁶ de espermatozoide; 3) Sex-Ultra Pure: 4.0x10⁶ de espermatozoides (com retirada dos espermatozoides mortos).

Um subgrupo de 431 vacas tiveram a base da cauda pintada para a detecção da aceitação de monta (estro) entre a retirada do dispositivo de P4 no D8 e a IATF no D11. Não

houve diferença na taxa de prenhez entre os touros ($P=0,12$). Foi observado um efeito de fazenda ($P=0,03$), entretanto, não houve interação fazenda e grupo ($P=0,61$), touro e grupo ($P=0,40$). A taxa de prenhez foi semelhante entre os grupos experimentais [Sêmen Convencional=51,2% (107/209), Sêmen Sexado Ultra 4.0 = 42,0% (84/200), Sêmen Sexado Ultra Pure = 43,1% (88/204); $P = 0,10$ (Baruselli et al., 2017; Figura 11).

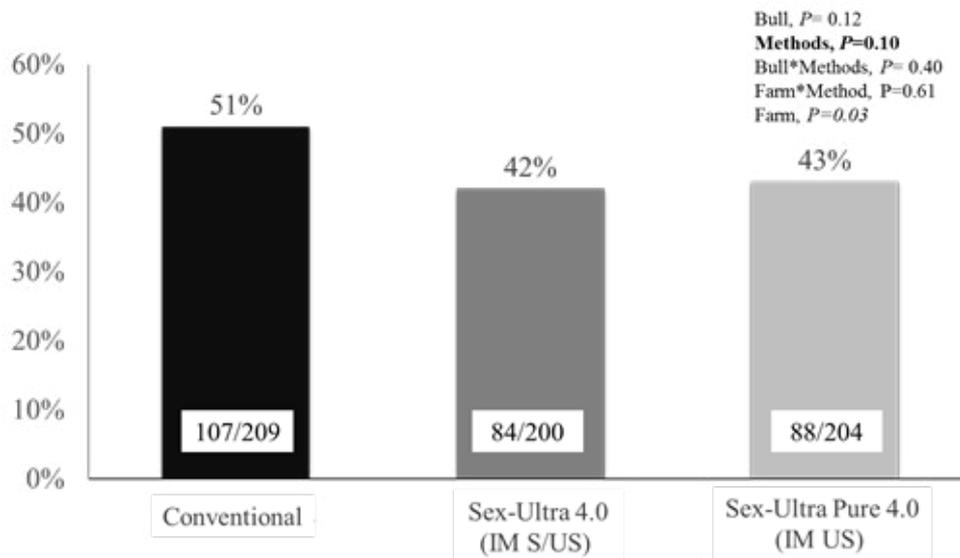


Figura 11. Taxa de prenhez à IATF em vacas Nelore lactantes inseminadas conforme diferentes tecnologias de sexagem (Sêmen convencional, Sexado Ultra 4.0 ou Sexado Ultra Pure 4.0).

No subgrupo de animais, houve diferença na taxa de prenhez conforme a manifestação de estro [Estro = 52,6% (161/306) vs Não estro = 32,8% (41/125); $P<0,0001$]. Ainda, houve interação de método (sexado vs não sexado) com manifestação de estro ($P=0,0002$). Verificou-se queda na taxa de prenhez à IATF com sêmen sexado somente nas vacas que não manifestaram estro. Nas vacas que manifestaram estro essa diferença não foi observada. Conclui-se que o sêmen Ultra com 4,0 milhões de espermatozoides resulta em maior taxa de prenhez que o sêmen Legacy com 2,1 milhões de espermatozoides. Ainda, vacas que manifestam estro apresentam semelhante taxa de prenhez à IATF quando inseminadas com sêmen sexado ou convencional (Baruselli et al., 2017).

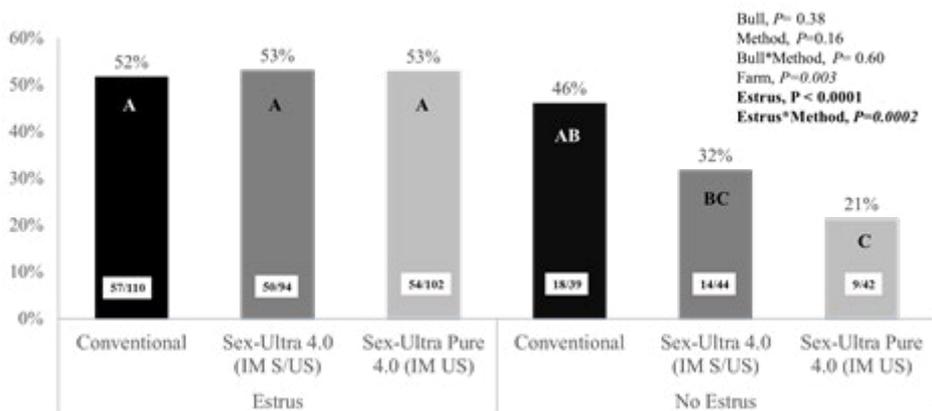


Figura 12. Taxa de prenhez à IATF em vacas Nelore lactantes inseminadas conforme a expressão de estro com diferentes tecnologias de sexagem (Sêmen convencional, Sexado Ultra 4.0 ou Sexado Ultra Pure 4.0).

No estudo mais recente, Marques et al., 2018 (dados não publicados), foram testadas as concentrações de 6 e 8 milhões de espermatozoides na dose de sêmen sexado. Foi utilizado o protocolo com CE na retirada e IA 60h após a retirada do dispositivo. Os resultados obtidos foram de 63,6% para o Grupo 4M (63/99), 59,2% para o 6M (58/98) e de 52,8% para o 8M (47/89). Esses resultados indicam que a dose de sêmen com 4 milhões de células está adequada para programas de IATF

Considerações Finais

Os dados apresentados demonstram que as taxas de concepção após detecção de cio em novilhas inseminadas com sêmen sexado são aceitáveis. Ainda, com a adequação do momento da inseminação em relação ao início do estro ocorre melhora na taxa de concepção. Resultados superiores são obtidos quando as inseminações são realizadas entre 16 a 24 horas após o início do estro (ou seja, 6 a 14 horas antes da ovulação). A taxa de concepção à IATF com sêmen sexado também apresenta resultados satisfatórios, desde que o momento da IATF seja ajustado para 60 horas após a retirada do implante (10 horas antes da ovulação). Na atualidade, as fêmeas são sincronizadas com protocolos de 3 manejos utilizando cipionato de estradiol como indutor de ovulação. Estudos evidenciaram que fêmeas com maior diâmetro do folículo dominante no momento da IATF e fêmeas que manifestam estro entre a retirada do dispositivo de P4 e a IATF apresentam maiores taxas de prenhez quando inseminadas com sêmen sexado.

Referências bibliográficas

[1] BARUSELLI PS, AYRES H, SOUZA AH, MARTINS CM, GIMENES LU, TORRES-JÚNIOR JRS. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. Anais do 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006. v.1, p.113-132.

- [2] BARUSELLI PS, CAMPOS FILHO EP, CREPALDI GA, PANAZZOLLO SG, ZANATTA GM, COLLI MHA, MINGOTI RD, CRUZ GC, CASTRO MW. New strategies to improve pregnancy rate at TAI using sex-sorted semen. *Animal Reproduction*. 31thSBTE, Sent for publication (abstract).
- [3] BODMER M, JANETT F, HASSIG M, DEN DAAS N, REICHERT P, THUN R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology*, 64:1647-1655, 2005.
- [4] BORCHERSEN S, PEACOCK M. DANISH A.I. field data with sexed semen. *Theriogenology*, 71: 59–63, 2009.
- [5] DEJARNETTE JM, NEBEL RL, MARSHALL CE, MORENO JF, MCCLEARY CR, LENZ RW. Effect of Sex-Sorted Sperm Dosage on Conception Rates in Holstein Heifers and Lactating Cows. *Journal Dairy Science*; 91:1778-1785, 2008.
- [6] GARNER DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, 65:943-957, 2006.
- [7] KURYKIN J, JAAKMA U, JALAKAS M, AIDNIK M, WALDMANN A, MAJAS L. Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. *Theriogenology*, 67:754-759, 2007.
- [8] LU KH, SEIDEL JR GE. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage rates of bovine oocytes inseminated with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, 62:819-830, 2004.
- [9] NEVES, K.A.L. Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado. 2010. 89 f. Dissertação (mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- [10] NORMAN HD, HUTCHISON JL, MILLER RH. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *Journal Dairy Science*. 93:3880–3890, 2010.
- [11] SÁ FILHO MF, AYRES H, FERREIRA RM, NICHI M, FOSADO M, CAMPOS FILHO EP, BARUSELLI PS. Strategies to improve pregnancy per insemination using sexed semen in dairy heifers detected in estrus *Theriogenology*. 74: 1636 – 1642, 2010a.
- [12] SÁ FILHO MF, CRESPILO AM, SANTOS JEP, PERRY GA, BARUSELLI PS. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal Reproduction Science*, 120: 23 – 30, 2010b.
- [13] SÁ FILHO MF, GIROTTI RW, ABE EK, PENTEADO L, CAMPOS FILHO EP, MORENO JF, SALA RV, NICHI M, BARUSELLI PS. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. *Journal of Animal Science*, 90:1816-1823, 2012.
- [14] SÁ FILHO MF, SALES JNS, GIROTTI R, PENTEADO L, CAMPOS FILHO EP, BARUSELLI PS. Otimização do uso de sêmen sexado e redução de manejos em programas de IATF em vacas Nelore lactantes. *Acta Sci Vet*. p. 370, 2010c.
- [15] SÁ FILHO MF, SANTOS JEP, FERREIRA RM, SALES JNS, BARUSELLI PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*, 2011. (in press)
- [16] SALES JNS, NEVES KAL, SOUZA AH, CREPALDI GA, SALA RV, FOSADO M, CAMPOS FILHO EP, DE FARIA M, SÁ FILHO MF, BARUSELLI PS. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex sorted semen. *Theriogenology*, 2011. (in press)
- [17] SALES JNS, CREPALDI GA, FOSADO M, CAMPOS FILHO EP, BARUSELLI PS. Timing of insemination with sexed or nonsexed semen on pregnancy rates of Jersey heifers detected in heat by radiotelemetry. In: Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2010, Córdoba. *Reprod Fertil Develop*, 22: 178-178, 2010.
- [18] SALES JNS, CARVALHO JBP, CREPALDI GA, CIPRIANO RS, JACOMINI JO, MAIO JRG, SOUZA JC, NOGUEIRA GP, BARUSELLI PS. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of

synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, v. 78, p. 510-516, 2012.

[19] SCHENK JL, SUH TK, SEIDEL JR GE. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology*, 65:299-307, 2006.

[20] SEIDEL JR GE, SCHENK JL. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science*, 105: 129 -138, 2008.

[21] SEIDEL JR GE, SCHENK JL, HERICKHOFF LA, DOYLE SP, BRINK Z, GREEN RD, CRAN DG. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, 52:1407-1420, 1999.

[22] SOUZA AH, MARTINS CM, TORRES-JR JR, AYRES H, BARUSELLI PS. Efeito do eCG e do cipionato de estradiol em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo em vacas Holandesas de alta produção. *Acta Sci Vet*, 34:404, 2006 [Resumo].

[23] SOUZA AH, SALES JNS, CREPALDI GA, TEIXEIRA AA, BARUSELLI PS. Effect of type of semen (sexed vs non-sexed) and time of AI (60h vs 64h) on pregnancy rates of postpartum Nelore cows inseminated in a fixed time. *Anim. Reprod.* 6:224, Jan/Mar 2008 [Resumo].

Agradecimentos: À Sexing Technologies do Brasil pela parceria que possibilitou o desenvolvimento dos experimentos apresentados nessa revisão.

Tecnologias para criopreservação de sêmen em equinos

Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva¹

yame@ufv.br

Gabriel Augusto Monteiro²

Abstract: Throughout the years several biotechnologies have emerged, being gradually incorporated to the routine of equine management. Particularly, sêmen biotechnologies have emerged with the aim of increasing sêmen longevity and the reproductive efficiency of stallions with superior genetic merit. They are even more important for the equine species, since crossbreeding rarely include fertility as a selection criterion, resulting in a large number of subfertile animals. Thus, improved fertility outcomes of cryopreserved equine sêmen, which has been sought over the years, especially in animals sensitive to sêmen storage at low temperatures, results in a favorable economic impact on the horse industry.

Keywords: reproductive biotechnologies; stallion; spermatozoa; freezing.

Palavras-chave: biotecnologias reprodutivas; garanhão; espermatozoide; congelamento.

Introdução

Apesar de inúmeras vantagens e avanços, a criopreservação do sêmen equino ainda se depara com resultados inferiores aos encontrados com o sêmen fresco e refrigerado. A criopreservação é um processo que depende de diversas etapas e eventos bioquímicos complexos, ainda não completamente elucidados, que determinarão se a célula será viável ao final de todas as etapas.

Cada etapa do processo constitui um ponto crítico para a obtenção de bons resultados, uma vez que o sucesso na criopreservação do sêmen está condicionado à qualidade do sêmen fresco e suas interações com o diluidor e com os crioprotetores, com as curvas de congelamento-descongelamento utilizadas, variáveis essas com grande influencia racial e individual entre garanhões. Além disso, depende de inúmeros outros fatores, como o técnico, a dose e o momento da inseminação, o local de deposição do sêmen e a interação deste com o trato genital feminino, dentre outros. O ajuste do sêmen ao diluidor e a forma de processamento permitem minimizar os danos provocados pelo choque térmico, pela desidratação excessiva, pelo estresse tóxico e pela formação e dissolução de cristais de gelo que o crioprocessamento oferece aos espermatozoides.

Com isso, a utilização de sêmen congelado em programas de inseminação artificial resulta em taxas bastante variáveis, de forma que pesquisas incansáveis vem sendo realizadas

¹ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa.

² Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

por décadas no intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos e de testar novas substâncias e protocolos para melhorar os resultados com o sêmen congelado, objetivando sua utilização em maior escala na espécie equina.

Sendo assim, o objetivo deste artigo é trazer uma revisão sobre o desenvolvimento das técnicas e avanços obtidos na criopreservação do sêmen equino, além de trazer uma pretenciosa previsão do que está por vir nos próximos anos quanto à utilização desta biotécnica.

1. Finalidade e em que consiste a criopreservação de sêmen

A criopreservação das células espermáticas consiste em armazenar o sêmen à uma temperatura de -196°C de forma a estagnar o metabolismo espermático, aumentando assim a longevidade da célula [1]. Nos mamíferos esta biotécnica tem sido estudada ao longo de décadas, seja com o intuito de preservação do material genético de espécies em risco de extinção ou pela difusão do material genético de reprodutores considerados superiores. Foi iniciada em 1948 mediante a descoberta do glicerol como uma substância crioprotetora celular por cientistas de Cambridge na Inglaterra [2] e as pesquisas iniciais se focaram na criopreservação de espermatozoides bovinos com a obtenção de bons resultados, no entanto, o mesmo sucesso não foi obtido para a espécie equina, cujos espermatozoides parecem possuir maior sensibilidade ao processo de congelamento [3]. Nesta espécie, a primeira prenhez obtida com o sêmen criopreservado foi em 1957, utilizando espermatozoides congelados provenientes do epididimo [4].

O congelamento de sêmen possui inúmeras vantagens, uma vez que otimiza o uso do garanhão, até mesmo fora da estação de monta, levando a um maior número de descendentes com alto valor genético, possibilita a preservação do material genético do animal por tempo ilimitado, elimina barreiras geográficas, diminui os custos e riscos envolvidos com o transporte de animais, minimiza a propagação de doenças e permite a utilização de garanhões com *impotencia coeundi* (impossibilitados de realizar monta) ou que já morreram [5,6,7,8]. No entanto, o uso desta biotecnologia na espécie equina tem sido limitado pela redução da fertilidade do sêmen de alguns garanhões pós-congelamento, pelo aumento do custo do produto e pela necessidade de um maior acompanhamento do ciclo estral das éguas [9,10,11].

2. Entraves para a utilização do sêmen congelado na espécie equina

A preservação do sêmen, fomenta grande interesse na indústria equina, devido às inúmeras vantagens que oferece. Entretanto, os processos de preservação de sêmen a temperaturas não fisiológicas causam diminuição da viabilidade espermática [6,12], que é refletida na redução de fertilidade [13].

Isso se deve às mudanças na organização bidimensional dos lipídios que compõem a membrana plasmática espermática durante a diminuição da temperatura [14,15]. Os espermatozoides durante o crioprocessamento passam por taxas de refrigeração (positivas) e congelamento (negativas) que levam a danos que podem afetar a fertilidade. Os danos resultante desse estresse térmico são denominados conjuntamente de “choque frio” que caracteriza-se

pelo padrão anormal do movimento de lipídios, levando a alterações na fluidez, permeabilidade e lesões nas membranas, perda de moléculas estruturais e queda rápida de motilidade espermática [16,17]. Quaisquer modificações na organização em mosaico fluido da membrana, como assimetrias e interação com as proteínas, podem provocar alterações na sua função, além de rupturas acrossomais [18], levando à capacitação precoce [14]. Ressaltando assim a importância de obedecer curvas específicas para evitar danos irreversíveis a célula espermática [19].

Além disso, durante a criopreservação podem ocorrer outros danos celulares, decorrentes da desidratação celular excessiva, da toxicidade dos crioprotetores e formação e dissolução de cristais de gelo [20,21,22]. A adequação da curva de congelamento-descongelamento às características seminais e meio diluidor utilizados é imprescindível, uma vez que a redução rápida da temperatura causa instabilidade da membrana plasmática do espermatozoide e pode gerar desidratação insuficiente, levando à formação de cristais de gelo intracelular. Por outro lado, taxas de arrefecimento demasiadamente lentas levam à desidratação excessiva, expondo a célula por mais tempo aos efeitos tóxicos do crioprotetor. Dessa forma, a taxa de arrefecimento ideal deve ser lenta o suficiente para permitir a desidratação suficiente da célula, evitando a formação de cristais de gelo intracelular, mas suficientemente rápida para evitar a exposição prolongada de espermatozoides a soluções hipersaturadas do ambiente extracelular [16,21].

A qualidade seminal inicial é um dos pontos críticos da criopreservação e está diretamente relacionada a fatores individuais e raciais nos equinos. Esses fatores, por sua vez se relacionam com a resistência espermática ao armazenamento em baixas temperaturas [3,23,24] e, em muitos casos, diferenças são notadas entre ejaculados de um mesmo indivíduo [6]. Essa grande variabilidade se deve aos critérios escolhidos para a seleção de reprodutores equinos em cruzamentos comerciais, que de maneira geral, considera apenas o padrão fenotípico e a performance atlética dos animais, deixando de lado sua eficiência reprodutiva [25] e, muitas vezes, elevam o nível de consanguinidade dos produtos gerados, o que resulta em ganhões com características seminais indesejáveis [26].

De forma geral, ganhões das raças de Hipismo e Quarto de Milhas possuem melhores parâmetros espermáticos após a refrigeração e congelamento do que ganhões da raça Mangalarga Marchador [23,26,27]. Ramires-Neto [27] demonstraram que existe diferença no perfil de lipídios presentes no sêmen de ganhões Quarto de Milha, comparado aos Mangalarga Marchador, que poderia influenciar nas diferentes resistências às baixas temperaturas entre as duas raças. Quanto maior a relação colesterol/fosfolipídios mais resistente é a célula a baixas temperaturas [28,29]. A classe predominante de fosfolipídios também influencia a resistência, sendo que o predomínio de fosfatidilcolina aumenta a resistência enquanto o predomínio de fosfatidiletanolamina diminui a resistência à criopreservação [30,31]. Estas características de composição de membrana espermática são transmitidas geneticamente [32].

Assim, de acordo com as características de motilidade espermática pós-descongelamento, os ganhões podem ser classificados como bons congeladores ou maus congeladores [24]. Ganhões que apresentam espermatozoides com motilidade progressiva pós-descongelamento

mento menor ou igual a 35%, em três ou mais ejaculados em dez, são considerados sensíveis à criopreservação (maus congeladores), enquanto ganhões acima desses critérios são designados resistentes à criopreservação (bons congeladores) espermática [33].

Um outro fator que afeta consideravelmente a utilização desta biotécnica, é a demanda de um manejo mais intenso quanto ao controle folicular das éguas que serão inseminadas com o sêmen congelado, uma vez que o mesmo necessita ser depositado no trato genital feminino o mais próximo possível ao momento da ovulação. Isso se deve à baixa longevidade dos espermatozoides criopreservados. Assim, na prática veterinária muitas vezes não é possível realizar sucessivos exames reprodutivos em curto intervalo de tempo, fazendo com que se opte pela utilização de outras biotecnologias de sêmen, que demandam um manejo menos intensivo [10,34,35].

Além de diferenças entre ganhões e de um controle folicular mais refinado das éguas, diversos outros pontos críticos afetam o sucesso da IA utilizando sêmen congelado em equinos, como a forma de processamento, o meio diluidor, o sistema de armazenamento, o protocolo de descongelamento, a dose inseminante utilizada e o local de deposição do sêmen no trato genital da fêmea, etc [3]. Assim, as taxas de prenhez obtidas por ciclo estral podem variar de 0% a mais de 70% [3,36].

3. Como a criopreservação foi aprimorada e tem sido realizada atualmente?

A criopreservação e a utilização do sêmen congelado envolve as seguintes etapas: coleta, remoção da fração gel e avaliação do sêmen; diluição inicial do ejaculado com um extensor à base de leite desnatado; remoção do plasma seminal; ressuspensão do pellet de espermatozoides com um diluente de congelação; envase do sêmen em palhetas; resfriamento seguido do congelamento controlado; armazenamento em botijões criogênicos contendo nitrogênio líquido e descongelamento; e finalmente a deposição do sêmen descongelado no trato genital da fêmea [10,35,37,38].

Durante as últimas décadas diversas modificações foram realizadas no processamento e na inseminação com sêmen congelado no intuito de viabilizar e melhorar os resultados para esta espécie, como a utilização de diferentes diluentes [39,40], a adição de diferentes crioprotetores [9, 41,42,43], a incorporação de lipídios [44], a adição de novos antioxidantes [45,46], de antibióticos [47,48] e de estimulantes de motilidade ao meio diluidor [49,50], utilização de diferentes protocolos de congelação [51,52], de diferentes doses inseminantes [53,54,55,56] e métodos de inseminação [57,58,59].

3.1. Coleta de sêmen para criopreservação

3.1.1. Método Convencional

A coleta de sêmen em equinos comumente é realizada com vagina artificial (VA). Atualmente existem vários modelos de vagina artificial com particularidades específicas em cada um deles. Os principais modelos utilizados no Brasil são: Missouri[®], Colorado[®] e modelo

Botucatu®, este último é constituído por um tubo rígido, mucosa de látex, mucosa plástica e copo coletor revestido de camisa sanitária descartável. Independente do modelo a ser utilizado, previamente à coleta de sêmen, ela deve ser preenchida com água aquecida (45 a 50° C) para que a temperatura final da vagina artificial fique entre 44-48°C [60]. Um teste prático para avaliar a vagina artificial é introduzir o braço enluvado no lumen da VA e sentir conforto término nos 5 primeiros segundos [61]. Adicionalmente a pressão da vagina deve ser ajustada para permitir um melhor contato com toda superfície peniana sem interferir na ereção peniana [60].

Imediatamente antes da coleta de sêmen o pênis deve ser lavado com água para minimizar a contaminação bacteriana presente na região peniana e prepucial [62], que pode ser transferida ao sêmen no momento da coleta. Estudos recentes demonstraram que lavagem do pênis antes da coleta diminuem a concentração bacteriana [63] o que torna uma importante ferramenta no controle de endometrites em éguas [64]. Outra forma de minimizar a contaminação bacteriana do sêmen é realizar coleta fracionada [65] ou retirar o plasma seminal pelos métodos de centrifugação ou filtragem [63].

3.1.2. Métodos Alternativos: coleta em estação, coleta farmacológica e coleta da cauda do epidídimo

A morte inesperada, processos obstrutivos ou distúrbios ejaculatórios podem interromper prematuramente com a vida reprodutiva de garanhões de alto valor genético. Nestes casos as técnicas alternativas de coleta de sêmen mais utilizadas são: coleta em estação [66], indução farmacológica da ejaculação [67,68,69] e coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo [70,71, 72,73,74].

Coleta em estação

Na coleta em estação, pode-se usar uma vagina artificial ou estimulação manual, e a ejaculação é realizada pela estimulação peniana sem que ocorra a monta. Isto pode ser especialmente útil em processos patológicos que impossibilitam a monta como distúrbios neurológicos, músculo esquelético e pós-cirúrgicos [66].

Para realizar a coleta com vagina artificial inicialmente o garanhão em estação é estimulado com uma égua em cio, e no momento em que há ereção completa, a vagina artificial é introduzida no pênis. Neste momento pode-se posicionar a mão na base peniana para incentivar o estímulo excitatório. Após o posicionamento adequado o garanhão inicia movimentos pélvicos que culminarão na ejaculação. Outra possibilidade é a estimulação manual na qual o operador após colocar uma mucosa plástica sobre o pênis realiza-se estímulos na extremidade distal da glândula até que ocorra a ejaculação propriamente dita [61].

Coleta farmacológica de sêmen

A coleta farmacológica há alguns anos vem sendo utilizada como método alternativo para aumentar a função ejaculatória na cobertura (monta natural, coleta com vagina artificial ou estimulação manual), bem como na indução ejaculatória sem monta [69].

O método de indução farmacológica apresenta-se como uma ferramenta importante para a coleta de sêmen de animais com déficit de ereção, distúrbios ejaculatórios [75], animais impossibilitados de realizar cobertura por debilidade ou dor na monta, “déficit” de libido e paralisia, lesão ou neoplasia em pênis e que foram submetidos à penectomia [76].

Os principais fármacos utilizados são: imipramina [69,75,77,78], xilazina [69,75,77,78,79], detomidina [78,80], prostaglandina (PGF2 α) [79] e ocitocina [78]. Os fármacos utilizados podem atuar das seguintes formas: como inibidores de recaptação neuronal de neurotransmissores (imipramina), estimuladores dos receptores α adrenérgicos (xilazina e detomidina) ou indutores de contrações da musculatura lisa genital do garanhão (PGF2 α e ocitocina).

No entanto, os estudos até agora desenvolvidos incluem uma variedade de doses, protocolos, vias de administração, combinações de agentes e procedimentos pré-tratamento, apresentando taxas de ejaculação variáveis [67,69,77,78,81] como demonstrado na **Tabela 1**.

A coleta do ejaculado pode ser realizada com o auxílio de um copo coletor acoplado a um suporte. No entanto, a colocação de um suspensório associado a uma mucosa plástica recobrimdo todo o perímetro prepucial é a técnica mais utilizada devido a sua maior praticidade e menor manipulação do animal [78].

Características do ejaculado variam significativamente entre os protocolos terapêuticos utilizados, e essa variação ocorre pela estimulação ou inibição da contração da musculatura lisa das ampolas e das glândulas sexuais acessórias [69].

Os efeitos colaterais diferem dependendo do protocolo empregado. A utilização de Prostaglandina F2 α pode provocar sudorese e gotejamento de urina, o que dificulta a obtenção de sêmen livre de urina e suor [69]. Os tratamentos com xilazina podem provocar sedação profunda e imipramina intravenosa leve hemólise, como relatada por McDonnell & Odian [77]. A primeira prenhez utilizando ejaculação química foi obtida a partir espermatozoides colhidos de um garanhão com 22 anos, com estado geral ruim e queixa de dificuldade de emprenhar nas últimas coberturas. Cinco éguas foram inseminadas com 80% de taxa de concepção [82]. ROWLEY et al. [80], compararam a fertilidade do sêmen refrigerado obtido por ejaculação química (detomidina) com o colhido com vagina artificial e observaram demonstrando que ambos foram eficientes na fecundação.

Tabela 1. Resumo dos protocolos de indução farmacológica de ejaculação.

Fármacos	Doses e Vias de administração	Ejaculação	Autores
Xilazina	0,66mg/kg i.v	27%	McDonnell e Love [79]
Detomidina	0,02 mg/kg i.m + 0,01mg/kg 15 min depois	50%	Rowley et al. [80]
Prostaglandina F2 alfa	0,01 + 0,15/kg i.m	75%	McDonnell [66]
Clomipramina	2,2mg/kg i.v	100%	Turner et al. [83]
Imipramina	2 mg/kg i.v	42%	McDonnell e Turner [76]

>continua

Fármacos	Doses e Vias de administração	Ejaculação	Autores
Imipramina	2,2 mg/kg i.v	71%	Dutra, [84].
Detomidina+ Ocitocina	0,02 mg/kg i.v de detomidina + 20UI i.v de ocitocina	8,33%	Cavaleiro [78]
Imipramina+ Detomidina+ Ocitocina	3 mg/kg v.o de imipramina + (0,02 mg/kg i.v de detomidina + 20UI i.v de ocitocina) 2 h depois	31,25%	Cavaleiro [78]
Imipramina+ Xilazina	2 mg/kg iv de imipramina + 0,3mg/kg i.v de Xilazina 1h depois	33%	McDonnell e Odian [77]
Imipramina+ Xilazina	0,75 a 2 mg/kg v.o de imipramina + 0,3mg/kg i.v de Xilazina 1-3 h depois	57%	Johnston e DeLuca [75]
Imipramina+ Xilazina	2 mg/kg iv de imipramina + 0,3mg/kg i.v de Xilazina 10 minutos depois	53%	McDonnell e Turner [76]
Imipramina+ Xilazina	3 mg/kg v.o de imipramina + 0,66 mg/kg i.v de Xilazina 2 h depois	68%	McDonnell [69]

i.m = intramuscular; i.v = intravenoso; v.o = via oral, UI= unidade internacional, h = hora

Coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo

A coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo em ganhões mostrou-se eficiente em recuperar células espermáticas viáveis desde a década de 50 [4]. Entretanto, somente nos últimos anos, alguns pesquisadores intensificaram o estudo na preservação de espermatozoides viáveis da cauda do epidídimo [85].

Os estudos concentram-se em técnicas de coleta de espermatozoides epididimários [86,87], comparação de meios diluentes adequados para lavagem do epidídimo e congelamento dos espermatozoides [8,73], refrigeração dos espermatozoides epididimários [88], viabilidade espermática após adição de plasma seminal [7,70,89,90,91], viabilidade espermática de ganhões subférteis [85,92], fertilidade [8,73,88,85,91,92] e metodologias de inseminação [93] e ICSI [94].

Sabe-se que após a morte do animal os espermatozoides permanecem viáveis no epidídimo até que a decomposição tecidual afete sua viabilidade [95,96,97]. Para manutenção da integridade espermática é importante que o epidídimo seja acondicionado a 5°C levando a diminuição do metabolismo e manutenção da integridade espermática [71,95,97].

O primeiro passo para recuperação dos espermatozoides é a realização da orquiectomia. Durante o procedimento evitar que a lamina de bisturi traumatize a cauda do epidídimo localizado no bordo caudal do testículo. Após a retirada do complexo testículo-epidídimo, o funículo espermático deve ser ligado com fios de nylon ou seda, evitando o extravasamento de sangue e espermatozoides durante o transporte. Imediatamente após a orquiectomia o material deve ser colocado em sacos plásticos com 50 mL de Ringer Lactado que tem a função de evitar a desidratação tecidual [88].

Se o epidídimo for mantido a temperatura ambiente, há declínio da qualidade espermática, tendo como limite de viabilidade próximo das 24 horas pós-orquiectomia [97]. Já

a manutenção dele à 5°C mostrou-se eficiente em manter a qualidade espermática [72,97]. Além disso, a manutenção do complexo testículo-epidídimo a 5°C por 24 horas antes da coleta apresentou mesma taxa de concepção quando comparado ao ejaculado (61,5%) e espermatozoides do epidídimo recuperados imediatamente após a extração do animal (92,3%) [88]. Uma forma prática e eficiente na manutenção da temperatura do epidídimo a 5°C é a utilização de sistemas de transporte passivo comumente utilizado para transporte de sêmen. Estes equipamentos proporcionam queda gradual e lenta de temperatura durante o processo de refrigeração espermática, evitando com isso choque térmico (frio) na membrana plasmática dos espermatozoides [88,97].

O método de fluxo retrógrado consiste na geração de pressão com uma seringa nos vasos deferentes até que os espermatozoides epididimários carregados pelo diluente extravasem pelo corte realizado na junção entre a cauda e o corpo epididimal. A recuperação espermática média com esse método varia de 12 a 30 bilhões de espermatozoides por epidídimo [88].

A primeira prenhez utilizando espermatozoides congelados na espécie equina foi relatada em uma égua inseminada com espermatozoides da cauda do epidídimo [4]. No entanto, a taxa de concepção com espermatozoides do epidídimo por muito tempo se manteve baixa e somente nos últimos anos houve um incremento importante na preservação destas células (**Tabela 2**) por mudanças de protocolos de congelamento, mudança do momento da inseminação e adição de substâncias aos espermatozoide do epidídimo [8,88,91].

Os espermatozoides do epidídimo também podem ser utilizados em biotecnologias como a ICSI, sem apresentar diferença na proporção de clivagem embrionária quando comparados a espermatozoides criopreservados do ejaculado de garanhões [94].

Em equinos estes espermatozoides epididimários demonstraram ser resistentes a criopreservação. Este fato torna possível utilizar animais que já tinham sido descartados da reprodução ou mesmo após a morte serem utilizados a partir de inseminações artificiais convencionais [73,85,88,98], inseminações histeroscópicas [89] ou a injeção intracitoplasmática de espermatozoide [94].

Tabela 2. Fertilidade de espermatozoides recuperados do epidídimo.

Autores	Categoria	Dose inseminante	Taxa de concepção	Local da inseminação
Barker & Gandier, [4]	Congelado	-	12,5%	Corpo do útero
Morris et al. [93]	Fresco	200x10 ⁶	45%	Histeroscopia
	Congelado	200x10 ⁶	8%	Histeroscopia
	Congelado	200x10 ⁶	18%	Conventional
	Congelado	5-10 x 10 ⁶	0%	Histeroscopia
	Congelado + ST	5-10 x 10 ⁶	28%	Histeroscopia
Papa et al. [73]	Congelado	800x10 ⁶	66,6%	Ápice do corno

>continua

Autores	Categoria	Dose inseminante	Taxa de concepção	Local da inseminação
Heise [91]	Fresco + PS	200x10 ⁶	75%	Corpo do útero
	Fresco - PS	200x10 ⁶	22,2%	Corpo do útero
	Congelado + PS	200x10 ⁶	27,8%	Corpo do útero
	Congelado - PS	200x10 ⁶	6,7%	Corpo do útero
Monteiro et al. [88]	Congelado	800x10 ⁶	91,3%	Ápice do corno
	Refrigerado+ Congelado	800x10 ⁶	61,5%	Ápice do corno
Monteiro et al. [92]	Congelado/Subfertil	800x10 ⁶	25,0 %	Ápice do corno
Monteiro [85]	Congelado /Subfertil	800x10 ⁶	48,4 %	Ápice do corno
Guasti et al. [98]	Congelado	800x10 ⁶	68,7%	Ápice do corno
	Congelado	100x10 ⁶	31,5%	Ápice do corno
	PTX + Congelado	100x10 ⁶	50,0%	Ápice do corno

Refrigerado = Antes da recuperação dos espermatozoides o epidídimo foi armazenado por 24 horas à 5 °C; SP = Cauda do epidídimo foi lavada com plasma seminal; ST = Antes do congelamento as amostras foram ressuspensas em meio SPERM TALP; PTX = A cauda do epidídimo foi lavada usando extensor a base de leite desnatado (BotuSêmen®) acrescido de 7,18 mM de pentoxifilina.

3.2. Diluentes e crioprotetores para congelamento de sêmen equino

Existem diversos diluentes comerciais para congelação de sêmen equino e, apesar de possuírem particularidades e protocolos específicos para a congelação, todos eles basicamente objetivam equilibrar o pH do meio (efeito tampão), neutralizando produtos tóxicos provenientes do metabolismo espermático; proteger os espermatozoides contra o choque térmico; manter o equilíbrio eletrolítico e osmótico; inibir o crescimento bacteriano; e fornecer energia aos espermatozoides. Para isso, são compostos por tampões, crioprotetores não penetrantes (lipoproteínas e di ou trissacarídeos), fonte de energia (monossacarídeos), crioprotetores intracelulares (como o glicerol e as amidas) e outros aditivos, como enzimas, eletrólitos, detergentes e antibióticos [6].

Os crioprotetores penetrantes e não penetrantes são essenciais para o sucesso da criopreservação, uma vez que evitam a formação de grandes cristais de gelo, dentro e fora da célula, respectivamente. Além disso, os crioprotetores exercem um efeito osmótico, induzindo a desidratação dos espermatozoides, essencial a sua sobrevivência, além de proteger a membrana plasmática. Apesar de essenciais, os crioprotetores, podem exercer efeitos tóxicos e reduzir os índices de fertilidade quando presentes em concentrações elevadas [21].

Embora o glicerol seja o crioprotetor penetrante mais utilizado na criopreservação espermática de mamíferos, outros crioprotetores têm sido utilizados para a criopreservação do sêmen equino, como a metil formamida, dimetil formamida e dimetil acetamida, mostrando resultados superiores [9,42]. Estas amidas possuem estrutura molecular menor que a do glicerol, penetrando mais rapidamente na membrana espermática, diminuindo a necessidade

de um tempo de equilíbrio longo, reduzindo o tempo de exposição da célula ao efeito tóxico do crioprotetor [99].

3.3. Técnicas de remoção do plasma seminal: centrifugação, cushion e filtro

A remoção do plasma seminal é uma etapa importante da criopreservação para evitar prejuízos a qualidade e longevidade do sêmen armazenado por longos períodos [100]. Existem duas principais formas para remoção do plasma seminal do ejaculado de ganhões, a centrifugação [12] e filtragem [101].

Normalmente, o plasma seminal é removido do sêmen durante o processo de criopreservação, uma vez que diversos estudos demonstraram o efeito deletério deste fluido na motilidade, integridade do DNA e integridade da membrana plasmática durante o armazenamento [100,102,103]. Para isso, a centrifugação foi introduzida como um método para concentrar os espermatozoides em um pellet e separar o plasma seminal, o que permite que o sedimento seja rediluído para a criopreservação [104]. No entanto, a força e a duração da centrifugação necessárias para remover o plasma seminal podem afetar negativamente o número total de espermatozoides, promover danos mecânicos à membrana espermática e aumentar alguns defeitos morfológicos, resultando em diminuição da viabilidade espermática [12,105,106]. A centrifugação é a técnica mais utilizada, entretanto possui a desvantagem em lesar os espermatozoides pelo choque mecânico, resultando em menor viabilidade destas células [12]. Portanto deve-se ter cuidado com a força de centrifugação e tempo utilizado no processo. Dell'aqua et al. [107] considerou que a força de 600 x g, associada a um tempo de 10 minutos, possibilitou a recuperação de 87% dos espermatozoides com boa qualidade. Além disso, constatou-se que altas forças de centrifugação podem ser deletérias à integridade espermática, enquanto baixas forças de centrifugação proporcionaram baixa recuperação espermática.

Dessa forma, o desenvolvimento de soluções coloidais de alta viscosidade, inertes e isotônicas, que funcionam como uma espécie de almofada no fundo do tubo durante a centrifugação (Eqcellsire[®], IMV, L'Aigle, France; Cushion Fluid[®], Minitube, Landshut, Germany; Red Cushion[®], Botupharma, Botucatu, Brazil), melhoraram o resultado do sêmen criopreservado nos últimos anos, por minimizarem o impacto e a compactação de espermatozoides [38,108]. A técnica de cushion promove uma maior recuperação espermática por permitir a utilização de uma maior força de centrifugação (800 a 1000 x g) comparada a centrifugação convencional (300 a 500 x g), sem causar maiores prejuízos a estrutura do espermatozoide [109,110].

A outra forma de retirada de PS é a filtragem, sua vantagem em relação à centrifugação é que ela pode ser utilizada em animais sensíveis ao choque mecânico causado pela centrifugação [101]. Na filtragem utiliza-se um filtro específico com membrana sintética hidrofílica (Sperm Filter Sperm Filter; Botupharma, Botucatu, Brazil) que permite a passagem de plasma seminal e de estruturas menores que 2 um de diâmetro, retraindo os espermatozoides acima da membrana [111,112]. As vantagens desta técnica incluem uma maior taxa de recuperação de espermatozoides, menor custo (em comparação à aquisição de uma centrífuga), treinamento mínimo ao manipulador e maior viabilidade espermática em comparação com a centrifugação tradicional [111]. Além disso, Ramires-Neto et al.

[113] demonstraram que a remoção do plasma seminal por filtração reduziu a carga bacteriana no sêmen após o resfriamento.

No entanto, a centrifugação utilizando cushion foi um método superior para remover o plasma seminal em comparação à filtragem quanto a motilidade total e progressiva de espermatozoides refrigerados [114].

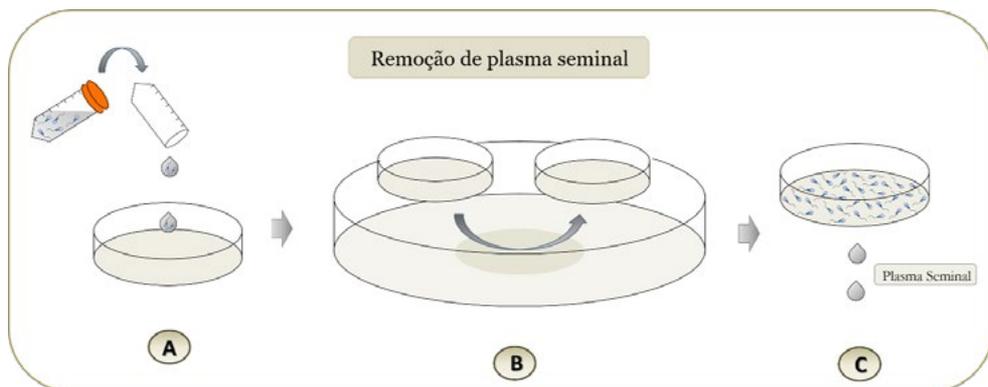


Ilustração da técnica de remoção de plasma seminal por filtração em membrana hidrofílica.

3.4. Métodos de congelamento

O processo de congelamento se inicia com a refrigeração do sêmen da temperatura ambiente (por volta de 20° C) para 5° C, intervalo de temperatura em que a membrana plasmática celular passa do estado líquido cristalino para o estado gel e, portanto, se torna mais susceptível aos danos causados pelo estresse térmico, perdendo motilidade e potencial fertilizante. No entanto, este efeito pode ser minimizado por meio do controle da taxa de resfriamento e da adição de crioprotetores ao meio diluente. A taxa de resfriamento ideal deve ser lenta o suficiente para permitir a desidratação suficiente da célula, evitando a formação de cristais de gelo intracelular, mas suficientemente rápida para evitar a exposição prolongada de espermatozoides a soluções hipersaturadas do ambiente extracelular [16,21].

O ponto de congelamento do citoplasma celular, geralmente, ocorre em temperaturas abaixo de -1°C. Entretanto, na faixa entre -10°C e -15°C, mesmo com o meio extracelular congelado, o meio intracelular ainda se encontra super-resfriado [115]. Na faixa de -15 a -60 ocorre o congelamento propriamente dito dos espermatozoides, a atividade metabólica e as reações cessam e a célula permanece inativa. Nessa fase, a célula deve ter desidratado suficientemente para não formar grandes cristais de gelo, porém não excessivamente, evitando, assim, o efeito tóxico dos crioprotetores e danos celulares [116]. Após essa etapa, as palhetas são mergulhadas em nitrogênio líquido, sendo mantidas a -196° C por um período ilimitado de tempo [6].

O número ideal de espermatozoides por palheta varia entre os laboratórios e as recomendações do fabricante de diluente, variando na literatura de 100 x 10⁶ / ml [53] até 400 x 10⁶ / ml [117], utilizando palhetas de 0,5 ml. A dose inseminante pode variar de acordo com

a qualidade espermática pós-descongelção. Uma dose inseminante utilizando sêmen descongelado deve conter no mínimo 150×10^6 espermatozoides quando a motilidade espermatozóica pós-descongelção é de 35% [55], havendo, no entanto, a necessidade de se aumentar a dose quando a qualidade do sêmen é inferior, podendo ser necessária a dose total de 800×10^6 espermatozoides [53].

3.4.1. *Curvas de congelação*

A curva de congelação é importante na manutenção da integridade celular. Uma das faixas críticas de temperatura para os espermatozoides no processo de congelação vai de -3°C a -10°C . Neste momento ocorre a formação de cristais de gelo e liberação do calor latente de fusão, o qual acarreta aumento de temperatura do sistema e as maiores injúrias celulares. Assim, a velocidade de congelação neste período deve ser a mais rápida possível [118].

A curva de congelação é importante na manutenção da integridade celular. Como já mencionado, a curva ideal deve ser lenta o bastante para permitir a desidratação suficiente da célula espermática para evitar a formação de cristais de gelo intracelular e rápida o bastante para evitar a exposição dos espermatozoides nas soluções hipersaturadas no momento da formação dos cristais de água no ambiente extracelular [6,21,119].

Em equinos as curvas de congelação com melhores resultados variam entre -20 e $-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$. [120], dependendo do método de processamento do ejaculado e do tipo de armazenamento dos espermatozoides. Assim, as máquinas de congelação automáticas podem minimizar as variações individuais [121].

Há também fatores individuais e raciais relacionados à resistência dos espermatozoides equinos ao congelamento, já que o resultado dessa biotecnologia é bastante variável entre os ganhões [23]. Estudo recente constatou diferença significativa na qualidade seminal na raça Mangalarga Marchador a curva de congelação de $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$. causa menor dano aos espermatozoides quando comparado a curvas mais lentas ($-8^{\circ}\text{C}/\text{min}$) [122]. Esta diferença nos parâmetros espermáticos em ganhões da raça Mangalarga Marchador, corrobora com relato anterior que a maior sensibilidade dos espermatozoides dessa raça ao processo de congelação e descongelção seminal quando comparada a outras raças, como as germânicas e a Quarto de Milha [42].

Apesar das causas determinantes da variabilidade da resistência do sêmen ao processo de congelação ainda não serem bem elucidadas, alguns estudos têm observado que esta variabilidade pode estar relacionada a fatores genéticos, reforçada por pesquisas demonstrando que quanto maior a fluidez da membrana antes da congelação, melhor a sua resposta ao processo de criopreservação [123]. Espécies que apresentam baixas concentrações de colesterol e altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados são mais predispostas aos danos do choque pelo frio, já que o processo de congelação leva ao enrijecimento da membrana plasmática [124].

Melhores resultados foram obtidos quando com a utilização de curvas de congelação mais rápidas para animais considerados com baixa resistência ao processo de congelação,

conforme achados de Medeiros et al. [125], demonstram que estes animais apresentam menor eficiência na regulação do equilíbrio osmótico celular.

3.5. Técnicas de descongelamento de sêmen

O resultado final da criopreservação é observado após a descongelamento, que deve manter uma curva condizente com a utilizada para a congelamento. Por exemplo, se a congelamento for lenta, a descongelamento também deve ser lenta para que os cristais de gelo extracelulares descongelem, provocando a diluição dos solutos e promovendo a reidratação celular lentamente [115]. Diversas curvas de descongelamento foram propostas, entre elas a curva de 37° C por pelo menos 30 segundos [35], de 46° C por 20 segundos [126] ou de 75° C por 7 segundos [127]. No entanto, o protocolo mais utilizado é o primeiro citado, uma vez que esta temperatura é fácil de ser atingida a campo e não gera riscos de desnaturação de componentes espermáticos se o tempo de exposição for excedido.

3.6. Momento e técnicas de inseminação artificial com sêmen congelado

O momento ideal da IA utilizando o sêmen descongelado é entre 12 horas antes e de 4-8 horas após a ovulação, já que a longevidade do sêmen criopreservado é baixa e o embrião permanece viável no interior do oviduto por até 8 horas [128,129].

3.6.1. Local de deposição do sêmen no trato genital feminino

A inseminação do sêmen criopreservado no trato genital da égua pode ser realizada no corpo uterino ou no ápice do corno uterino (ipsilateral à ovulação), utilizando pipeta flexível ou histeroscópio. A inseminação no corpo uterino resulta em menores taxas de fertilidade por induzir a uma maior reação inflamatória uterina e um atraso no transporte uterino de espermatozoides ao oviduto [130]. Alguns estudos observaram uma maior colonização de espermatozoides nos ovidutos quando inseminados no ápice do corno uterino ipsilateral à ovulação (perto da junção uterotubal) refletindo em maior fertilidade, em comparação a técnica anterior [58]. Por isso, a inseminação com o sêmen criopreservado tem sido realizada dessa forma, utilizando pipeta flexível ou histeroscópio [57].

3.6.2. Ferramentas para detecção da proximidade da ovulação

Devido ao estro de longa duração, a determinação da ovulação na espécie equina requer um controle folicular intenso e, muitas vezes, exaustivo por parte do veterinário. Dessa forma, prever o momento da ovulação permite programar a inseminação com o sêmen congelado para o momento mais próximo possível da ovulação, reduzindo a mão-de-obra e a necessidade de re-inseminar, além de melhorar as taxas de concepção, principalmente em se tratando de sêmen com baixa longevidade espermática. Além disso, a previsão do tempo de ovulação é desejada para programas de recuperação de oócitos que usam biotecnologias como ICSI e para obtenção de embriões jovens para congelamento [131].

Nesse sentido a indução da ovulação, utilizando hormônios (como o hCG, GnRH e seus análogos, EPE, reLH, dentre outros) associada à ultrassonografia, foram importantes

ferramentas para o desenvolvimento da reprodução equina assistida, uma vez que permitem estimar o momento da ovulação com maior precisão e menor manejo [132]. Em nossa experiência a indução da ovulação entre às 22 horas, usualmente, leva à ovulação no dia seguinte (32-48 horas após o tratamento hormonal), evitando inseminações no meio da noite.

A aparência ultrassonográfica do útero e do folículo dominante, permite indentificar a proximidade da ovulação nessa espécie. Isso é possível pois à medida que a ovulação se aproxima (desde 3 dias antes até 3 horas previamente à ruptura do folículo) ocorrem sinais, como: redução do edema uterino, perda do formato folicular esférico, aumento progressivo da espessura e ecogenicidade da camada granulosa, surgimento de uma banda anecóica entre as camadas da teca interna e externa (correspondente a vasos sanguíneos), serrilhamento da parede e a formação de um ápice em um dos polos folicular que é acompanhado pela diminuição da vascularização nesse local [131,133,134].

3.7. Técnicas de seleção espermática antes e/ou após à criopreservação

As novas biotécnicas do sêmen visam não só melhorar a qualidade do sêmen refrigerado e congelado, mas aumentar qualidade e fertilidade do sêmen de garanhões considerados subférteis. Os garanhões representam 50% da equação na concepção de um descendente e a indústria do cavalo está repleta de garanhões cujo nível de fertilidade é indesejável. Isso se deve ao critério para seleção de reprodutores equinos, que de maneira geral, considera apenas o padrão racial e a performance atlética, deixando de lado a eficiência reprodutiva [25]. Dessa forma, técnicas de remoção de plasma seminal, minimizando o impacto da centrifugação, e de seleção espermática foram desenvolvidas para viabilizar o uso de ejaculados sensíveis ao processo de criopreservação ou com baixa qualidade [108].

Algumas formas de subfertilidade podem ter uma base genética, mas freqüentemente é associada ao envelhecimento ou a enfermidades adquiridas em garanhões. Dentre as enfermidades que afetam a qualidade espermática, destaca-se a degeneração testicular que normalmente ocorre após estresse têmico ambiental, febre e trauma genital ou pelo uso de medicamentos de longo prazo, como esteróides anabolizantes [25]. Além da subfertilidade, alguns garanhões apresentam uma diminuição da qualidade dos espermatozoides após a refrigeração ou criopreservação devido a uma maior sensibilidade espermática, como mencionado anteriormente [6].

As técnicas de seleção espermática servem para enriquecer uma amostra de sêmen com uma maior porcentagem de espermatozoides viáveis antes da inseminação das éguas. Isso pode referir-se a ejaculados frescos de má qualidade ou a espermatozoides danificados após o resfriamento ou o congelamento (Stoll et al., 2008; 25). Diversas técnicas de seleção espermática foram testadas para o sêmen equino, como as técnicas de “*swim-up*” e “*swim-down*”, de aderência espermática e de centrifugação em gradiente de densidade [135].

No entanto, a técnica mais utilizada em equinos é a de seleção espermática em camada única a base de sílica. Há atualmente dois produtos comerciais: EquiPure[®] (Nidacon, Gothenburg, Sweden) e Androcoll-E[®] (Minitube, Landshut, Germany). Ambos atuam de ma-

neira semelhante, selecionando espermatozoides sem defeitos morfológicos que exibem motilidade progressiva e integridade celular [136,137,138,139], refletindo em maiores taxas de fertilidade [140].

Além dos efeitos benéficos na qualidade espermática e fertilidade, esses gradientes foram eficientes em reduzir a carga bacteriana [141] e viral [142] do sêmen após processamento.

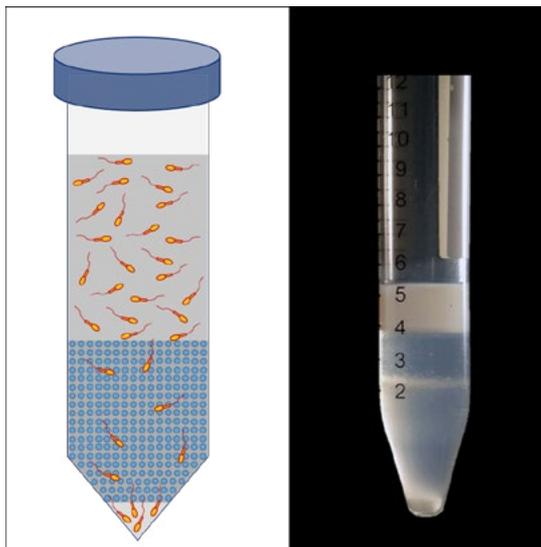


Ilustração da técnica de seleção espermática em gradiente de densidade em camada única.

4. Perspectivas futuras para o uso do sêmen congelado na espécie equina

4.1. Desenvolvimento de diluentes personalizados e adequação de curvas para garanhões mais seletivos

Como já dito anteriormente, há considerável variação entre garanhões quanto à qualidade seminal antes e após armazenamento em temperaturas não fisiológicas e quanto à capacidade de fertilização após crioprocessamento. Estima-se que entre 20-50% dos garanhões férteis produzam espermatozoides que sobrevivem bem aos processos de congelamento e descongelamento [143,144]. No entanto, de acordo com Mennick [145], os garanhões considerados “maus congeladores” em um teste único de congelabilidade, utilizando apenas um tipo de processamento e de diluente, quase sempre são injustiçados, uma vez que há a necessidade de encontrar extensores e métodos de congelamento adequados ao indivíduo [145,146].

Atualmente, tem surgido uma enormidade de meios diluentes comerciais para congelamento de sêmen equino, com particularidades e especificidades, visando atender às exigências de reprodutores que não apresentam bons resultados com diluentes convencionais, de forma a personalizar o congelamento desses indivíduos.

4.2. Maior preocupação na seleção de animais resistentes à criopreservação

Em consonância com a idéia anterior, a reprodução equina segue na contramão do que se preza em termos de melhoramento genético de uma espécie/raça. Os estudos e a indústria buscam se adequar à realidade individual de garanhões, deixando de lado critérios de seleção que conduzam ao melhoramento de características reprodutivas da espécie como um todo e que, comprovadamente, são relacionadas ao aumento da fertilidade. Como exemplo de critérios de seleção que deveriam ser adotados, está o volume testicular e a congelabilidade de sêmen. O tamanho testicular é tão hereditário em garanhões quanto é em touros e esse parâmetro correlaciona-se fortemente com a produção de espermatozoides [147]. A herdabilidade de características reprodutivas desejáveis, no entanto, é pequena e portanto requer anos de seleção criteriosa para que atinjamos resultados factíveis.

4.3. Outras perspectivas

A melhoria da longevidade do sêmen congelado equino certamente permitirá o desenvolvimento de protocolos de inseminação artificial em tempo fixo, assim como utilizado em outras espécies, por exemplo em bovinos, pequenos ruminantes e suínos [148]. Além disso, permitirá sua utilização na forma sexada, pelo método de citometria de fluxo, atualmente o métodos mais eficaz, como demonstrado em outras espécies [149]. Associado a essas biotecnologias, a utilização de sêmen congelado para a produção in vitro de embriões (até o momento pela técnica de ICSI), já é uma realidade e tem crescido a cada dia no mercado nacional.

5. Considerações Finais

A indústria equina ao longo dos anos vem adotando biotecnologias modernas que permitam a redução dos custos de produção e a seleção de animais reprodutores com mérito genético superior. Entre esses avanços, a biotecnologia da criopreservação de sêmen é um instrumento importante para maximizar o uso de garanhões, prevenir a disseminação de doenças, eliminar barreiras geográficas e aumentar a longevidade do sêmen. No entanto, por muitos anos essa biotecnologia foi pouco utilizada, devido a obtenção de resultados inferiores ao sêmen fresco e refrigerado. Atualmente, diversos avanços foram obtidos graças ao aprimoramento das técnicas de criopreservação desenvolvidas especialmente para os equinos, como o desenvolvimento de diluentes, descoberta de novos crioprotetores, utilização de novos métodos de inseminação artificial, entre outros. Com isso, atualmente, observa-se um crescimento na utilização do sêmen congelado, mas ainda requer avanços que facilitem a vida dos veterinários no momento da IA e que tragam resultados similares às demais formas de utilização do sêmen.

Referências

[1] Anger, J.T., Gilbert, B.R. and Goldstein, M.A.R.C. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *The Journal of urology*, 170(4), pp.1079-1084, 2003.

- [2] Polge, C.; Smith, A.V.; Parkes, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v.164, p.666, 1949.
- [3] Samper, J.C. and Morris, C.A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*, 49(5), pp.895-903, 1998.
- [4] Barker, CAV and Gandier, JCC. Pregnancy in the mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med Vet Sci*;21:47-50, 1957.
- [5] Thomassen, R. Insemination with Stallion Semen Frozen in 0, 5 ml Straws. *Reproduction in Domestic Animals*, 28(4), pp.289-293, 1993.
- [6] Graham, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12(1), pp.131-147, 1996.
- [7] Moore, A.I.; Squires, E.L.; Graham, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* v.63, p.2372-81, 2005.
- [8] Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Carmo MT, Dellaqua Junior JA, et al. Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 179: 27-34, 2017.
- [9] Squires, E.L.; Keith, S.L.; Graham, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* v.62, p.1056- 1065, 2004.
- [10] Loomis, P.R; Graham, J.K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, v.105, p.119-128, 2008.
- [11] Govaere, J. L. J., Hoogewijs, M. K., De Schauwer, C., De Vliegheer, S., Van Soom, A., Duchateau, L., & de Kruiif, A. Effect of artificial insemination protocol and dose of frozen/thawed stallion semen on pregnancy results in mares. *Reproduction in domestic animals*, 49(3), 487-491, 2014.
- [12] Aurich, C. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* 107, 268-275, 2008.
- [13] Samper, J.C. and Morris, C.A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*, 49(5), pp.895-903, 1998.
- [14] Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*; 53:47-58, 2000.
- [15] Graham Jk. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Prat*; v.12, p.131-47, 1996.
- [16] Watson, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v.7, p.871-891, 1995.
- [17] Aurich, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), 65-75, 2005.
- [18] Bedford, S. J., Varner, D. D., & Meyers, S. A. Effects of cryopreservation on the acrosomal status of stallion spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (56), 133-140, 2000.
- [19] Morris, G. J., Faszer, K., Green, J. E., Draper, D., Grout, B. W. W., & Fonseca, F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*, 68(5), 804-812, 2007.
- [20] Jasko, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Veterinária*, v.10, n.2, p.156-165, 1994.
- [21] WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreservation semen. *Anim Reprod Sci*; v.60, p.481-92, 2000.
- [22] Blottner, S.; Warnke, C.; Tuchscherer, A.; Heinena, V.; Torner.H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Ani Repro Sci*, v.65, p.75-88, 2001.

- [23] Alvarenga MA, Papa FO, Buratini Jr J. The effect of breeds spermatic parameters over equine semen freezability. In: Symposium on Stallion Semen, Amersfoort. Proceedings. p.82, 1996.
- [24] Katila, T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. *Acta veterinaria scandinavica*, 42(2), 199, 2001.
- [25] Varner, D.D., Love, C.C., Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Hartman, D.L., Bliss, S.B., Carroll, B.S. and Eslick, M.C. Semen processing for the subfertile stallion. *Journal of equine veterinary science*, 28(11), pp.677-685, 2008.
- [26] Farrás, M. C., Fioratti, E. G., Ramires Neto, C., Carmo, M. T. D., Oliveira, R. A. D., Papa, F. O., ... & Alvarenga, M. A. Comparação de diferentes temperaturas de armazenamento de semen refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador e Quarto de Milha. *Veterinária e Zootecnia*, 187-195, 2014.
- [27] Ramires Neto, C. Perfil lipídico da membrana plasmática e alterações morfofuncionais de espermatozóides de garanhões resistentes e sensíveis à criopreservação, Dissertação de mestrado, Unesp-Botucatu, 130p, 2015.
- [28] Darin-Bennett, A. and White, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14(4), pp.466-470, 1977.
- [29] Parks, J.E.; Graham, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-22, 1992.
- [30] Graham, J.K. and Foote, R.H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24(1), pp.42-52, 1987.
- [31] Ladha, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *The Journal of Membrane Biology*, v. 165, p. 1-10, 1998.
- [32] Thurston, L.M., Siggins, K., Mileham, A.J., Watson, P.F. and Holt, W.V. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of reproduction*, 66(3), pp.545-554, 2002.
- [33] Hoffmann, N.; Oldenhof, H.; Morandini, C.; Rohn, K.; Sieme, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal Reproduction Science*, v.125, p.112- 118, 2011.
- [34] Aurich JE. Artificial insemination in horses-more than a century of practice and research. *Journal of Equine Veterinary Science* 32(8): 458-463, 2012.
- [35] Loomis, P.R. and Squires, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*, 64(3), pp.480-491, 2005.
- [36] Samper, J.C., Hellander, J.C. and Crabo, B.G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 44, pp.107-114, 1991.
- [37] Medeiros, C.M.O.; Forell, F.; Oliveira, A.T.D.; Rodrigues, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327-344, 2002.
- [38] Alvarenga, M.A.; Papa, F.O.; Ramires Neto, C.; Advances in stallion semen cryopreservation. *Vet Clin Equine*; v.32, p. 521-530, 2016.
- [39] Pillet, E., Batellier, F., Duchamp, G., Furstoss, V., Vern, Y.L., Kerboeuf, D., Vidament, M. and Magistrini, M. Freezing stallion semen in INRA96[®]-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Science and Technology*, 88(2), pp.257-265, 2008.
- [40] Ramires-Neto, C., Monteiro, G.A., Sancler-Silva, Y.F.R., Papa, P., Guasti, P.N., Resende, H.L., Papa, F.O., Dellaqua, J.A. and Alvarenga, M.A. Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(1), pp.58-60, 2014.
- [41] Chenier T, Merckies K, Liebo S, Plante C, Johnson W. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Equine Practitioners*: 5-6, 1998.

- [42] Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci*;89:105–13, 2005.
- [43] Fayrer-Hosken, R.; Abreu-Barbosa, C.; Heusner, G.; Jones, L. Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and glycerol. *J Equine Vet Sci* v.28, p.672–676, 2008.
- [44] Oliveira, C.H.D., Vasconcelos, A.B.D., Souza, F.A., Martins-Filho, O.A., Silva, M.X., Varago, F.C. and Lagares, M.D.A. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal reproduction science*, 118(2), pp.194-200, 2010.
- [45] Baumber J, Ball BA, Linfor JJ. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American journal of veterinary research*.;66:772- 9, 2005 .
- [46] Davoodian, N., Kadivar, A., Ahmadi, E. and Mohebbi, A. Effects of two amino acids on motion parameters and enzymatic antioxidant activity of freeze-thawed stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 59, pp.49-56, 2017.
- [47] Varner, D.D., Scanlan, C.M., Thompson, J.A., Brumbaugh, G.W., Blanchard, T.L., Carlton, C.M., Johnson, L. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology* 50, 559–573, 1998.
- [48] Pickett, B.W., Voss, J.L. and Jones, R.L. Control of bacteria in stallions and their semen. *Journal of equine veterinary science*, 19(7), pp.424469-441, 1999.
- [49] Ramires-Neto, C., Monteiro, G.A., Sancler-Silva, Y.F.R., Maziero, R.R.D., Lisboa, F.P., Freitas-Dell'Aqua, C.P., Alvarenga, M.A. and Papa, F.O. Influence of addition of motility stimulators in cryopreservation of sperm from subfertile stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(1), p.98, 2014.
- [50] Gradil, C.M. and Ball, B.A. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology*, 54(7), pp.1041-1047, 2000.
- [51] Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G, Maxwell WMC. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*;108:298-308, 2008.
- [52] Maziero, R.R.D., Guasti, P.N., Monteiro, G.A., Avanzi, B.R., Hartwig, F.P., Lisboa, F.P., Martin, I. and Papa, F.O. Evaluation of sperm kinetics and plasma membrane integrity of frozen equine semen in different storage volumes and freezing conditions. *Journal of equine veterinary science*, 33(3), pp.165-168, 2013.
- [53] Palmer E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. *Proceedings International Congress on Animal Reproduction*: 377, 1984.
- [54] Heitland AV, Jasko DJ, Squires EL, Graham JK, Pickett BW, Hamilton C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal* 28: 47-53, 1996.
- [55] Samper, J. C., & Plough, T. Techniques for the insemination of low doses of stallion sperm. *Reproduction in domestic animals*, 45, 35-39, 2010.
- [56] Leipold SD, Graham JK, Squires EL, McCue PM, Brinsko SP, Vanderwall DK. Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology* 49: 1537-1543, 1998.
- [57] Morris LHA, Tiplady C, Cook B, Wilsher S, Li X, Allen WR. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of frozen-thawed ejaculated and epididymal spermatozoa. *Proceedings 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, Saari, Finland: 12, 2000.
- [58] Rigby, S., Derczo, S., Brinsko, S., Blanchard, T., Taylor, T., Forrest, D.W. and Varner, D., November. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. In *Proc Am Assoc Equine Pract* (Vol. 46, pp. 332-4), 2000.
- [59] Avanzi, B.R., dos Santos Ramos, R., Araujo, G.H.M., Fioratti, E.G., Trinca, L.A., Dell'Aqua, J.A., e Oña, C.M.M., Zahn, F.S., Martin, I., Alvarenga, M.A. and Papa, F.O. Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions?. *Theriogenology*, 83(9), pp.1389-1393, 2015.
- [60] Brinsko, S.P.; Blanchard, T.L.; Varner, D.; Schumacher, J.; Love, C.C.; Hinrichs, K.; Hartman, D. Semen collection and artificial insemination with fresh semen. *Manual of equine reproduction* (3rd ed.), Mosby Elsevier, pp.160-175, 2011.

- [61] Forney, B.D.; McDonnell, S.M. How to collect semen from stallions while they are standing on the ground. In *Proc Am Assoc Equine Pract* (Vol. 45, pp. 142-144, 1999).
- [62] Bamber-Skaife J. Evaluation of semen. A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner (Eds.), *Equine reproduction* (2nd ed.), Chichester, Wiley-Blackwell, pp. 1278-1291, 2012.
- [63] Ramires-Neto, C., da Silva, Y.F.R.S., Resende, H.L., Guasti, P.N., Monteiro, G.A., Papa, P.M., Júnior, J.A.D.A., Puoli Filho, J.N.P., Alvarenga, M.A. and Papa, F.O. Control Methods and Evaluation of Bacterial Growth on Fresh and Cooled Stallion Semen. *Journal of equine veterinary science*, 35(4), pp.277-282, 2015.
- [64] Fennel, L.C.; Mckinnon, A.O.; Savage, C.J. Cryopreservation of semen from a stallion with seminal vesiculitis. *Equine Vet Educ*, p.215-219, 2010.
- [65] Tischner, M.; Kosiniak, K.; Bielanski, W. Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. *J Reprod Fertil*;41:329-335, 1974.
- [66] McDonnell, S.M. Ejaculation: physiology and dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.8, n.1, p.57-70, 1992.
- [67] Peck, K. E., Hines, M. T., Mealey, K. L., & Mealey, R. H. Pharmacokinetics of imipramine in narcoleptic horses. *American journal of veterinary research*, 62(5), 783-786, 2001.
- [68] McDonnell, S.M.; ORISTAGLIO TURNER, R. M. Post-thaw motility and longevity of motility of imipramine-induced ejaculates of pony stallions. *Theriogenology*, v.42, p.475-481, 1994.
- [69] McDonnell, S.M. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.153-159, 2001.
- [70] Tiplady, C.A.; Morris, L.H.A.; Allen, W.R. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology*, v.58, n.2, p.225-228, 2002.
- [71] James, A.N.; Green, H.; Hoffman, S.; Landry, A.M.; Paccamonti, D.; Godke, R.A. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*, v.58, n.2, p.401-404, 2002.
- [72] James, A.N. Preservation of sperm harvested from the rat, caprine, equine and bovine epididymis. 229f. Tese (Doutorado) - Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge, 2004.
- [73] Papa, F.O., Melo, C.M.; Fioratti E.G.; Dellaqua, J.A.; Zahn, F.S.; Alvarenga, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.293-301, 2008.
- [74] Monteiro, G.A; Papa, F.O; Zahn, F.S.; Dellaqua Jr, J.A.; Melo, C.M.; Maziero, R.R.; Avanzi, B.R.; Alvarenga, M.A.; Guasti, P.N.; Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 127: 197-201, 2011.
- [75] Johnston, P.F.; Deluca, J.L. Chemical ejaculation of stallions after administration of oral imipramine followed by intravenous xylazine. *Proc. AAEP*, v.43, p.59-62, 1998.
- [76] McDonnell, S.M.; Oristaglio Turner, R. M. Post-thaw motility and longevity of motility of imipramine-induced ejaculates of pony stallions. *Theriogenology*, v.42, p.475-481, 1994.
- [77] McDonnell, S.M.; Odian, M.J. Imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology*, v. 41, p.1005-1010, 1994.
- [78] Cavalero, T.M.S Indução da ejaculação em equinos através da utilização da imipramina e de sua associação com a xilazina. 75f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Julio de Mesquita Filho UNESP, Botucatu, Sao Paulo, 2018.
- [79] McDonnell, S.M.; Love, C.C. Xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology*, v.36, p.73-76, 1991.
- [80] Rowley, D.D.; Lock, T.F.; Shipley, C.F. Fertility of Detomidine HCl-Induced Ex Copula – Ejaculated Stallion Semen After Storage at 5°C. *AAEP Proceedings*, v.45, p.221-223, 1999.
- [81] McDonnell, S.M.; LOVE, C.C. Xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology*, v.36, p.73-76, 1991.

- [82] Card C. E.; Manning S.T.; Bowman P.; Leibel T. Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled stallion. *The Canadian Veterinary Journal*, v.38, p. 171-174, 1997.
- [83] Turner, R. M. O., McDonnell, S. M., & Hawkins, J. F. Use of pharmacologically induced ejaculation to obtain semen from a stallion with a fractured radius. *J Am Vet Med Assoc*, 206(12), 1906-1908, 1995.
- [84] Dutra, F. O. Indução da ejaculação em equinos através da utilização da imipramina e de sua associação com a xilazina. 39f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. JOHNSTON, P.F.; Deluca, J.L, 2000.
- [85] Monteiro, G.A. Criopreservação e fertilidade de espermatozoides do ejaculado e recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subférteis. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu; 116p, 2013.
- [86] Cary, J.A.; Madill, S.; Farnsworth, K.; Hayna, J.T.; Duoos, L.; Fahning, M. L. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *The Canadian Veterinary Journal*, v.45, n.1, p.35-41, 2004.
- [87] Bruemmer, J.E. Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.22, p.677-682, 2006.
- [88] Monteiro, G.A; Papa, F.O; Zahn, F.S.; Dell’acqua Jr, J.A.; Melo, C.M.; Maziero, R.R.; Avanzi, B.R.; Alvarenga, M.A.; Guasti, P.N.; Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 127: 197-201, 2011.
- [89] Morris, L.; Tiplady, C.; Allen, W.R. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*, v.58, p.643-646, 2002.
- [90] Pasquini, D.F.; Melo, C.M.; Papa, F.O.; Fioratti, E.G.; Landim-Alvarenga, F.C., Alvarenga, M.A.; Zahn, F.S.; De Vita, B., Dell’acqua Jr, J.A Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions, *Animal Reproduction Science*, v.107, n.3-4, p. 338-339, 2008.
- [91] Heise, A.; Ahn, W. K.; Volkmann, D.H.; Thompson, P.N.; Gerber, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 48-53, 2010.
- [92] Monteiro, G.A.; Papa F.O.; Guasti, P.N.; Freitas, N.P.P.; Melo, C.M.; Avanzi, B.R.; Velloso, N.M.; Dellaqua Jr, J.A. Fertility of epididymal cauda sperm from subfertile stallions. *Vet. Zootec*; 18: 255-263, 2011.
- [93] Morris, L. H. A., Tiplady, C., Wilsher, S., & Allen, W. R. Hysteroscopic uterotubal insemination of mares with low numbers of frozen-thawed ejaculated and epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil* 118(1):95-100, 2001.
- [94] Herrera, C.; Miragaya, H.M.; Conde, P.; Hynes, V.; Losinno, L.; Quintans, C.; Pasqualini, R.S. Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, v.94, p.299-302, 2006.
- [95] Bruemmer, J.E.; Reger, H.; Zibinski G.; Squires, E.L. Effect of storage at 5 deg C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa, *Theriogenology*, v.58, p. 405–407, 2002.
- [96] Muradás, P.R.; Weiss, R.R.; Kozicki, L.E.; Granemann, L.C.; Santos, I.W.; Pimpão, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Archives of Veterinary Science*, v.11, n.3, p.69-74, 2006.
- [97] Monteiro, G.A.; Guasti, P.N.; Rocha, A.S.; Martin, I.; Sancler-Silva, Y.F.R.; Dellaqua, C.P.F.; Dellaqua Jr, J.A.; Papa, F.O. Effect of storage time and temperature of equine epididymis on the viability, motion parameters, and freezability of epididymal sperm. *J Equine Vet Sci*; 33: 169-173, 2013.
- [98] Guasti, P.N.; Monteiro, G.A.; Maziero, R.R.D.; Carmo, M.T.; Dellaqua Junior, J.A.; Crespilho, A.M.; Rifai, E.A.; Papa, F.O. Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 179: 27-34, 2017.
- [99] Pukazhenthii, B.S; Johnson, A; Guthrie, H.D; Songsasen, N; Padilla, L.R; Wolfe, B.A; Silva, M.C; Alvarenga, M.A; Wildt, D.E. Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski’s horse (*Equus ferus przewalskii*). *Cryobiology* v.68, p.205–214, 2014.

- [100] Love, C.C., Brinsko, S.P., Rigby, S.L., Thompson, J.A., Blanchard, T.L., Varner, D.D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* 63, 1584– 1591, 2005.
- [101] Ramires-Neto, C., Monteiro, G. A., Soares, R. F., Pedrazzi, C., Dell'aqua Jr, J. A., Papa, F. O., ... & Alvarenga, M. A. (2013). New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*, 79(7), 1120-1123.
- [102] Alghamdi, A.S., Troedsson, M.H., Xue, J.L., Crabo, B.G. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *Am. J. Vet. Res.* 63, 880–885, 2002.
- [103] Kareskoski, A.M., Reilas, T., Andersson, M., Katila, T. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 33–38, 2006.
- [104] Martin, J. C., Klug, E. & Gunzel, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 27, 47–51, 1979.
- [105] Sieme, H., Martinsson, G., Rauterberg, H., Walter, K., Aurich, C., Petzoldt, R. & Klug, E. Application of Techniques for Sperm Selection in Fresh and Frozen-Thawed Stallion Semen. *Reproduction in Domestic Animals* 38(2), 134–140, 2003.
- [106] Weiss, S., Janett, F., Burger, D., Hässig, M. & Thun, R. The influence of centrifugation on quality and freezability of stallion semen. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 146(6), 285–293, 2004.
- [107] Dell'aqua JA, Papa FO, AlvarengaMA, et al. Effect of centrifugation an packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *AnimReprod Sci*; 68:324–5, 2001.
- [108] Loomis, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 22(3), pp.663-676, 2006.
- [109] Waite, J. A., Love, C. C., Brinsko, S. P., Teague, S. R., Salazar, J. L., Mancill, S. S. & Varner, D. D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology* 70(4), 704–714, 2008.
- [110] Hoogewijs, M., Rijsselaere, T., De Vliegher, S., Vanhaesebrouck, E., De Schauwer, C., Govaere, J., Thys, M., Hoflack, G., Van Soom, A. & De Kruif, A. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology* 74(1), 118–126, 2010.
- [111] Alvarenga, M.A., Melo, C.M., Magalhães, L.C.O. and Papa, F.O. A new method to concentrate equine sperm. *Animal Reproduction Science*, pp.186-187, 2010.
- [112] Ramires-Neto, C., Monteiro, G.A., Soares, R.F., Pedrazzi, C., Dell'aqua, J.A., Papa, F.O. and Alvarenga, M.A. Effect of removing seminal plasma using a sperm filter on the viability of refrigerated stallion semen. *Journal of equine veterinary science*, 33(1), pp.40-43, 2013.
- [113] Ramires-Neto, C., da Silva, Y.F.R.S., Resende, H.L., Guasti, P.N., Monteiro, G.A., Papa, P.M., Júnior, J.A.D.A., Puoli Filho, J.N.P., Alvarenga, M.A. and Papa, F.O. Control Methods and Evaluation of Bacterial Growth on Fresh and Cooled Stallion Semen. *Journal of equine veterinary science*, 35(4), pp.277-282, 2015.
- [114] Roach, J., Schnobrich, M., Ellerbrock, R., Feijo, L., Bradecamp, E., Alvarenga, M.A., Kline, K. and Canisso, I. Comparison of cushioned centrifugation and SpermFilter filtration on longevity and morphology of cooled-stored equine semen. *Veterinary Record*, 178(10), pp.241-241, 2016.
- [115] Amann, R.P.; Pickett, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.7, n.3, p.145-173, 1987.
- [116] Pickett, B.W. Principles of cryopreservation. In: *Techniques for freezing mammalian embryos*, 1986, Fort Collins. Proceedings... Fort Collins: Colorado State University, p.1-5, 1986.
- [117] Heitland AV, Jasko DJ, Squires EL, Graham JK, Pickett BW, Hamilton C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal* 28: 47-53, 1996.
- [118] Chaveiro, A.; Machado, L.; Frijters, A. et al. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bulls sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*; v.65, p.1875-90, 2006.

- [119] Varner, D.D., Love, C.C., Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Hartman, D.L., Bliss, S.B., Carroll, B.S. and Eslick, M.C. Semen processing for the subfertile stallion. *Journal of equine veterinary science*, 28(11), pp.677-685, 2008.
- [120] Sieme, H.; Harrison, R.A.P.; Petrunkina, A.M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci*; v.107, p.276-92, 2008.
- [121] Medrano, A.; Holt, W.V.; Watson, P.F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. *Andrologia*; v.41, p.246-250, 2009.
- [122] B. Vita, G.A. Monteiro, C.M. Melo, R.R. Maziero, M.T. Carmo, M.A. Alvarenga, P.A. Dutra, Y. F. R. Sancler-Silva, F.O. Papa. Influência de diferentes sistemas e curvas de congelamento na congelabilidade e fertilidade do semen equino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.71, n.3, p.770-776, 2019
- [123] Giraud, M.N.; Motta, C.; Boucher, D.; Grizard, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum Reprod*; v.15, p.2160-4, 2000.
- [124] Rodrigues, P.G.; Moura, R.S.; Rocha, L.G.P. et al. Dietary polyunsaturated fatty acid supplementation improves the quality of stallion cryopreserved semen. *J Equine Vet Sci*; v.54, p. 18-23, 2017.
- [125] Medeiros, A.S.L.; Ferreira, H.N.; Papa, F.O.; Alvarenga, M.A. Índices de fertilidade de espermatozoides de garanhões submetidos ao estresse osmótico por diferentes crioprotetores. *Acta Sci Vet*; v.3, p.35-1006, 2007.
- [126] Dell'aqua Jr JA, Papa FO, Zahn FS. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci*; 68:344-6, 2002.
- [127] Cochran, J.D., Amann, R.P., Froman, D.P. and Pickett, B.W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, 22(1), pp.25-38, 1984.
- [128] Loomis, P.R. The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science*, v. 68, p. 191-200, 2001.
- [129] Samper, J.C.; Hankins, K. Breeding mares with frozen semen in private practice. In: Annual convention of the american association of equine practitioners, v. 47, San Diego. Proceedings p. 314-318, , 2001.
- [130] Morris L: Advanced insemination techniques in mares. *Vet Clin North Am Eq Pract* 22(3):693-703, 2006.
- [131] Gastal, E. L., & Gastal, M. O. Equine preovulatory follicle: blood flow changes, prediction of ovulation and fertility. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 35, 239-252, 2011.
- [132] Pinto, C. R. Hormones and Breeding. *Proceedings: AAEP PROCEEDINGS*. vol. 59, p331-36, 2013.
- [133] Carnevale EM. Folliculogenesis and ovulation. In: Rantanen NW, McKinnon AO (Ed.). *Equine diagnostic ultrasound*. Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins. p.201-211, 1998.
- [134] Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. *Theriogenology*, v.50, p.1025-1038, 1998.
- [135] Loomis, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 22(3), pp.663-676, 2006.
- [136] Macpherson, M.L., Blanchard, T.L., Love, C.C., Brinsko, S.P. and Varner, D.D. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. *Theriogenology*, 58(2-4), pp.317-320, 2002.
- [137] Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jonsson M, Dalin AM, Rodriguez-Martinez H. Colloidal centrifugation with Androcoll-E prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim Reprod Sci*;116:119-28, 2009.
- [138] Gutiérrez-Cepeda, L., Fernández, A., Crespo, F., Gósalvez, J. and Serres, C. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Animal reproduction science*, 124(1), pp.85-89, 2011.
- [139] Morrell, J. M., Johannisson, A., Dalin, A. M., & Rodriguez-Martinez, H. Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology*, 72(6), 879-884, 2009.

- [140] Morrell, J.M., Mari, G., Kutvölgyi, G., Meurling, S., Iacono, E., Mislei, B. and Rodriguez-Martinez, H. Spermatozoa from stallion ejaculates processed by single layer centrifugation with Androcoll™-E are capable of fertilization after artificial insemination. *Reprod Dom Anim*, 46, pp.642-645, 2011.
- [141] Morrell, J.M., Klein, C., Lundeheim, N., Erol, E. and Troedsson, M.H.T. Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. *Animal reproduction science*, 145(1), pp.47-53, 2014.
- [142] Golnik, W., Sordyl, B., Nizanski, W. and Klimowicz, M. Application of EquiPure to improve stallion sperm quality and its equine arteritis virus decontamination. *MEDYCYNA WETERYNARYJNA*, 60(5), pp.508-511, 2004.
- [143] Tischner M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J Reprod Fertil Suppl* (27): 53-59, 1979.
- [144] Vidament, M.; Dupere, A.M.; Julienne, P.; Evain, A.; Noue, P.; Palmer, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, v.48, p.907-917, 1997.
- [145] Mennick PE. Equine semen cryopreservation: An update. *Soc Theriogenology Proc Ann Meeting*, September 17–20, Montreal, Quebec, Canada. pp. 161–169, 1997.
- [146] Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci* 105(1-2): 119-128, 2008.
- [147] Birch, S. M. Survey of Testicular Lesions in Stallions (Doctoral dissertation, Oklahoma State University), 118p, 2008.
- [148] Avanzi, B.R., dos Santos Ramos, R., Araujo, G.H.M., Fioratti, E.G., Trinca, L.A., Dell'Aqua, J.A., e Oña, C.M.M., Zahn, F.S., Martin, I., Alvarenga, M.A. and Papa, F.O. Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions?. *Theriogenology*, 83(9), pp.1389-1393, 2015.
- [149] Panarace, M., Pellegrini, R. O., Basualdo, M. O., Belé, M., Ursino, D. A., Cisterna, R., ... & Medina, M. J. First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large-scale embryo transfer program. *Theriogenology*, 81(4), 520-525, 2014.

Ultrassonografia em touros destinados a inseminação artificial

DVM PhD Gustave Decuadro-Hansen

Virbac

France

A fertilidade dos touros desempenha um papel fundamental na reprodução bovina de carne e leite, especialmente quando é realizada através da inseminação artificial (IA), devido ao importante número de bezerros que podem ser gerados a partir de um único touro.

Antigamente os touros eram selecionados em 3 estágios diferentes: a) com base em sua genealogia ou pedigree, b) em função do teste de grupo comparativo individual e c) por último na base dos resultados do teste de progênie. Nos últimos anos, o ingresso da seleção genômica modificou drasticamente este esquema de seleção, sendo esta ferramenta utilizada para aumentar a acurácia da estimativa dos valores genéticos reduzindo o intervalo de gerações através da identificação de animais geneticamente superiores, antes que os mesmos expressem suas qualidades fenotípicas aumentando a confiabilidade das predições das PTAs, principalmente em animais jovens.

Assim sendo, as empresas de melhoramento animal usam o teste genômico rotineiramente nos programas de seleção de várias raças, buscando touros jovens de genética superior, sendo que alguns pecuaristas ao redor do mundo também já testam a maioria de suas vacas e novilhas com a genômica. A utilização da Genômica, oferece aos produtores mais oportunidades para selecionar os acasalamentos que formarão as futuras novilhas de reposição, especialmente em conjunto com o uso de biotecnologias reprodutivas como sêmen sexado e/ou transferência de embriões e fertilização in vitro (FIV). A seleção de touros para centrais de inseminação artificial (CIA) mudou rapidamente do método conhecido como de apelo visual para a valorização do mérito genético. Os touros nascem de acasalamentos na base de seleção caracterizados por um índice genômico que é calculado no nascimento. Este índice é ajustado conforme os dados dos desempenhos zootécnicos obtidos. Estes touros jovens têm um grande potencial e valor genético como reprodutores, desde que sejam capazes de produzir sêmen em quantidade e qualidade suficientes.

O exame andrológico de touros (EAT) destinados a monta natural ou a produção de sêmen tem como objetivo avaliar a atitude do reprodutor a realizar a monta e a capacidade de produzir sêmen em quantidade e qualidade suficiente suportando a congelamento. O exame integra a avaliação de parâmetros do comportamento e libido do reprodutor (teste de libido ou de capacidade de serviço) o tempo de reação frente ao manequim e o tempo de ejaculação, a avaliação do sêmen, o exame clínico e sanitário.

O EAT tem sido padronizado em vários países por diferentes pesquisadores com aplicações online (Norman et al 2004, Chenoweth et al 2010) sendo adaptado pelas diferentes CIA a realidade do mercado. Ele é um prévio ao teste de fertilidade de CIA formando parte dos exames requeridos para aceitar um reprodutor como doador de sêmen.

Em regra geral, o EAT inclui o exame físico com foco em membros e aparelho genital externo e interno assim como o exame de sêmen destinado a avaliar motilidade, morfologia, carga leucocitária e algumas CIA, a congelabilidade do sêmen. O EAT é realizado geralmente no quarentenário e coincide com a avaliação sanitária de ingresso na central.

Como regra geral, touros jovens com boa Circunferência Escrotal (CS), alta concentração espermática, boa motilidade pré e pós congelamento e poucas anomalias são mantidos. A concentração é correlacionada favoravelmente com a motilidade de massa e individual (+0,4 a +0,9) e a porcentagem de anomalias totais é negativamente ligada à motilidade e concentração. No touro jovem, altas correlações também são observadas entre a Circunferência Escrotal (CE) e os parâmetros quantitativos do ejaculado (concentração e número total de espermatozoides) (Coulter, Thibier).

Levantamentos realizados em diferentes países indicam uma taxa de aceitação de touros de 65 a 85 % (Chenoweth 2015) como potencialmente satisfatório porém sem distinção quando o touro é destinado a monta natural ou a CIA. O valor de este exame foi claramente identificado na publicação de Wiltbank e Parrish em 1986 indicando 6% a mais de fertilidade em touros aprovados no EAT frente a touros não avaliados, segundo o autor é possível que esta porcentagem seja ainda superior tendo em conta os progressos realizados nos últimos 10 anos no exame do sêmen. O impacto econômico do uso do EAT foi estimado pela equação benefício/custo. Assim sendo no Brasil Menagassi et al (2011) estimaram que a equação benefício/custo do uso de EAT era de 36:1 para fazendas de gado de corte. Similares resultados foram obtidos por Chenoweth (2000) em gado de corte em USA (benefício/custo 17:1) e por Dwyer (2013) em gado leiteiro (14:1).

No entanto, esses estudos não integraram o conceito de “sub fertilidade”. Há uma certa confusão em torno deste termo e de acordo com o autor deve diferenciar claramente a sub fertilidade do touro de CIA de aquele de monta natural associada ao chamado touro insatisfatório no EAT.

Na monta natural, a sub fertilidade pode ser associado com um problema de libido, qualidade de sêmen inadequados, problema físico (calos interdígital por exemplo) entre outros, e pode ser devido a um problema de ordem genética ou congênita, sanitário gestão ou por um problema de manejo. Essa subfertilidade pode ser mascarada em estabelecimentos de gado de corte que usam uma porcentagem significativa de touros durante a estação de monta e especialmente naqueles que praticam a rotação de touros durante a mesma assim como em aquelas que prolongam a estação de monta acima de 90 dias.

No entanto, a subfertilidade dos touros destinados à produção de sêmen em uma CIA assume outra dimensão. De fato, alguns associam a subfertilidade a má congelabilidade do sêmen de um touro (ou do ejaculado), no entanto, a fertilidade do touro deve ser avaliada

em teste de campo com um “n” de fêmeas inseminadas suficiente. Hoje em dia os touros que produzem sêmen nas maiores CIA têm dados de fertilidade a campo publicados. Alguns deles são conhecidos por sua “alta fertilidade” e seu uso massivo no rebanho permite aumentar a fertilidade total do rebanho em percentuais da ordem de 4 a 6,5%.

Em efeito, a precisão do resultado estatístico é sempre dependente do tamanho da amostra (Schawrtz) e, se um centro de avaliação genética deseja avaliar a fertilidade de um touro pretendendo 5% de diferença deve executar um teste em grupos de pelo menos 1.500 vacas ou novilhas.

Pesquisas demonstraram que realizar a avaliação de touros resulta em um alto benefício para os pecuaristas devido ao impacto que existe na porcentagem de gestação, no nascimento de bezerras no início da estação de partos e, conseqüentemente, no fato de poder dispor de animais na desmame com maior peso. Assim, os EUA estimam, por exemplo, que um produtor rural recupere de U\$20 a U\$25 para cada dólar gasto no exame de EAT. Blockey (1984) mostrou que a adoção do método da EAT aumentou as taxas médias de natalidade de 85 para 91%, e entre as vacas que parirem nas primeiras semanas, a taxa subiu de 66 para 77%.

Ultrassonografia como ferramenta de apoio no EAT

A ultrassonografia (US) é uma técnica de imagem médica não invasiva baseada na utilização de ultrassom e amplamente utilizada na reprodução da fêmea bovina, permitindo realizar o diagnóstico de gestação, a monitoria do aparelho genital no pós-parto, avaliação ovariana, e a punção de folículos visando a coleta de oócitos para a Produção de Embriões In Vitro (PIVE).

As vantagens da técnica são múltiplas: avaliação em tempo real, a alta acurácia e a possibilidade de, em casos de patologias, de realizar diagnósticos precoces e confiáveis (gestação, gêmeos), possibilidade de medições, determinação da viabilidade e do sexo fetal, monitoria precoce de mortalidade embrionária, monitoria ovariana (resposta a superovulação, seleção de receptoras pré-inovulação de embriões, anestro) etc.

O veterinário precisa conhecer os princípios básicos da US para avaliar as imagens obtidas. Modo B e especialmente o modo B em tempo real é o mais comumente utilizado na medicina veterinária, permitindo observar uma série de imagens bidimensionais quase que instantaneamente e o movimento dos tecidos vivos.

As estruturas cheias de fluido (por exemplo, folículos do ovário e do líquido amniótico, etc.) não refletem as ondas sonoras e aparecem pretas no monitor (não ecogênico ou anecóica), enquanto que o tecido denso (ex. osso) reflete a maioria das ondas sonoras e aparece branco (ecogênico ou hiperecoico). Outros tecidos refletem proporções variadas de ondas sonoras e aparecem na tela do console em vários tons de cinza (Pierson).

Nos últimos anos, esses dispositivos têm sido adaptados para trabalhar no campo incluindo software adaptado à veterinária, com maior portabilidade e bateria com maior autonomia, design robusto, leves, tecnologia numérica, transdutores de múltipla frequência e / ou capacidade de trabalhar com múltiplas probes (linear, setorial etc) em um mesmo mo-

nitor. Igualmente no último decênio, a tecnologia de resolução de imagem nos aparelhos de ultrassom avançou de forma espetacular e observa-se preços diferentes no mercado fruto da restrição de uso de tecnologia de última geração para reduzir o custo de fabricação.

A obtenção de uma imagem de qualidade depende do aparelho como tal, em particular da probe: a frequência, o número de cristais que possui, o pitch (comprimento da probe em cm /no. de cristais), o tratamento da imagem, o algoritmo, o número de canais, e o software, assim como da habilidade do operador.

A imagem obtida pela probe simula um corte feito em um órgão através de um tecido de cima para baixo.

O exame do trato genital do touro é classicamente realizado pela inspeção e palpação do genitais externos e pela palpação transretal dos órgãos genitais internos. Embora haja um grande desenvolvimento da ultrassonografia na fêmea bovina, a utilização em machos apenas começou a ser realizada nos últimos anos (Rault, Gnemmi, Kastelic, Brito). No entanto, na medicina humana, tal exame forma parte de estudos sobre problemas de infertilidade no homem.

Seu uso em touros permite complementar o exame clínico de rotina feito durante o EAT especialmente para os touros de CIA: a) para monitorar o desenvolvimento testicular de touros, b) na fase de entrada dos machos para um programa de produção de sêmen, c) bem como no caso de patologia genital.

Por exemplo, monitorando tourinhos na sua fase de crescimento pré-púbere constata-se um aumento dos pixels de parênquima testicular entre as semanas 20 e 46 de idade, sendo o ponto de mudança na semana 30 (Chandolia, Evans).

Indicações do uso de US em touros:

- Monitoria pré-puberal e puberal de touros jovens
- No ingresso dos touros na CIA
- Frente a uma queda repentina da motilidade, da concentração de espermatozoides ou um aumento da patologia espermática em sêmen puro
- Frente a uma diminuição repentina da congelabilidade do sêmen
- Frente a um teste de Schalm positivo
- Em todos os casos de patologia do aparato reprodutor do touro
- Monitoria da área de olho-de-lombo (AOL) e espessura da camada de gordura subcutânea (ECG)

O exame ultrassonográfico do touro

Material, preparação do animal e metodologia do exame

Não há aparelho ultrassonográfico específico para avaliar a genitália do touro e, em geral, os se utilizam os mesmos ecógrafos que para ginecologia bovina já sejam fixos ou portáteis.

Transdutores lineares de 5 a 7,5 MHz são os mais adequados para examinar as genitálias externas e interna do touro. Podem ser empregados os ultrassons fixos ou portáteis.

No caso de ultrassom fixo, é importante posicioná-lo no lado esquerdo do tronco de contenção e em uma altura que permita uma visualização confortável da imagem tanto para ultrassonografia testicular quanto para a interna. Idealmente, a mesa deve permitir o ajuste da altura do ultrassom em um eixo vertical para ter a tela do monitor sempre na altura dos olhos do manipulador.

O exame em um lugar coberto é ideal para destacar o contraste da imagem ultrassonográfica. Caso contrário, é aconselhável colocar uma tela escura ou filme plástico (como aquele usado para silagem) na parte superior do tronco e na parte posterior e lateral ao ultrassom, a fim de evitar a incidência de raios solares na tela e / ou cobrir o dispositivo com um saco de plástico preto e grosso. A opção do uso de ultrassons portáteis com óculos possui a vantagem de trabalhar no exterior com menos impacto da luminosidade, porém o manipulador deve ficar atento a qualquer movimento brusco do touro em particular quando se realiza a ultrassonografia testicular com óculos que não permitem de visualizar o animal. É necessário padronizar o exame de US buscando efetua-lo sempre a mesma hora (variação de níveis de cinza no parênquima testicular entre manhã e tarde, mais intenso de manhã devido a temperatura). O exame de US segundo o autor não é reproduzível, variações entre exames depende do operador e do dispositivo utilizado. De fato, a diferença de pressão exercida no testículo com a probe, a posição da probe e o volume de gel utilizado foram fatores capazes de variar as medidas.

Um gel de contato (em abundância e preferencialmente um pouco mais espesso do que o usado no ultrassom humano) permite que a probe se adapte à pele do animal no caso da ultrassonografia externa. Em alguns touros é necessário cortar os pelos da região escrotal. O exame ultrassonográfico deve ser praticado em tronco de contenção adequado. No caso de touros que são eletro ejaculados em tronco é necessário avaliar previamente o grau de inquietação do animal antes de praticar o exame. De preferência, o exame deve ser realizado sem a presença de pessoas na frente do tronco e em um ambiente calmo. É preferível realizar o exame após a coleta de sêmen, caso contrário em touros inquietos, o uso da sedação com Xilazina, por exemplo, em dose total de 0.02 mg/Kg ou detomidina em dose total 10µg/Kg (0,1 ml/100 K) na veia coccígea é uma boa alternativa.

Ecografia testicular

Testículos: É necessário colocar o animal em confiança, palpando ou batendo levemente na parte de trás das coxas antes de realizar o teste. Após exame por inspeção e palpação, a ultrassonografia de cada testículo é realizada em dois eixos, vertical e horizontal, usando gel em abundância. É necessária uma certa pressão da probe contra o testículo assim como a manutenção da face oposta com a mão, aplicando a probe de forma longitudinal e transversal ao testículo.

A avaliação ultrassonográfica testicular permite distinguir o mediastino testicular fortemente ecogênico na parte central, o parênquima testicular levemente ecogênico e a pele, bem como os envelopes do saco testicular.

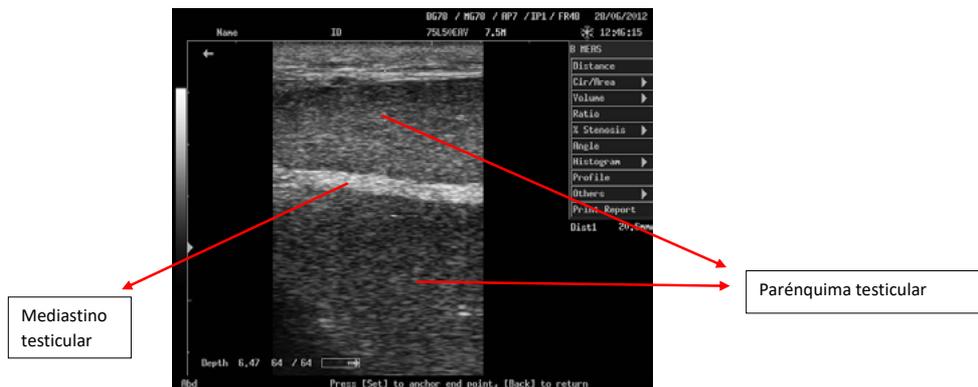


Figura 1: Corte Sagital de testículo de touro

Levando em consideração a forma ovoide do testículo, é importante fixá-lo com uma mão e aplicar uma certa pressão com a probe no escroto para obter uma imagem clara. De fato, os artefatos mais comumente observados são os cones de sombra no corte de ultrassom devido ao mau contato entre a probe e a pele.



Figura 2: Artefato na ultrassonografia testicular (área sombreada no parênquima testicular)

O exame testicular no touro permite realizar:

- medidas quantitativas de gônadas para fins zootécnicos (medida da circunferência escrotal ou do diâmetro do testículo),
- avaliação qualitativa do parênquima para fins zootécnicos ou diagnósticos (densidade do parênquima, pixelização tecidual, coleções anormais de fluido, etc).

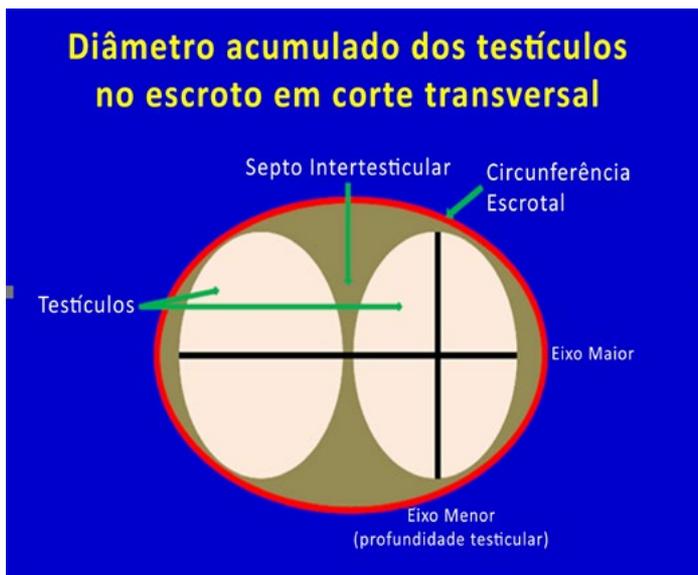
Medida zootécnicas: a) A circunferência escrotal

Nos últimos 40 anos a circunferência escrotal tem sido utilizada na avaliação da produção quantitativa de sêmen dos touros, bem como para predeterminar a idade na puberdade dos touros e suas filhas. Como regra geral, aceita-se que cada centímetro de aumento na CS é equivalente a um aumento no peso testicular na ordem de 40 gramas (Coulter, Palasz, Hai in, Kastelic).

A CS também pode ser avaliada graças ao ultrassom, obtendo a medida em centímetros através de uma fórmula de cálculo. Para isto, é necessário medir a largura e a profundidade testicular através da ultrassonografia. A mensuração da CS desta maneira é particularmente simples de ser realizada em touros jovens de 1 ano ou menos, neste sentido a probe deve ser posicionada entre a parte interna da perna do touro e a face lateral de um dos testículos à efeitos da medida do eixo maior e a posteriori perpendicular ao maior eixo dos testículos na parte central (Gérard).

Sob essas condições, a CS pode ser calculado usando a seguinte fórmula:

$C = \pi * (a + b + 1)$ onde a representa o maior eixo dos 2 testículos, b o eixo menor e 1 a fator de correção (espessura da pele escrotal) expresso em cm (Coursin).



Uma avaliação comparativa da medida de CS por centímetro e por ultrassonografia foi realizada por Gerard et al. em 16 touros de 12 a 15 meses, obtendo-se uma correlação de 0,76 entre as duas técnicas.

	Centímetro	Ecografia
Media	31,9	31,8
Desvio Padrão	2,3	1,99

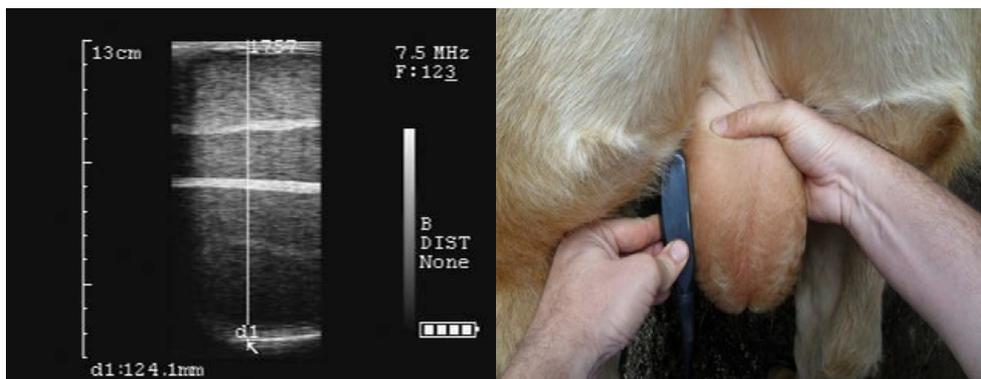


Figura 3: Mensuração do eixo maior do testículo

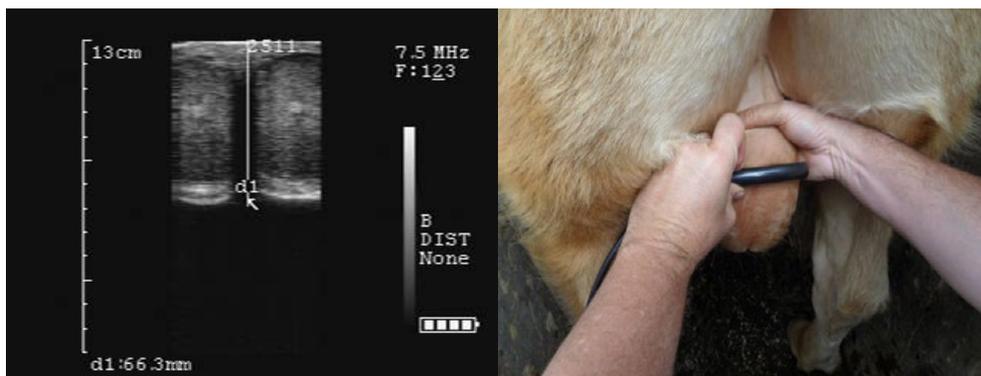
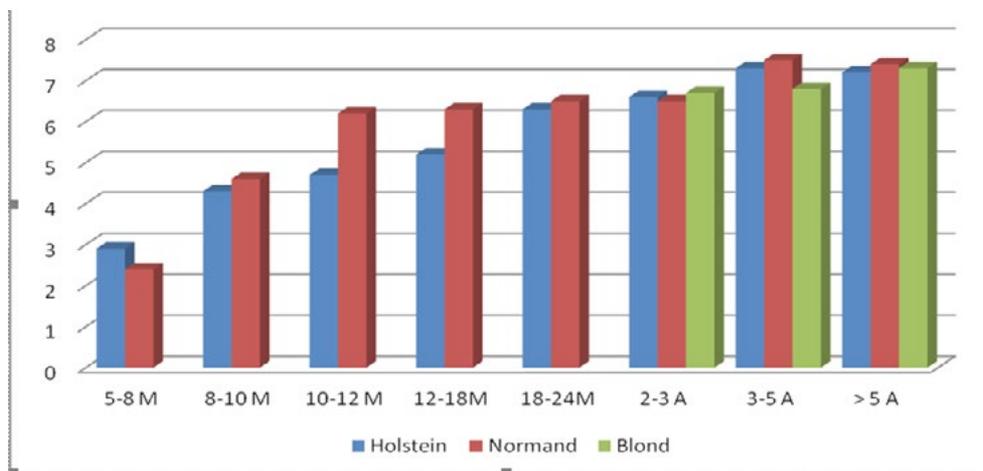


Figura 4: Mensuração da profundidade testicular (a)

Medida zootécnica: b) dimensões testiculares simples

As dimensões do diâmetro testicular dos touros destinados à produção de sêmen podem ser realizadas com a finalidade de acompanhar o crescimento do parênquima testicular durante as fases de desmame até a fase adulta.

O referido diâmetro é avaliado através do eixo caudal cranial (eixo maior) e é medido graças ao cursor do dispositivo US colocado na camada visceral da túnica vaginal do saco escrotal. Assim, Gerard avaliou touros de 3 raças diferentes entre as idades de 5 meses a 5 anos de idade e observou o aumento do parênquima testicular de um diâmetro de 3 cm em animais de 5 a 8 meses para 7,5 cm em touros adultos. A partir dos 2 anos de idade o diâmetro estabiliza em torno de 7 cm e aparece sem diferenças significativas entre as diferentes raças.



Evolução do diâmetro de parênquima testicular em touros de três raças diferentes e oito categorias de idade (Gerard)

Uso de ultrassonografia testicular para fins diagnósticos

Estudo do parênquima testicular em touros

Finalidades produtivas

A ecogenicidade do parênquima testicular varia com a idade, sendo observado aumento desde entre puberdade e a fase adulta (Evans).

Chandolia et al, Evans et al estudaram a evolução da ecotextura testicular em touros a cada 2 semanas começando na semana 2 até à semana 46 de idade quando os touros foram com 28 cm de CS (puberdade). A ecotextura aumentou de forma constante a partir de 2 semanas de vida com um ponto de inflexão na 30ª semana de vida.

O aumento da ecotextura testicular de touros jovens com a idade (ou seja, o testículo ganha em pixels e se torna cada vez mais cinza brilhante), permitiria teoricamente estimar o início da puberdade, no entanto, a medida não é mais precisa do que medição simples do CS (Kastelic, Brito).

Tentativas foram feitas para correlacionar a homogeneidade da ecotextura testicular com a produção de sêmen através do uso de software (Mazda) para análise de imagens. As imagens testiculares obtidas são importadas para o software e ele avalia a densidade cinzenta de cada área selecionada. Gerard et al avaliaram 26 touros da raça holandesa entre 10,5 e 14 meses por este método e estudados em paralelo produção de sêmen provenientes dos touros durante um período de sete semanas, resultando em que as áreas testiculares subjacentes a rete testis são aqueles encontram-se mais correlacionados com a produção de sêmen,

provavelmente de acordo com o autor, pois a probe não exerce pressão nessa área permitindo assim avaliar melhor a ecotextura.

	Volume	Concentração	Nro de spz
Media do parênquima	-0.52 (p=0.05)	-0.047 (p=0.01)	-0.39 (p=0.04)
Varianza do parênquima	-0.43 (p=0.02)	-0.49 (p=0.01)	-0.057 (p=0.02)

Figura 6: Correlações entre 3 características do sêmen de touro e as medidas ultrassonográficas

Este estudo mostra que quanto maior a densidade testicular (cinza média alta), menor o número de espermatozoides produzidos pelo testículo e quanto maior a heterogeneidade do parênquima, menor o rendimento na produção de sêmen.

No entanto, Kastelic e Brito assim como Tomlinson et al. avaliando a ecotextura testicular indicaram que ela não é suficientemente preditiva da qualidade do sêmen de touros. Combinando as medidas do CS com as obtidas pelo estudo da ecotextura avaliado pelo software, foi possível obter uma correlação média de 0,78 e classificar os touros como bons ou maus doadores de sêmen.

Combinando assim a medição do CS e os dados de ecotexturas avaliados pelo software em touros jovens que entram na CIA, é possível pré-selecionar os touros e concentrar-se naqueles que têm um futuro promissor.

Fins de diagnóstico

O US permite o exame profundo do saco escrotal e dos órgãos genitais internos, permitindo a observação de patologias não detectáveis por inspeção ou palpação.

Nesse sentido, os candidatos a esse tipo de exame são touros com problemas de fertilidade ou produção de sêmen.

O profissional inexperiente neste tipo de exame deve inicialmente se familiarizar com as imagens obtidas em touros normais.

As imagens ecográficas obtidas em patologias correspondem a:

Indicadores de degeneração testicular

a) Recente

- Perda de nitidez dos contornos testiculares
- Diminuição da densidade (pixelização) no parênquima testicular
- Diminuição da ecogenicidade do mediastino testicular
- Diminuição do diâmetro testicular
- Às vezes, acúmulo de fluido no parênquima ou entre o saco escrotal e o parênquima
- Deformidade líquida do parênquima, pressionando o testículo com a probe

b) Crônica

- Heterogeneidade do parênquima testicular

- Manchas brancas no parênquima testicular disseminadas são indicadoras de fibrose testicular. A radiação do tecido cicatricial é vista frequentemente a partir do mediastino testicular que se torna mineralizado (Fig 5). Barth et al. descreverem uma relação entre a presença de lesões de fibrose testicular com um surto de BRSV (vírus respiratório sincicial bovino).

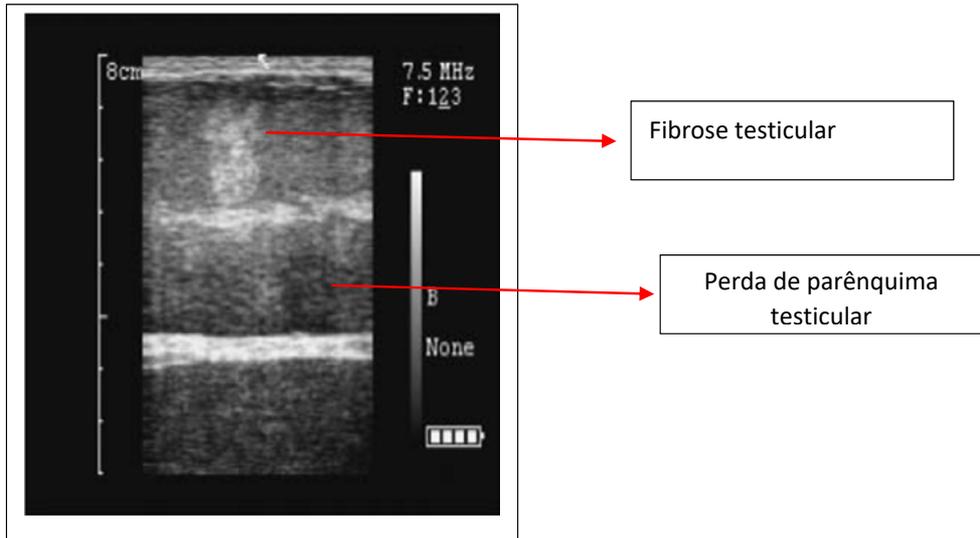


Figura 5: Corte sagital testículo apresentando sinais de degeneração testicular crônica avançada

Indicadores de hidrocele

- Imagens anecóicas entre o parênquima testicular e a túnica vaginal

Os dados obtidos durante o exame de US devem estar associados à história clínica do touro, ao exame do sêmen e / ou aos dados de fertilidade para refinar o diagnóstico.

Outras patologias, ex. vesiculite

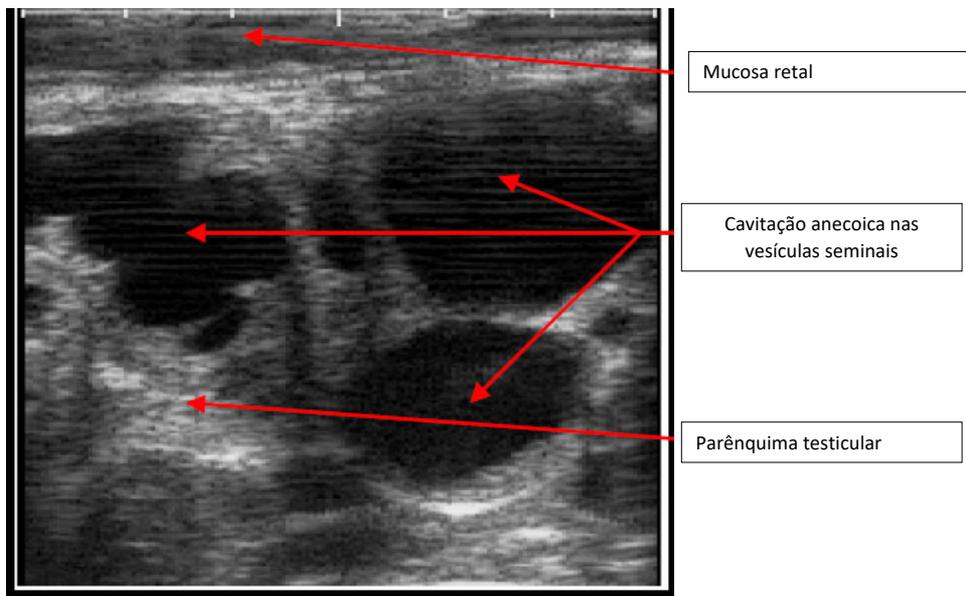


Figura 6: Corte sagital de vesícula seminal com vesiculite : perda da forma lobulada e aparição de cavitações anecoicas (Gerard).

Conclusão

O exame dos touros é realizado classicamente por inspeção e palpação, exame da libido e sêmen. Poucos veterinários já utilizam o US como um suplemento do EAT, no entanto, a técnica pode ser muito interessante.

O US é uma técnica não invasiva que permite estudar a forma, tamanho e estrutura interna das gônadas do touro. O uso do ultrassom clássico equipado com probes de 5 ou 7,5 MHz permite realizar o estudo tanto externamente quanto internamente. Treinamento é necessário e o ponto crítico para o veterinário é se familiarizar com imagens de órgãos normais.

No entanto, seu uso deve ser posicionado de acordo com o segmento em que o profissional trabalha.

Sendo assim, o US não é útil e não fornece benefícios extra no exame clássico realizado durante a seleção de touros de campo para a monta natural (clássico da EAT). De fato, essa técnica não é adequada para testes em massa, como os usados na seleção de touros.

A aplicação do US como uma ferramenta para avaliar a capacidade preditiva da qualidade do sêmen não produziu os resultados esperados até agora, porém trata-se de uma grande ajuda nos problemas patológicos do macho, de estimação da puberdade e da produção do sêmen.

Bibliografia

- Barth AD1, Alisio L, Avilés M, Arteaga AA, Campbell JR, Hendrick SH. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. **Anim Reprod Sci.** 2008 Jul;106(3-4):274-88. Epub 2007 May 13.
- Blockey, M.A.B. Using bull fertility to increase herd fertility. In: HUNGERFORD, T.G. (Ed.) **Beef cattle production.** Australia: University of Sydney, 1984. p.509-527.
- Chandolia R.K. (1997) Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. **Theriogenology**, 48:119-132.
- Chenoweth, P.J., 2015. Bull health and breeding soundness. In: Cockroft, P.D. (Ed.). **Bovine Medicine.** 3rd ed. Wiley Blackwell, Sussex, UK, pp. 246–261.
- Chenoweth, P.J., Hopkins, F.M., Spitzer, J.C., Larsen, R.E., 2010. Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation form. Clin. **Theriogenol.** 2 (1), 43–50 (Originally published by the Society for Theriogenology and the American College of Theriogenologists as Publication B-10 (7/93) in the Theriogenology Handbook).
- Chenoweth, P.J., 2000. The breeding soundness evaluation of bulls: a rationale. **Comp. Cont. Educ. Pract. Veterinarian** 22 (2), S48–S55.
- Coursin Stephane: PREDICTION DU POTENTIEL REPRODUCTEUR DE JEUNES TAUREAUX PAR ECHOGRAPHIE TESTICULAIRE ET MESURE DE LA CIRCONFERENCE SCROTALE. ANNEE 2012 THESE: 2012 – TOU 3 – 4066
- G.H. Coulter, R.H. Foote. Relationship of Testicular Weight to Age and Scrotal Circumference of Holstein Bulls. **Journal Dairy Science**, v. 59, Issue 4, April 1976, Pages 730–732.
- Dwyer, C., 2013. Results of an investigation into dairy Herd bull fertility and management in Tasmania. In: Proc. **Australian Cattle Veterinarians**, Darwin, pp. 123–126.
- Gérard, O. Use of ultrasonography to monitor reproductive capacity of AI bulls. **AI vets Meeting Ghent**, September 2009
- J. Hai-in, 3 R. H. Foote and G. E. Seidel, JR. Testicular growth and related sperm output in dairy bulls 1.2 **J ANIM SCI** 1969, 29:41-47.
- JP Kastelic, LFC Brito. Ultrasonography for Monitoring Reproductive Function in the Bull. v. 47, Issue Supplement s3, pages 45–51, June 2012
- Menagassi, S.R.O., Barcellos, J.O.J., Lampert, V., Borges, J.B.S., Peripolli, V., 2011. Bioeconomic impact of bull breeding soundness examination in cow-calf systems. **Revista Brasileira Zootecnia** 40 (2), 441–447
- Norman, S., Fordyce, G., Beggs, D., 2004. Bull reporter: the development of a computerised system for the standardised recording and reporting of bull breeding soundness evaluation and semen morphology data. In: Proceedings of the Australian Cattle Veterinarians Conference, Canberra, pp. 47–53.
- O.J.Ginthera. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v. 81, Issue 1, 1 January 2014, Pages 112-12
- Gnemmi, G., Lefebvre, R.C.. Ultrasonod imaging of the bull reproductive tract: an important field of expertise for veterinarians. **Vet Clin Food Anim** 25(2009)767-779
- JP, Kastelic, LFC, Brito. Ultrasonography for Monitoring Reproductive Function in the Bull. v. 47, Issue Supplement s3, pages 45–51, June 2012
- A.T. Palasz, W.F. Cates, A.D. Barth, R.J. Mapletoft The relationship between scrotal circumference and quantitative testicular traits in yearling beef bulls. v. 42, Issue 4, September 1994, Pages 715–726
- Pierson AR, JP Kastelic, OJ Ginther. 1988. Basic principles and techniques for transrectal ultrasonography in cattle and horses. **Theriogenology** 29, 3-20.
- Rault P, Gérard O Examen échographique génital du taureau: gestation, néotologie et post partum. **Le point vétérinaire Reproduction de ruminants** 2006, pp 32.39.
- MartinTomlinson AmyJennings Alastair Macrae IsabelleTruyers. The value of trans-scrotal ultrasonography at bull breeding soundness evaluation (BBSE): The relationship between testicular parenchymal pixel intensity and semen quality. **Theriogenology**, v. 89, February 2017, p. 169-177.
- Wiltbank, J.N., Parrish, N.R., 1986. Pregnancy rate in cows and heifers bred to bulls selected for semen quality. **Theriogenology**, 779–783.

Aplicações da termografia por infravermelho na andrologia animal

Marcelo George Mungai Chacur
Universidade do Oeste Paulista,
e-mail: marcelo.chacur@uol.com.br

Abstract: The homeothermic animal species that live in the intertropical area of the globe suffer thermal stress, which has a negative influence on the reproduction activity. Precision animal reproduction aggregates imaging procedures such as digital infrared thermography that assists in the monitoring of thermal stress in breeding herds of economic interest. In terrestrial mammals with testicles in the scrotum, testicular thermoregulation can be evaluated indirectly by measuring the surface temperature of the scrotal skin with infrared thermography. It is worth noting that imaging tests such as thermography should be complementary to the clinical examination of the male reproductive system for correct interpretation and contributory use. Like thermography, non-invasive imaging tests, with accuracy, without adverse effects to the animal; and practice and rapid achievement are studied and will be increasingly developed and applied in different types of animal management to monitor health and reproduction activity.

Keywords: semen, thermogram, thermoregulation

Palavras-chave: sêmen, termograma, termorregulação

Introdução

A reprodução de precisão agrega ferramentas para fins de detectar e quantificar fatores que estão atuando de forma negativa na performance reprodutiva dos animais. O arsenal tecnológico usado em andrologia animal aumenta a cada dia. O bem-estar animal e as boas práticas de criação dos mesmos, requerem o uso de exames de imagem, os não invasivos e de acurácia como a termografia de infravermelho ganham espaço. A termografia possibilita mensurar a temperatura da superfície de áreas do corpo de animais monitorando o estresse térmico que causa queda na fertilidade nos machos. O presente manuscrito tem o objetivo de apresentar a termografia por infravermelho como ferramenta complementar ao exame semiológico do aparelho reprodutor de algumas espécies animais do sexo masculino de interesse zootécnico e usadas em atividades de pesquisa em bioterismo; e alguns resultados de pesquisas serão relatados do ponto de vista da aplicação da termografia por infravermelho na andrologia animal.

Parâmetros climáticos no estresse térmico de animais

Os parâmetros climáticos influenciam na atividade de reprodução dos animais homeotérmicos que sofrem estresse térmico quando submetidos a altas temperaturas do ambiente e elevada umidade do ar [1, 2, 3]. Com o advento da ampliação do uso de equipamentos eletrônicos na atividade pecuária como computadores, programas computacionais, câmeras de vídeo, aparelhos de ultrassonografia e demais dispositivos de precisão que monitoram o dia a dia de animais criados em rebanhos para fins comerciais, o termo “pecuária de precisão” e dentro dela a “reprodução de precisão” tem sido aliados do criador e dos profissionais que atuam com animais na atividade de monitorar, identificar alterações no comportamento e parâmetros fisiológicos como a temperatura da superfície do corpo de animais sob estresse térmico ou sinal clínico como a febre [4, 5, 6]. À despeito do uso de equipamentos eletrônicos modernos na atividade clínico-reprodutiva em animais, vale destacar que o exame semiológico é imprescindível para o adequado diagnóstico e que o uso de equipamentos deve ser feito como ferramenta de exame complementar ou como exame de auxílio na triagem em situações específicas.

Dentre os exames complementares de imagem, a termografia digital de infravermelho é uma das opções para mensurar a temperatura da superfície do corpo de animais com acurácia e de modo não invasivo, podendo ser realizada, repetidamente, sem efeito colateral ou risco para a saúde do animal e do operador.

Características da termografia digital por infravermelho

A mensuração de temperaturas da superfície de um objeto pode ser realizada com uso da termografia digital de infravermelho. A termografia é um exame de imagem utilizado em ciência animal para monitorar a temperatura de áreas do corpo de animais de forma individual ou de um grupo de animais. As informações abaixo descritas tem o objetivo de facilitar ao leitor a compreensão, de forma genérica, do processo físico da termografia de infravermelho. Primeiramente, o exame de termografia por infravermelho é pautado pela mensuração da energia eletromagnética irradiada por um corpo físico. A radiação eletromagnética pode ser definida como um fluxo de fótons, partículas sem massa que se deslocam com a velocidade da luz [7].

A termografia de infravermelho é o registro da temperatura da superfície de um corpo físico, pois todo corpo com temperatura acima do zero absoluto emite radiação térmica. A história da termografia se iniciou há aproximadamente 200 anos, em 1800, Willians Herschel e depois seu filho John Herschel em 1840, obtiveram as primeiras imagens utilizando o sistema infravermelho com técnica evaporográfica com álcool, registrada em superfície pintada com cinzas (Holst, 2000). A termografia por infravermelho é um exame de imagem não invasivo que auxilia na identificação do estresse térmico em animais. A análise de imagens termográficas (termogramas) por infravermelho propicia visualizar gradientes de temperatura, utilizados no estudo de mecanismos fisiológicos e de patologias em animais e humanos [9].

O monitoramento de animais com infravermelho colabora no controle de doenças, pois identifica a elevação da temperatura de áreas da superfície do corpo de animais silvestres e

domésticos. A atividade de reprodução em animais de rebanho para fins comerciais pode ser acompanhada pelo uso da termografia de infravermelho, conforme descrito por Chacur et al. (2017b) no livro intitulado Tecnologias para Agricultura Sustentável.

Uso de termografia por infravermelho em animais

A termografia por infravermelho foi utilizada na Medicina Veterinária pela primeira vez em 1965 por Delahanty e Georgi, quando imagens termográficas (termogramas) de áreas do corpo de equinos foram registrados [10]. Como exame de imagem, a termografia por infravermelho é usada na prática em animais de três maneiras: 1 - como ferramenta de auxílio diagnóstico, nestes casos, torna-se um método de registro de “imagem fisiológica”, onde a diferença de temperatura entre duas regiões anatomicamente simétricas indica possível alteração circulatória; 2 - para aumentar as possibilidades de exame complementar, nestes casos a termografia mapeia áreas suspeitas de isquemia ou inflamação, onde a temperatura seja menor ou maior; e 3 - nas boas práticas de criação que adotam o bem-estar animal, neste caso, os animais são monitorados no ambiente natural, instalações rurais ou cativeiro [11].

Atualmente, o bem-estar animal tem sido objeto de estudo de reuniões científicas e publicações técnicas de forma crescente, sendo a atividade de reprodução dos animais influenciada pelo conforto térmico, o qual pode ser monitorado com termografia de infravermelho com equipamentos manuais portáteis ou instalados de forma fixa em áreas específicas da propriedade rural, assunto esse abordado no livro Fórum Ambiental [4].

Andrologia animal e a termografia por infravermelho

Antes de relatar resultados de pesquisa com termografia de infravermelho na andrologia, informações quanto ao uso desse exame de imagem são descritas abaixo como um procedimento que auxilia no manejo reprodutivo e monitoramento da saúde em animais de interesse zootécnico.

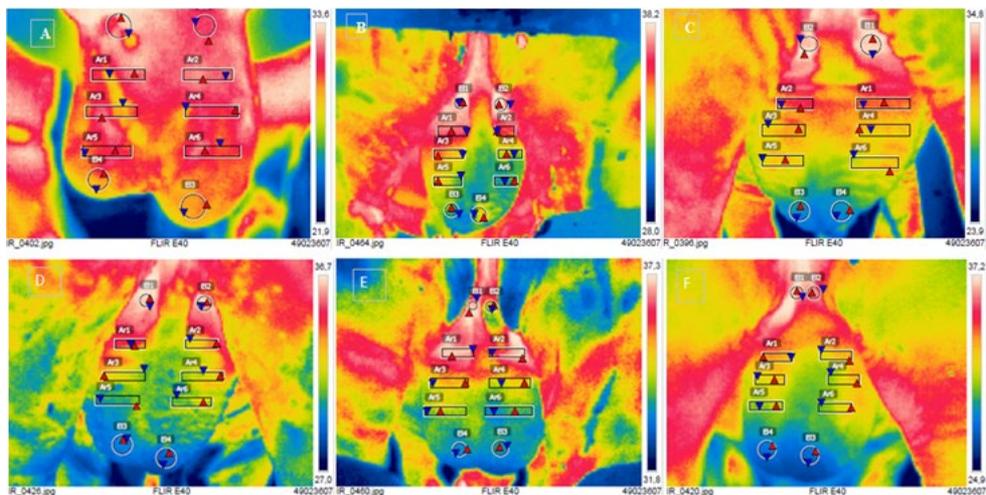
O mecanismo da termorregulação testicular é importante para a eficiente produção de espermatozoides. Dessa forma, em condições fisiológicas, a temperatura da superfície da pele do escroto de um touro da espécie bovina é de 4 a 6°C mais baixa do que a temperatura abdominal com decréscimo da temperatura da superfície da pele da bolsa escrotal, conforme se afasta do colo do escroto em direção às caudas dos epidídimos, sendo as áreas ventrais do escroto mais frias em relação às áreas dorsais [12].

Na sequência, são apresentados alguns resultados de pesquisas do nosso grupo e demais autores que usaram a termografia por infravermelho na andrologia animal.

No Brasil, em touros da raça Nelore, estudou-se a relação dos fatores climáticos com a temperatura da superfície da pele do escroto e qualidade seminal com termografia digital de infravermelho. Houve correlação positiva ($P < 0,05$) para motilidade espermática x temperaturas do escroto; concentração espermática x temperaturas do escroto; fatores climáticos x temperatura retal. Houve correlação negativa ($P < 0,05$) entre temperatura ambiente x concentração espermática. Concluindo que as temperaturas da superfície do escroto e os

fatores climáticos: temperatura e umidade do ar influenciaram na qualidade do sêmen e que a termografia é recomendada como exame complementar na avaliação reprodutiva de touros (Ruediger et al., 2016). Para ilustrar, abaixo segue a Figura 1, com termogramas do escroto de touros Nelore com a classificação de imagens: satisfatória (termorregulação testicular adequada), questionável (termorregulação testicular desequilibrada) e insatisfatória (termorregulação testicular insatisfatória) [13].

Figura 1. Imagens de termografia por infravermelho do escroto de touros Nelore e classificações do termograma quanto a termorregulação testicular em satisfatória, questionável ou insatisfatória.



A – Imagem termográfica com classificação (Insatisfatória). B - classificação (questionável). C – classificação (Satisfatória). D – classificação (questionável). E- classificação (questionável). F- classificação (Satisfatória).

Em outro estudo, termografia de infravermelho foi utilizada para mensurar a temperatura da superfície da pele do escroto antes e após a colheita de sêmen e obter a correlação dessas temperaturas com a qualidade do sêmen em touros Nelore. Cada termograma foi processado; e obtidos os seguintes dados, padronizando e adotando a sigla T1: temperatura do cordão espermático; T2: temperatura do terço dorsal dos testículos; T3: temperatura do terço médio dos testículos; T4: temperatura do terço ventral dos testículos, e T5: temperatura das caudas dos epidídimos. Houve diferenças ($P < 0,05$) entre temperaturas de superfície do escroto antes e após a colheita do sêmen e entre pontos anatômicos analisados (T1 a T5). Houve correlações ($P < 0,05$) entre T2 \times defeitos totais ($r = 0,30$); T3 \times defeitos menores ($r = 0,35$); T3 \times defeitos maiores ($r = 0,30$) e T3 \times defeitos totais ($r = 0,42$); T4 \times defeitos menores ($r = 0,30$), T4 \times defeitos maiores ($r = 0,28$) e T4 \times defeitos totais ($r = 0,37$); T5 \times defeitos maiores ($r = 0,29$) e T5 \times defeitos totais ($r = 0,28$). Houve correlação ($P < 0,05$) entre RT \times T1 ($r = 0,51$); RT \times T2 ($r = 0,43$); RT \times T3 ($r = 0,37$); RT \times T4 ($r = 0,33$) e RT \times T5 ($r = 0,32$). A termografia infravermelha digital, antes e depois da eletrojaculação, proporcionou mensurações precisas

da temperatura do escroto. Portanto, a termografia é adequada para detectar alteração na termorregulação escrotal de touros, conforme descrito por Souza et al. (2017) e prática e rápida de ser feita na rotina de campo em exames andrológicos de touros [15].

Exames não invasivos como a termografia de infravermelho são úteis em touros bubalinos, pois esses reprodutores se estressam com facilidade quando contidos fisicamente por períodos longos e reagem de forma brusca quando submetidos a procedimentos invasivos como injeções ou pressão sobre a pele.

A termografia de infravermelho foi utilizada em búfalos machos clinicamente sadios com média de temperatura retal de $38,2 \pm 0,5^\circ\text{C}$, obtendo temperaturas médias para as seguintes áreas do corpo: órbita ($36,1 \pm 0,8^\circ\text{C}$), flanco ($36,9 \pm 2,4^\circ\text{C}$) e pele do escroto ($33,3 \pm 1,1^\circ\text{C}$), concluindo que a temperatura da órbita teve alta correlação com a temperatura retal e que as temperaturas de áreas do corpo podem ser mensuradas por termografia de maneira precisa e não invasiva [16]. Do ponto de vista aplicado devido à alta correlação entre a temperatura da órbita com a temperatura retal, o uso da termografia pode substituir a mensuração realizada com termômetro clínico retal, reduzindo o estresse do animal.

O búfalo predomina nas áreas quentes do globo terrestre, dessa forma experimentos são realizados para estudar o efeito da radiação solar na temperatura do corpo de búfalos.

Sete búfalos da raça Murrah com idades entre 3 e 4 anos foram examinados com termografia de infravermelho, antes e após a exposição ao sol por três horas, sendo obtidas médias de temperaturas à sombra: retal $37,4 \pm 0,4^\circ\text{C}$ e do escroto $30,6 \pm 1,4^\circ\text{C}$; e de temperaturas ao sol: retal $39,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$ e do escroto $35,2 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Concluindo que a termografia é útil no estudo da termorregulação escrotal e na avaliação de reprodutores da espécie bubalina [17].

A termografia de infravermelho pode ser usada para estudar a correlação entre a temperatura do escroto com a qualidade do sêmen, com colheita de dados de grande número de animais em diversos experimentos, será possível criar um modelo do perfil de termograma, onde variações fisiológicas da temperatura escrotal poderão ser indicativas de provável satisfatório quadro seminal.

No Brasil, oito búfalos com idade entre 3,0 e 3,5 anos, perímetro escrotal de 32 a 36 cm e sêmen de boa qualidade: motilidade 80 a 90%, vigor de 4 a 5, concentração de 550 a $985 \times 10^6/\text{mL}$ foram examinados com aparelho de termografia de infravermelho, sendo os termogramas do escroto processados em programa de computador obtendo imagens (termogramas) similares dos escrotos para o gradiente de temperatura, com média de temperatura do escroto de $33,5 \pm 0,4^\circ\text{C}$, e temperatura retal de $38,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, sugerindo adequada termorregulação testicular, concluindo ser um exame com potencial de uso na triagem de machos para a reprodução, complementando o exame andrológico (Chacur et al., 04/03/2019, Universidade do Oeste Paulista, “informação pessoal”).

Em touros das raças Girolando e Nelore, mantidos em Central de Inseminação Artificial, foram mensuradas as temperaturas da superfície da pele do escroto com termografia por infravermelho com temperaturas superiores ($P < 0,05$) para o globo ocular, cordão espermático e porção proximal do testículo na raça Girolando, em relação a raça Nelore (Tabela 1) [18].

Tabela 1. Média±DP das temperaturas obtidas por termografia (°C) do globo ocular (GO), mufla, cordão espermático (CESP), porção proximal do testículo (PPT), porção distal do testículo (PDT), cauda do epidídimo (CEPID) de touros das raças Girolando e Nelore.

Raça	GO	mufla	CESP	PPT	PDT	CEPID
Girolando	33,07±1,63 ^A	26,39±3,31	32,19±1,75 ^A	32,45±1,89 ^A	30,47±2,21	27,88±2,75
Nelore	31,83±1,83 ^B	25,61±3,74	30,97±1,91 ^B	31,17±1,84 ^B	29,91±1,61	27,99±2,11

Letras diferentes nas colunas (P <0,05).

Em animais de biotério a termografia por infravermelho pode ser usada na andrologia para o estudo de efeitos de substâncias e fármacos em desenvolvimento e suas ações na termorregulação dos testículos. Dessa forma, Yamada et al. (2019) desenvolveram um projeto de pesquisa onde objetivou-se estudar o efeito do ômega 3 e da vitamina B12 no espermograma, na histomorfometria dos órgãos reprodutivos e na temperaturas do corpo com termografia infravermelha em ratos Wistar. Utilizaram-se 16 ratos, em quatro grupos (n=4), que receberam injeções diárias por 30 dias, sendo: grupo controle – solução salina; grupo ômega 3 – óleo de peixe 1g/kg; grupo B12 – vitamina B12 3µg; e grupo ômega 3 + B12 – óleo de peixe 1g/kg e vitamina B12 3µg. Imagens termográficas de áreas do corpo foram obtidas. No 30º dia, os ratos foram sacrificados e realizaram-se as análises de morfologia espermática e histomorfometria. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5%. A temperatura da superfície do escroto foi superior no grupo B12 (P<0,05). Não houve diferenças entre grupos (P>0,05) para temperaturas do globo ocular. Houve correlação entre temperatura da superfície do escroto e porcentagem de gota citoplasmática distal (P=0,678). A elevação da temperatura do escroto resulta no aumento da porcentagem de gotas citoplasmáticas distais. A temperatura do globo ocular não sofre influência significativa do ômega 3 e da vitamina B12. O ômega 3 reduz o epitélio seminífero, e a vitamina B12 minimiza esse efeito. As temperaturas mensuradas por infravermelho em áreas da superfície do corpo de ratos machos estão apresentadas na Tabela 2 [19].

Tabela 2. Médias e desvios-padrão de temperatura média por infravermelho (°C) de áreas do corpo de ratos Wistar adultos, tratados com ômega 3 e ou vitamina B12, por via subcutânea, durante 30 dias

Área do corpo	Controle	Ômega 3	Vitamina B12	Ômega 3 + vitamina B12
Escroto	27,2±1,8 c	27,8±2,2 b	28,5±2,2 a	27,8±1,8 bc
Perianal	30,8±1,5 a	30,8±1,2 a	30,8±1,3 a	30,2±1,2 a
Ísquio	28,7±1,8 a	29,0±1,8 a	29,1±1,6 a	28,7±1,4 a
Prepúcio	29,4±1,7 b	29,8±2,0 ab	30,3±1,6 a	29,7±1,5 ab
Focinho	24,6±0,3 b	26,5±1,0 a	26,2±1,1 ab	26,6±1,3 ab
Globo ocular	33,0±0,9 a	33,8±0,6 a	33,3±1,0 a	35,0±0,8 a
Entre olhos	28,7±0,5 a	29,8±0,7 a	29,0±0,9 a	30,4±0,7 a

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas (P≤0,05) pelo teste de Tukey. Letra “a” representa as temperaturas maiores, “b” as intermediárias e “c” as menores.

Reflexões para a termografia por infravermelho na andrologia

A termografia por infravermelho é usada para monitorar processos automatizados de empresas que investem na reprodução animal. Em particular, a instalação de câmeras termográficas fixas em baias e piquetes; e instalações e ambientes que alojem animais de produção, permitindo a detecção precoce de elevação de temperatura dos animais em doença ou como resposta fisiológica, auxiliando na tomada de decisões para o retorno do bem-estar animal. Câmeras termográficas registram, salvam, processam e enviam imagens em forma de termogramas com conectividade via *e-mail* e *Bluetooth*, num futuro próximo câmeras de infravermelho com realidade virtual poderão operar em três dimensões, resultando em imagens tridimensionais do corpo e áreas do corpo examinadas de forma não invasiva e em tempo real, compartilhando a imagem em interfaces com dispositivos eletrônicos em grandes distâncias.

Considerações finais

Para as espécies animais de produção bem como para as de uso em pesquisas em biotérios, o conforto térmico se faz necessário para que a produção de sêmen seja de boa qualidade, colaborando com a multiplicação das espécies. Atualmente, cresce o enfoque em estudos inerentes à biotecnologia da reprodução em machos para o uso de sêmen refrigerado ou congelado em outras biotécnicas na esfera feminina, sendo a termografia por infravermelho uma ferramenta útil na escolha dos machos para fins de reprodução.

Dentre os procedimentos, os exames de imagem não invasivos ganham espaço, pois não influem de forma negativa no bem-estar animal. A termografia de infravermelho, realizada com câmera termográfica é um exame de imagem com os seguintes pontos positivos: 1 – execução rápida e prática; 2 – acurácia comprovada para mensurar temperaturas; 3 – sem efeitos deletérios ao homem e animais; 4 – pode ser repetida imediatamente; 5 – resultado imediato pela formação de imagem (termograma); 5 – exame de imagem não invasivo e 6 – não causa estresse ao animal. Como pontos limitantes para o largo uso da termografia de infravermelho são listados: 1 – elevado custo da câmera termográfica; 2 – necessidade de treinamento específico do operador; 3 – ausência de padronização de imagens em espécies animais; 4 – necessidade de ampliar dados coletados em pesquisas e analisados pela estatística. A termografia é útil como exame de imagem, complementando o exame semiológico do aparelho reprodutor de machos.

Referências bibliográficas

- [16] Barros DV, Silva LKX, Kahwage PR, Lourenço Júnior JB, Sousa JS, Silva AGM, Garcia AR. Assessment of surface temperatures of buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) raised under tropical conditions using infrared thermography. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.68, n.22, p.422-430, 2016.
- [9] Bouzida N, Bendada A, Maldague XP. Visualization of body thermoregulation by infrared imaging. **J Thermal Biol**, v.34, n.3, p.120-126, 2009.
- [1] Chacur MGM, Oba E, Ferreira JCP, Velloso NM. Physiological changes occurred in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) subject to thermal stress. **Revista Veterinária**, v.21, p.930-931, 2010a.
- [2] Chacur MGM, Oba E, Ferreira JCP, Velloso NM. Thermal stress in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*): evaluation of reproductive characteristics. **Revista Veterinária**, v.21, p.972-974, 2010b.

- [4] Chacur MGM, Souza CD, Bastos GP, Gabriel Filho LRA, Cremasco CP, Putti FF. Fatores climáticos e bem-estar em bovinos: enfoque na reprodução e lactação. In: Silva ALC, Benini SM, Dias LS. (Org.). **Fórum Ambiental** - Uma visão multidisciplinar da questão ambiental. 2ed. Brasil: ANAP, 2016c. p.253-270.
- [6] Chacur MGM, Souza CD, Gabriel Filho LRA, Gabriel CPC, Rodrigues GS, Putti FF. Integração da lavoura e pecuária como alternativa de produção sustentável. In: Putti FF (Org.). **Tecnologias para Agricultura Sustentável**. 1ed. Brasil: ANAP, 2017b, p.22-40.
- [15] Chacur MGM, Souza CD, Ruediger FR, Andrade IB, Cartocci JS, Bastos GP, Oba E, Ramos AA, Gabriel-filho LRA, Putti FF, Cremasco CP. Efeito da colheita de sêmen por eletroejaculação na temperatura da bolsa escrotal em touros Nelore, *Bos taurus indicus*. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 21, 2015, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2015. p.85. Resumo.
- [5] Gabriel Filho LRA, Putti FF, Cremasco CP, Bordin D, Chacur MGM. Software to assess beef cattle body mass through the fuzzy body mass index. **Eng Agrícola**, v.36, p.179-193, 2016.
- [8] Holst GC. **Common Sense approach to thermal imaging**. Winter Park: JCD Publishing, 2000.
- [12] Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH. Contribution of scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. **J Reprod Fertil**, v 108, p 81-85, 1996.
- [7] Kleiber M. **The fire of life an introduction to animal energetic**. 2. ed. New York: Robert e Krieger Publishing Company, 1975.
- [11] Kunc P, Knizkova I. The Use of Infrared Thermography in Livestock Production and Veterinary Field. In: **Infrared Thermography Recent Advances and Future Trends**. 2012. p.85-101.
- [10] Palmer SE. Use of the portable infrared thermometer as a means of measuring limb surface temperature in the horse. **Am J Vet Res**, v.42, p.105-108, 1981.
- [17] Ramires Neto C, Resende HL, Monteiro GA, Zorzetto MF, Sancler S, Yame FR, Oba E. Scrotal Thermography and Doppler Ultrasonography of the Testicular Artery of Buffaloes Subjected to Environmental Heat Stress. **Buffalo Bulletin**, v.32, p.1145-1145, 2013.
- [18] Redivo Junior, N et al. Estudo da relação de perfis de termogramas de infravermelho do escroto com a qualidade do sêmen fresco e congelado em touros Nelore e Girolando. **Semina Agrárias**, 2019 (no prelo).
- [13] Ruediger FR, Chacur MGM, Alves FCPF, Oba E, Ramos AA. Digital infrared thermography of the scrotum, semen quality, serum testosterone levels in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) and their correlation with climatic factors. **Semina Agrárias**, v.37, p.221-232, 2016.
- [14] Souza CD, Chacur MGM, Ruediger FR, Andrade IB, Cartocci J, Bastos GP, Oba E, Ramos AA, Gabriel Filho LRA, Putti FF, Cremasco CP. Scrotal surface temperature in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*). In: International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 6, 2016, Campos do Jordão. **Abstract...** Campos do Jordão: CBRA, 2017, p.284. Abstract.
- [19] Yamada, L.M.M.; Souza, CD; Branco, IT; Andrade, IB; Deak, FLGB; Bastos, GP; Silva, JG; Amoris, JVR; Yamada, LY; Goiozo, PFI; Gabriel Filho, LRA; Chacur, MGM. Efeito do ômega 3 e da vitamina B12 no espermograma, na histomorfometria dos órgãos reprodutivos e nas temperaturas do corpo com termografia infravermelha em ratos Wistar. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.71, n.1, p.211-218, 2019.

Agradecimentos: Ao CNPq e FAPESP pelos auxílios concedidos.

Inovações no tratamento de infertilidade em reprodutores: uso da homeopatia

Mônica F. A. Souza

Médica Veterinária, especialista em Homeopatia Veterinária
SIGO Homeopatia Veterinária, monica.rt@sigohomeopatia.com.br

Abstract: Homeopathy is a health science that proposes a clinical and therapeutic approach to the treatment of the individual or a population, developed by Samuel Hahnemann. Four pillars support homeopathy and include it as veterinary medical and medical science: Law of Similars, enunciated by Hippocrates, Experimentation in the Human Being, Dilution and Dynamization of the substances contained in the mineral, vegetable and animal kingdoms and the Use of a Single Medicine in trials. These pillars are also based on the Law of Vitalism, whose statement prevails that the imbalance of the Vital Force is the determining factor for the illness of an organism and in this way only ultradilutions, because they are greats of the field of Physics, would act in the Vital Energy, entity of the same nature. The use of homeopathy promotes an increase in animal fertility, in the treatment of pathologies and animal stress, reflecting reproductive efficiency.

Keywords: andrology, bulls, semen.

Introdução

A Homeopatia é uma ciência da saúde que propõe abordagem clínica e terapêutica para o tratamento do indivíduo doente, desenvolvida por Christian Friedrich Samuel Hahnemann no final do século XVIII, quem primeiro a empregou em animais [1] Kent, 1993). Pode ser utilizada na terapêutica, assim como na prevenção de diversas afecções. Na medicina veterinária, a homeopatia passou a ser especialidade em 1995, através da Resolução nº 625/95 do Conselho Federal de Medicina Veterinária e Zootecnia [2] (Brasil, 1995). Existem duas leis que sustentam a homeopatia como parte da medicina. A primeira é a Lei dos Semelhantes - "*Similia similibus curentur*" - (os semelhantes que se curam pelos semelhantes) e, a segunda, a Lei do Vitalismo [3] (Benites, 2006). A Lei dos Semelhantes trata-se de uma lei natural que foi observada durante a evolução das moléstias quando, junto a elas, instala-se outro processo mórbido semelhante, esse interrompe ou cura o processo inicial. Um dos exemplos clássicos que Hahnemann utiliza no livro *Organon* é a não infecção de crianças por coqueluche quando as mesmas já haviam sido acometidas por sarampo, pois as duas doenças guardam grande semelhança na natureza de sua febre e tosse [3]. Hipócrates já citava a cura por similaridade, o qual denominava reação homeostática curativa, que encontra embasamento científico no estudo do "efeito rebote" ou "reação paradoxal" das drogas modernas. Por exemplo, drogas

utilizadas no controle da hipertensão arterial podem provocar uma hipertensão arterial de rebote, como reação secundária do organismo ao estímulo primário). Sua segunda lei é explicada pela condição que rege e harmoniza o ser vivo, fenômeno imaterial que inexiste na substância mortal e que caracteriza a vida, na sua essência diferencia as matérias vivas das não vivas. Também em *Organon*, Hahnemann descreve que no estado de saúde, a força vital de natureza espiritual, que dinamicamente anima o corpo material, reina com poder ilimitado e mantém todas as suas partes em atividade harmônica, nas suas sensações e funções [3]. A partir das duas leis surgiram três princípios essenciais à prática da homeopatia: 1) Experimentação no indivíduo: sendo o principal pilar de sustentação da ciência, pois determina quais respostas dos diferentes organismos surgem ao estímulo de um mesmo medicamento; 2) Individualização: uma vez já conhecido os efeitos do medicamento, é necessário conhecer o indivíduo, para decidir qual medicamento deve ser ministrado em um determinado momento; 3) Dinamização: é o princípio das pequenas doses ou infinitesimal [3]. Com a dinamização dos medicamentos são gerados dois outros processos: a diluição e a succussão. Na prática a utilização de produtos homeopatizados baseia-se na comparação entre os sintomas apresentados pelo doente, repertorização, e os apresentados nas experimentações medicamentosas, permitindo assim a escolha correta em cada caso.

Aplicação da homeopatia em medicina veterinária

Há poucos experimentos conduzidos com animais e embora a grande maioria da literatura médica seja humana, as adaptações devem ser feitas para tratar as demais espécies [3]. A terapêutica utilizada nos princípios homeopáticos é a do estímulo do organismo para agir por si só, e não uma terapêutica que age no organismo, contrapondo-se a alguma ação dele ou mimetizando substância que ele mesmo produz. Neste sentido, o meio, e suas interações, que rodeiam o animal são importantes [4]. A homeopatia é uma ciência que individualiza o paciente, promovendo a integração entre seus sintomas físicos e suas características mentais. No entanto, ao aplicar-se a populações extensas, 100 animais ou mais, o tratamento pode ser realizado com segurança, pois o princípio denominado *Genius epidemius*, criado por Hahnemann, estará sendo aplicado [5] (Souza, 2002). O tratamento homeopático de um rebanho apresenta algumas vantagens citadas por Souza (2002, [5]) como: equilíbrio animal (diminuição de estresse), facilidade de administração, inexistência de resíduos e ausência de contaminação do meio ambiente. O tratamento homeopático curativo pode ser utilizado em organismos com doença estabelecida, a exemplo das mastites na pecuária leiteira na diminuição da CCS (Contagem de Células Somáticas) em vacas leiteiras [7]. Conforme resultados obtidos por Cucco et al, atualmente, sabe-se que a característica profilática apresentada pela homeopatia no tratamento de rebanhos é muito valorizada, pois animais que não adoecem tem melhor desempenho, dispensam a contenção e medicação, não sofrem estresse e conseqüentemente, apresentam melhor desempenho e melhor relação custo benefício da pecuária enquanto atividade econômica. Neste contexto, Cucco et al. (2016, [9, 10]) trataram matrizes bovinas nelore com complexo homeopático objetivando proteger de diarreias neonatais e dermatofilose os fetos via transplacentária e bezerras via aleitamento, em trabalhos distintos, demonstrando redução de aproximadamente 80% (índice do ano anterior) para 1,33% na

prevalência da enfermidade, no caso da dermatofilose e de 30% para 3,76% no caso das diarreias neonatais e acréscimo do peso à desmama dos animais não acometidos pela dermatofilose de média de 15 kg e média de 23 kg nos animais que não apresentaram diarreia neonatal.

Um atributo do tratamento homeopático é promover o incremento de índices zootécnicos. Esse fenômeno ocorre em animais não exatamente doentes, do ponto de vista clínico, mas que apresentam melhora do desempenho após administração de princípios homeopáticos. Uma hipótese para a ocorrência deste fenômeno é que no melhoramento animal, ao selecionar uma característica desejável promove-se desequilíbrio de outras, modificando a constituição arquetípica de determinadas espécies ou raças. A homeopatia, por seu caráter de equilíbrio orgânico, resgataria esse arquétipo original [1]]. Segundo Cucco (2019, [11]) essa propriedade da homeopatia é demonstrada no experimento realizado em bovinos machos castrados, mestiços simenthal confinados (raça continental de dupla aptidão). Ferreira (2005, [12]) observou que o grupo tratado com homeopatia, *Calcarea carbonica* 30 CH e *Calcarea phosphorica* 30 CH na proporção de 1:1, veiculadas em carbonato de cálcio, apresentou um menor peso visceral ao abate e um deslocamento vantajoso dos depósitos de gordura interna para a região subcutânea, obtendo aumento 0.9% de aproveitamento de carcaça no grupo tratado com homeopatia em comparação com o grupo controle. Por ser uma terapêutica que age de forma eficiente no controle do estresse animal, Cucco et al. (2015, [8]) demonstraram o efeito da utilização de um produto homeopático à base de *Chamomilla* CH12 e *Artemisia* CH12 (SodoSigo®) sobre o comportamento de BSS (sigla do termo em inglês para sodomia, Buller Steer Syndrome) em machos bovinos mestiços não-castrados mantidos em sistema de confinamento, resultando que a preparação homeopática testada diminuiu significativamente a Sodomia (BSS). Esse produto é, portanto, recomendável para a produção de carne bovina em sistemas que utilizam machos não castrados.

Tratamentos homeopáticos para a fertilidade das fêmeas são relatados. Benites (2006) [3] descreve o caso clínico de uma vaca Holandesa com 10 anos de idade, tratada com um composto homeopático (*Calcarea carbonica*, *Nux vomica*, *Sepia* e *Sulphur*) após apresentar prolapso uterino. A matriz foi inseminada por sete vezes sem sucesso. Iniciou-se o tratamento com o composto homeopático inicialmente com *Sepia* 6 CH *plus* e, trinta dias após, com *Sepia* 30 CH em dose única. A vaca foi submetida à superovulação resultando em três embriões viáveis e três prenhez, foi posteriormente inseminada, levando desta vez a gestação a termo. No tratamento de ovaríopatias císticas de bovinos de leite, Castilho et al. (2003, [13]) verificaram efeitos significativos do tratamento homeopático *vs* Ovsynch® em vacas mestiças holandesas. O complexo homeopático utilizado foi composto por *Thuya occidentalis* 6CH, *Apis mellifera* 6CH e *Oophorinum* 6CH, escolhidos de acordo com o princípio da lei dos semelhantes. A homeopatia apresentou maior taxa de gestação que o tratamento hormonal após a primeira (62,5% *vs* 22,22%) e segunda IA (87,5% *vs* 55,56%), para homeopatia e Ovsynch®, respectivamente. Em um trabalho com búfalas e vacas, Kumar et al. (2004, [14]) induziram o estro em 50% das fêmeas bubalinas e 68% das bovinas utilizando medicamentos homeopatizados (*Calcarea phosphorica*, *Aletris farinosa*, *Pulsatilla*, *Aurum muriaticum natronatum*, *Sepia* e *Phosphorus* todos a uma potência de 30 dinamizações). Rajkumar et al.

(2006,[15]), buscando minimizar e tratar o anestro em vacas, utilizaram o mesmo composto homeopático já testado por [14], e observaram a eficiência do medicamento, que induziu 100% de estro nas fêmeas, além de levar ao aumento na concentração de estradiol no grupo tratado. Os autores explicam que, talvez, este fato deva-se a presença de *Pulsatilla* e *Aletris farinosa* no composto, descritos como indutores de crescimento folicular. A utilização de *Pulsatilla nigricans* possibilitou uma redução no período puerperal de 127 vacas de corte e leite das 353 fêmeas utilizadas [16].

Homeopatia aplicada à reprodutores

A medicina homeopática, em humanos do sexo masculino, é muito eficaz no tratamento de baixa motilidade espermática, baixa contagem de esperma, baixo volume de esperma, viscosidade do sêmen, morfologia anormal de espermatozóides, anticorpos anti esperma e combinação de doenças acima citadas [17].

A utilização de princípios homeopáticos vem sendo testada na reprodução de bovinos machos [18.19], demonstrando que podem trazer respostas positivas. A utilização de tratamentos alternativos em animais dos quais se processa material biológico como sêmen, pode ser extremamente interessante principalmente no sentido de contornar os efeitos negativos que o manejo intensivo de um Centro de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) pode acarretar no perfil seminal ou para melhorar a congelabilidade, característica esta não necessariamente vinculada à capacidade reprodutiva intrínseca do indivíduo. Souza et al. (2012, [19]) utilizando diversos princípios homeopáticos conseguiram melhorar a eficiência de coleta e congelabilidade do sêmen de bovinos mantidos em CCPS. Lobreiro (2007, [18]) tratou com *Pulsatilla nigricans* um touro da raça Nelore que apresentava infertilidade há três anos. Após o tratamento a qualidade seminal foi aumentada, diminuindo os defeitos espermáticos totais, aumentando a motilidade e volume do ejaculado. A *Avena sativa* é um medicamento homeopático utilizado em dinamizações mais baixas que, adicionado aos diluentes para resfriamento de sêmen suíno, melhorou a motilidade e vigor até 48 e 72 horas pós-coleta [20, 21]. A adição de princípios homeopáticos em meios diluentes de sêmen de carneiros, *Medicago sativa* 12 CH e *Aloe vera* 12CH, avaliou-se a integridade da membrana plasmática do espermatozóide, passível de sofrer rupturas durante o processo de criopreservação e conseqüente diminuição na capacidade de fertilização do espermatozóide [22]. A *Medicago sativa* na décima segunda potência centesimal de Hahnemann levou a diminuição da perda de motilidade e vigor do sêmen em carneiros avaliados em criatórios comerciais [22].

Souza et al. (2012, [19]) conseguiram reverter quadros clínicos de touros com baixa qualidade seminal pré ou pós-descongelamento tratado-os por meio de princípios homeopáticos adicionados à ração diariamente. A escolha dos medicamentos baseou-se no princípio hipocrático que determina o diagnóstico do enfermo através da sua totalidade de sintomas: comportamentais, gerais e locais (físicos), obtendo-se desta forma um medicamento para cada touro, como princípio da terapêutica homeopática unicista [23]. Eles obtiveram sucesso no tratamento com alterações significativas: Aumentaram a frequência de ejaculados com

qualidade mínima para criopreservação (Figura 1), bem como na produção média de doses por ejaculado em todos os animais (Figura 2).

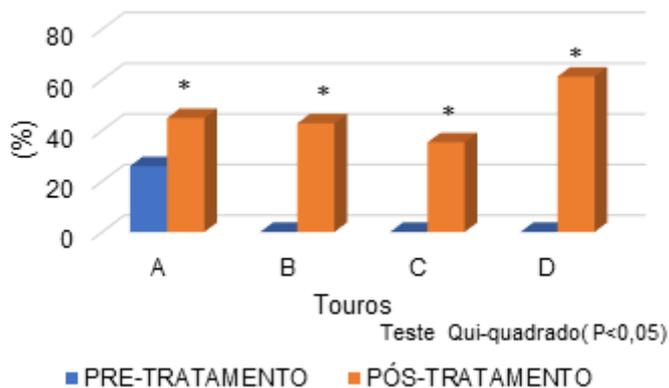


Figura 1. Ejaculados de touros Nelore obtidos com qualidade seminal mínima para ser submetido ao processo de congelação antes e depois do tratamento homeopático (adaptado de [19])

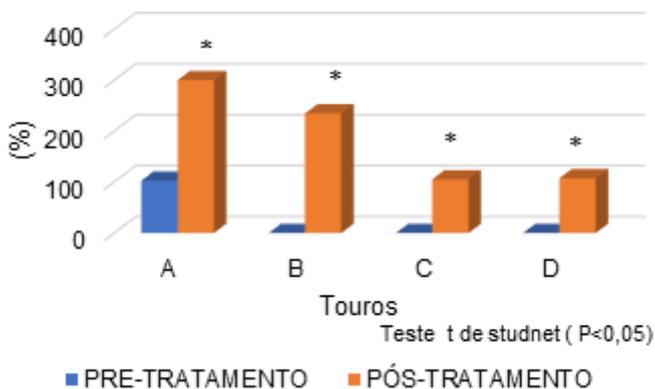


Figura 2. Produção média de doses de sêmen congelado por ejaculado obtido de touros Nelore numa CCPS antes e depois do tratamento homeopático (adaptado de [19]).

A terapêutica homeopática segue princípios diversos comparativamente ao tratamento alopático. Procede-se à repertorização de principais sintomas, inclusive da esfera comportamental, considerando o perfil dos animais e através de visão de avaliação de rebanho, para dessa forma, proceder à prescrição e terapêutica mais adequada. É assim tanto nos tratamentos individuais, quanto em rebanhos, já que um grupo de animais submetidos ao mesmo manejo, numa mesma propriedade se comporta como um único organismo. Alguns medicamentos são comumente utilizados em algumas condições de estresse que levam a desordens

reprodutivas em machos. Partindo dessa informação, fórmulas comerciais foram concebidas para atender a esses distúrbios. A administração de terapia homeopática aos animais é simples, prática e economicamente acessível. O medicamento é oferecido via oral, misturado à nutrição animal ou na água de bebida. Outra forma de carrear os princípios homeopáticos é diretamente no sêmen destinado à inseminação artificial, veiculado em água pura e misturado ao diluente do sêmen, diminuindo o impacto do descongelamento no caso dos bovinos ou do resfriamento, em garanhões. Existem, atualmente, poucos estudos em tratamentos de desordens reprodutivas com homeopatia, devido, em parte, à abordagem das pesquisas em homeopatia serem diferentes da terapia alopática, também às dificuldades de padronização de tratamentos, já que a homeopatia trata muito mais a causa (tipos de estresse) do que as consequências (defeitos espermáticos) e diferentes medicamentos são utilizados para tratar o mesmo distúrbio, dependendo do histórico de estresse de cada reprodutor ou grupo de reprodutores. Uma maneira possível de abordar essas dificuldades é testando formulações abrangentes, com soluções hidro-alcoólicas contendo princípio homeopático nos grupos teste e nos grupos testemunha apenas solução hidro-alcoólica sem princípios homeopáticos, proporcionando resultados significativos.

Diante da infinidade de possibilidades de abordagens terapêuticas homeopáticas nas desordens reprodutivas em machos e produtos destinados a esse fim, a exemplo do produto TouroSigo, de nossa formulação, podemos citar alguns medicamentos homeopáticos mais comuns utilizados nos tratamentos de distúrbios em reprodutores:

CONDIÇÃO	MEDICAMENTO
Degeneração testicular por estresse térmico	<i>Sulphur</i>
Desacelerar os efeitos da degeneração senil	<i>Plumbum mettalicum</i>
Antecipação da puberdade	<i>Avena sativa</i>
Problemas de temperamento	<i>Nux vomica</i>
Perda de libido por traumas	<i>Argentum nitricum</i>
Dificuldades na monta por lesões	<i>Arnica montana</i>
Baixa libido	<i>Phosphorus</i>
Dificuldade de monta	<i>Pulsatilla</i>

Considerações Finais

A terapêutica homeopática apresenta um campo muito vasto no sentido de levar soluções aos principais problemas da pecuária no aspectos, sanitários, zootécnicos e principalmente, tem muito a contribuir no sentido de incrementar a qualidade de sêmen em reprodutores. Inovações são possíveis, como a administração de princípios homeopáticos nos diluentes seminais, abrindo inúmeras possibilidades nesta via de administração.

Referências bibliográficas

- [1] Kent, JT. **Filosofia Homeopática**. Curitiba: Editorial Nova Época, 1993, 248p.
- [2] BRASIL Conselho Federal de Medicina Veterinária e Zootecnia- CFMV. **Resolução n.º 625**, 16/03/1995, Regulamenta o registro de título de especialidades (homeopatia), Brasília, DF, 1995. Disponível em: <<http://citeacupuntura.com.br/crmv625.htm>>. Acesso em: 06.05.2019
- [3] Benites, NR. Homeopatia. In: Spinosa, HS; Gorniak, SL.; Bernardi, MM. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 827-835.
- [4] Amaral MTCG. Homeopatia veterinária: estratégias de ação. **Intert J of High Dilution Research** 2002; (8-10). Disponível em: <<http://www.feg.unesp.br/~ojs/index.php/ijhdr/article/viewFile/64/47>>. Acesso em: 06.05.2019.
- [5] Souza, MFA. **Homeopatia Veterinária**. 2002. Disponível em: <<http://canildw.com.br/tecnica/medicinaalternativa/HOMEOPATIA%20VETERINARIA.pdf>>. Acesso em: 06.05.2019
- [6] Cucco MA, Souza MFA, Amaral MDS, Silva ADRC, Brum KB, Silva AM. Efeito de Preparação homeopática sobre o resultado do California Mastitis Test e a contagem de células somáticas em leite bovino. In: Congresso Brasileiro de Homeopatia Veterinária, 7, 2015 São Paulo – SP. **Anais...** Disponível em: <http://www.amvhb.org.br/site/index.php>
- [7] Cucco MA, Silva AGF, Carneiro RPB, Jacques GD, Silva AM, Macedo GG, Souza MFA, Zúccari CESN, Brum KB, Costa e Silva EV. Uso de homeopatia para controle da sodomia em machos bovinos inteiros em confinamento. In: Congresso Brasileiro de Homeopatia Veterinária, 7, 2015 São Paulo-SP. **Anais...** <http://www.amvhb.org.br/site/index.php>
- [8] Cucco MA, Souza MFA, Milani G, Pantoja T, Brum, KB. Tratamento de estreptococose cutânea bovina com complexo homeopático. In: Congresso Brasileiro de Homeopatia, 23, 2016 Campo Grande-MS. **Anais...**
- [9] Cucco MA, Souza MFA, Milani G, Pantoja, T, Brum, KB. Tratamento de enterites neonatais em gado bovino com complexo homeopático. In: Congresso Brasileiro de Homeopatia, 23, 2016 Campo Grande-MS. **Anais...**
- [10] Cucco MA. Apresentação Oral de Homeopatia na Produção Animal. In. **I Simpósio de Homeopatia Veterinária UFMS/FAMEZ 2019** Campo Grande- MS
- [11] Ferreira, LC. **Avaliação da qualidade de carcaça e da composição corporal de dois grupos genéticos, tratados ou não, com uma mistura de “calcárea carbonica” 30CH e “Calcarea phosphorica” 30CH**. 2005. 22 f. Monografia (Especialização em Zootecnia) - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, 2005.
- [11] Castilho LR, Souza JC, Pinto LF, Albuquerque FT, Filgueira EP. Avaliação da terapêutica homeopática nas ovariopatias císticas de bovinos leiteiros. **Homeopatia Brasileira** 2003; 9, 1, 5-15.
- [12] Kumar H, Srivastava SK, Yadav MC, Varshney JP. Management of postpartum anoestrus in dairy animals with a homeopathic combination remedy. **Indian Journal of Animal Science** 2004; 74, 739–740.
- [13] Rajkumar R, Srivastava SK, Yadav MC, Varshney VP, Varshney JP, Kumar H. Effect of a homeopathic complex on oestrus induction and hormonal profile in anoestrus cows. **Homeopathy**, 2006, 95, 131-135.
- [14] Silva CTL, Mcmannus C, Rumpe, R. Efeito da Pulsatilla nigricans aplicada em um ponto de acupuntura na redução do puerpério bovino. **Homeopatia Brasileira**. v. 7, n. 1, p. 13 - 21, 2001
- [15] Kasana A. Homeopathy and its Scope in Increasing Sperm Count and its Action on Male Fertility. **Int J Complement Alt Med**; 2017,6, 6: 00209. DOI: 10.15406/ijcam.2017.06.00209
- [16] Lobreiro, J. Homeopathic treatment for infertility in a prize Nelore bull. **Homeopathy**, 2007, 96, 49-51.
- [17] Souza MFA, Costa e Silva EV, Macedo GG, Soares BD, Zúccari, CESN. The effect of homeopathy on the fertility of bulls with previous reproductive disorders. **Homeopathy**; 2012, 101, 243-245.
- [18] Soto FRM, Vuaden ER, Coelho CP, Bonamin LV, Azevedo SS, Benites NR. Efeito da *Avena Sativa* CH6 no metabolismo do sêmen diluído de suínos. **Veterinária e Zootecnia**; 2009, 16, 2, 367-72.

- [19] Soto FRM, Vuaden ER, Coelho CP, Bonamin LV, Azevedo SS, Benites NR, Visintin JA, Barros FRO, Goissis MD, Assumpção AOM, Marques MG. Reproductive performance of sows inseminated with diluted semen treated with homeopathic medicine. **Internat J of High Dilution Research**; 2010, 9, 30, 51-57.
- [20] Monreal ACD, Souza AS, Caramalac SM, Caramalac SM, Gilberti Urt MA, et al. (2015) Homeopathic Medicine Improves the Motility and Vigor of Semen in Rams. **Int J Vet Sci Res** 1(1): 003-007.
- [21] Eizayaga FX. **Tratado de Medicina Homeopatica**. 3ª ed., Buenos Aires: Ediciones Marecel, 1992. 399 p.

Resumos



Reunião Anual da
IV ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal

Análise da cinética espermática e integridade estrutural do sêmen ovino criopreservado com dimetilacetamida e/ou glicerol

Renata Oliveira Barreto¹
renata.obrt@hotmail.com

Rodrigo Freitas Bittencourt¹
rfbvvet@ufba.br

Gabriel Felipe Oliveira de Menezes¹

Isabella de Carneiro Brandão¹

Elton Amorim Romão¹

Gleice Mendes Xavier¹

Isabela Costa Vasconcelos¹

Adrielle da Silva Lima¹

Maicon Pereira Lents¹

Pamela Santiago Campos¹

Abstract: Twenty five ejaculates from five Santa Inês rams were frozen with dimethylacetamide (DMA) with or without association with glycerol (GL) in the following concentrations: G1: GL6%; G2: DMA3%; G3: GL5% + DMA1%; G4: GL4% + DMA2%; G5: GL3% + DMA3%; G6: GL2% + DMA4%; G7: GL1% + DMA5%. The spermatic kinetics parameters were evaluated through a computer analysis system, as well as for the structural integrity of the plasma membrane via flow cytometry, using the probes carboxyfluorescein diacetate (DIC) and propidium iodide (IP). There were no statistical differences in between the treatments in any of the evaluations, indicating that the dimethylacetamid is efficient in the substitution of glycerol, however it does not overcome the effects of glycerol in the cryopreservation of ovine semen.

Keywords: amide; flow cytometry; CASA.

Palavras-chave: amida; citometria de fluxo; CASA.

Introdução – A ampla utilização do glicerol (GL) nos meios de congelação de *sêmen ovino é resultante* da eficácia da sua crioproteção associada à diminuição do ponto de congelamento da célula evitando formações de cristais de gelo [1]. No entanto, há também efeitos deletérios na avaliação do sêmen pós-descongelação causados pela utilização do GL nos meios diluidores, como estresse osmótico, mudanças na organização, *fluidez* e permeabilidade da membrana plasmática, e desorganização da sua composição lipídica [2]. Essa toxicidade tem fomentado pesquisas que estudem o desenvolvimento de novos diluidores compostos por crioprotetores alternativos e seus efeitos. O grupo das amidas tem apresentado bons resulta-

¹ Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

dos na sua utilização na congelação do sêmen de espécies como coelhos [1] e equinos[1,3] e seu uso está associado a menor viscosidade e peso molecular, que diminuiria o estresse osmótico ao espermatozoide [3]. A dimetilacetamida (DMA) é uma representante desse grupo, utilizada em estudos envolvendo o sêmen ovino e relatada como um substituto adequado ao glicerol [4,5]. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos sobre a cinética e integridade estrutural da membrana espermática pós-descongelação na utilização da dimetilacetamida para a criopreservação do sêmen ovino em substituição total ou parcial ao glicerol, em diferentes concentrações.

Material e Métodos – Para o estudo, foram utilizados 25 ejaculados de 5 ovinos da raça Santa Inês, submetidos à colheita de sêmen por meio de vagina artificial. Foi utilizado um meio-base de Tris-gema acrescido de DMA e/ou GL a diferentes concentrações de acordo com os grupos experimentais delineados: Grupo 1- GL a 6% (controle); Grupo 2- DMA 3%; Grupo 3- GL a 1% e DMA a 5%; Grupo 4- GL a 2% e DMA a 4%; Grupo 5- GL a 3% e DMA a 3%; Grupo 6- GL a 4% e DMA a 2%; Grupo 7- GL a 5% e DMA a 1%. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25mL com concentração de 100×10^6 spztz por palheta. Na sequência, as amostras foram submetidas ao resfriamento a 5°C (0,47°C/min), tempo de equilíbrio (total de 2h) e então congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico até o momento da descongelação.

A cinética espermática foi avaliada através do sistema de análise computadorizada de sêmen (CASA) (Sperm Class Analyzer SCA®, Microptics, S.L. Versão 5.1, Barcelona, Espanha), com *set-up* para ovinos. Uma alíquota do sêmen foi diluída em tampão fosfato-salino – PBS, até se obter uma diluição final de aproximadamente 48×10^6 spztz/mL. Após cinco a dez minutos de incubação (37°C), 5 µL do sêmen diluído foram analisados no microscópio entre lâmina e lamínula, sob aumento de 100x. Foram avaliados os parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e progressiva (MP), velocidades curvilínea (VCL) e do percurso médio (VAP) e em linha reta (VSL), deslocamento lateral de cabeça (ALH), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e hiperatividade (HYPERACT).

Para a avaliação de integridade estrutural de membrana plasmática, realizada através do citômetro de fluxo (BD FACSCalibur®, BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA), utilizou-se duas sondas fluorescentes: diacetato de carboxifluoresceína (DIC, 21879, Sigma Aldrich) e iodeto de propídeo (IP, P4170, Sigma Aldrich), em uma solução de trabalho composta por PBS (200µL de sêmen diluído na concentração de 2×10^6 spztz/mL), DIC na concentração final de 20,0µM e IP na concentração final de 15µM. Foram adicionados 5µL de IP e 5µL de DIC. Os espermatozoides DIC+/IP- foram classificados como não lesados e os DIC+/IP+, DIC-/IP+ e DIC-/IP- como lesados.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, onde os ejaculados foram considerados repetições e os protocolos de processamento do sêmen foram considerados tratamentos. A média e desvio padrão das variáveis foram obtidas por análise descritiva. Os dados foram processados pelo Pacote estatístico SAS, Versão 9.0 (2002). Foi feita análise de norma-

lidade através do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo Kruskal-Wallis e as normais pelo teste SNK. O índice de significância utilizado foi de 5%.

Resultados e Discussão – As médias e desvios padrão das variáveis analisadas pelo sistema de análise computadorizada de sêmen de acordo com cada grupo experimental, podem ser observadas na Tabela 1. Ao comparar os parâmetros de cinética espermática avaliados, não foram observadas diferenças estatísticas. Na avaliação da integridade da membrana plasmática, também não houve diferença estatística entre os diferentes tratamentos empregados ao sêmen (Tabela 2).

Tabela 1. Médias e desvios padrão de motilidade total (MT) e progressiva (MP), velocidades curvilínea (VCL), do percurso médio (VAP) e em linha reta (VSL), deslocamento lateral de cabeça (ALH), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e hiperatividade (HYPER) de sêmen ovino criopreservado com diferentes concentrações de glicerol e dimetilacetamida.

VARIÁVEL	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
MT (%)	51,4±1,8	51,4±24,2	50,9±18,7	53,6±21,5	52,3±21,6	54,0±22,0	46,9±23,2
MP (%)	10,2±8,6	8,5±5,3	8,1±5,2	9,9±6,0	8,9±6,1	7,3±4,7	6,7±4,0
VCL (µm/s)	58,3±15,1	51,8±14,7	55,5±14,0	56,2±14,9	53,3±14,1	52,1±16,1	50,0±15,8
VSL (µm/s)	27,3±17,5	22,3±9,9	23,3±10,9	25,2±14,8	22,1±9,9	21,8±10,2	19,9±7,8
VAP (µm/s)	37,9±16,6	31,7±11,7	34,3±11,9	35,5±12,9	31,9±10,9	31,9±12,7	29,4±10,4
LIN (%)	43,6±16,7	42,0±9,2	40,5±10,6	43,4±12,4	40,2±9,9	40,4±8,7	39,4±7,0
STR (%)	67,2±12,5	68,8±7,2	65,9±8,6	68,8±8,9	67,1±8,0	66,9±7,0	67,0±5,8
ALH (µm)	3,6±0,7	3,6±0,9	3,6±0,5	3,6±0,6	3,6±0,6	3,6±0,4	3,7±0,8
BCF (Hz)	8,5±1,7	8,8±2,5	8,8±1,4	8,9±1,6	9,5±1,7	9,3±1,5	8,9±1,9
HYPER (%)	6,8±8,5	5,5±4,4	5,4±5,2	6,2±5,0	5,2±4,5	4,6±3,7	3,9±2,6

G1: GL6%; G2: DMA3%; G3: GL5%+DMA1%; G4: GL4%+DMA2%; G5: GL3%+DMA3%; G6: GL2%+DMA4%; G7: GL1%+DMA5%

Tabela 2. Parâmetros de integridade estrutural de membrana plasmática de sêmen ovino criopreservado com diferentes concentrações de glicerol e dimetilacetamida avaliado através de citometria de fluxo.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
LESADOS	75,6±12,9	64,9±14,9	72,7±10,2	65,1±15,0	69,1±14,9	69,1±14,9	75,5±15,3
NÃO LESADOS	19,7±11,5	28,4±15,7	22,3±9,1	29,4±14,0	24,3±14,0	17,9±13,6	16,9±15,3

G1: GL6%; G2: DMA3%; G3: GL5%+DMA1%; G4: GL4%+DMA2%; G5: GL3%+DMA3%; G6: GL2%+DMA4%; G7: GL1%+DMA5%; Não lesados: DIC+/IP-; Lesados: DIC+/IP+, DIC-/IP+ e DIC-/IP-

Os efeitos de menor estresse osmótico impactando na qualidade do sêmen para os tratamentos com DMA esperados não foram observados nesse estudo, visto que os parâmetros de cinética espermática não diferiram entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Estudos com equinos mostraram que os benefícios da substituição pelas amidas foram melhores demonstrados em cavalos denominados *bad freezers*, que apresentam baixa tolerância ao GL. [1,3]

No entanto, a utilização da amida ou sua associação ao GL não ocasionaram efeitos deletérios sobre as células espermáticas nas avaliações realizadas. Esse efeito pode ser atribuído às concentrações escolhidas para serem empregadas no experimento, que não passaram de 5%. Estudos relatam que maiores concentrações podem causar danos celulares pela alta concentração intracelular alcançada devido ao aumento da permeabilidade de membrana [6].

Considerações Finais – Na avaliação *in vitro* do sêmen ovino pós-descongelamento, a dimetilacetamida demonstrou ser um crioprotetor alternativo ao glicerol adequado, não superando, no entanto, os efeitos deletérios causados pelo mesmo.

Referências bibliográficas

- [1] Bittencourt, R. F., Oba, E., Ribeiro Filho, A. D. L., Chalhoub, M., Azevedo, H. C., & Bicudo, S. D. (2013). Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. *Ciência Animal Brasileira*, 14(4), 522-536.
- [2] Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871-891.
- [3] Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal reproduction science*, 89(1-4), 105-113.
- [4] Bittencourt, R. F., Oba, E., de Almeida Biscarde, C. E., Azevedo, H. C., Bittencourt, M. V., de Menezes, G. F. O.,... & Lisboa Ribeiro Filho, A. (2018). Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation. *Cryobiology*, 85, 1-6.
- [5] Yang, C. H., Wu, T. W., Cheng, F. P., Wang, J. H., & Wu, J. T. (2016). Effects of different cryoprotectants and freezing methods on post-thaw boar semen quality. *Reproductive biology*, 16(1), 41-46.
- [6] Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Vidal, A. H., Soares, P. C., & Guerra, M. M. P. (2012). In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. *Animal reproduction science*, 132(3-4), 155-158.

Agradecimentos: Fundação Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Avaliação da cromatina durante a maturação epididimária do espermatozoide de touro

Muller Carrara Martins¹

mullercarrara@hotmail.com

Lucas Melo Gonçalves¹

Amanda Nonato¹

Benner Geraldo Alves¹

Marcelo Emílio Beletti¹

mebeletti@ufu.br

Abstract: The current andrological exams evaluate the concentration, vigor, motility, swirling and morphological pathologies of spermatozoa. However, even when approved for andrological examinations, some bulls do not respond effectively, either in natural mating or *in vitro* fertilization processes. This study aims to evaluate the condensation of chromatin and morphometric characteristics during sperm maturation in the epididymis, For this, spermatozoa were collected from the seminiferous tubule, head, body and tail of the epididymis, as well as the ductus deferens of five bulls. These spermatozoa were evaluated by computational image analysis of toluidine blue stained smears. In general, spermatozoa of the seminiferous tubule presented smaller area, perimeter, width, length, ellipticity, and Fourier harmonics (F0, F1 and F2) when compared to the epididymis (head, body and tail) and ductus deferens. The analysis of decondensation and heterogeneity of chromatin showed that both parameters decreased during the process of sperm maturation. Therefore, it has been demonstrated that epididymal maturation is important for the chromatin condensation, consequently, for the final morphology of the spermatozo.

Keywords: Toluidine blue stain, chromatin condensation, morphometry, morphology.

Palavras-chave: Azul de toluidina, condensação de cromatina, morfometria, morfologia.

Introdução - Alguns touros mesmo aprovados em exames andrológicos, não respondem de maneira eficaz, seja na monta natural ou em processos de fertilização *in vitro*. A cromatina da cabeça dos espermatozoides pode ser um fator que influencia o desempenho dos touros. Durante a espermiogênese e maturação epididimal em mamíferos, a estrutura da cromatina espermática sofre substituição de histonas nucleares por proteínas de transição e posteriormente protaminas, levando a uma cromatina altamente condensada, a qual é resistente às agressões oxidativas [1] para que o espermatozoide possa realizar o transporte seguro do material genético. A coloração com azul de toluidina seguida pela análise de imagem computacional pode ser utilizada na identificação de regiões com diferentes níveis de compactação de cromatina na cabeça do espermatozoide [2], Objetiva-se com o presente trabalho melhor

¹ Universidade Federal de Uberlândia.

compreender como acontece o processo de organização da cromatina espermática, correlacionando a maturação epididimária com a compactação da cromatina.

Material e Métodos - Os aparelhos reprodutivos de cinco touros mestiços foram coletados e separados em testículos, cabeça, corpo, e cauda do epidídimo e ducto deferente. Após a obtenção dos espermatozoides, três esfregaços de cada região foram feitos e fixados em solução etanol-ácido acético, posteriormente os esfregaços foram hidrolisados em ácido clorídrico 4N por 20 minutos e lavados em água destilada. Após a secagem, foi colocada uma gota de Azul de Toluidina 0,025%, em tampão ácido cítrico-fosfato. As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz convencional. As análises das imagens computacionais foram divididas em etapas: segmentação das cabeças e análise quantitativa da descompactação e heterogeneidade de cromatina. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., USA). A mensuração de parâmetros morfométricos, descompactação e heterogeneidade entre as regiões foram feita através do teste Anova (análise de variância) post hoc test, Dunn 's Method, sem distribuição normal foi feito o teste Kolmogorov Sminov.

Resultados e Discussão - Espermatozoides do aparelho reprodutor bovino foram coletados de diferentes regiões (tabela 1). No geral, espermatozoides do túbulo seminífero apresentaram menor ($P < 0,05$) área, perímetro, largura, comprimento, elipsidade, e harmônicas de Fourier (F0, F1 e F2) quando comparados aos do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) e ducto deferente. A análise da descompactação e heterogeneidade da cromatina demonstrou que ambos os parâmetros decresceram ($P < 0,05$) no decorrer do processo de maturação espermática.(figura 1) Como a cromatina é o principal constituinte da cabeça espermática, alterações durante o seu processo de compactação podem interferir nas características morfométrica da cabeça. Os dados obtidos possibilitaram o monitoramento das características morfométricas (Área, Perímetro, Largura, Elipsidade, F0, F1, F2) e da cromatina (descompactação e heterogeneidade) e sugerem que existe uma relação inversa entre estes parâmetros durante a maturação espermática, ou seja, espermatozoides mais imaturos possuem cromatina mais frouxa e heterogênea e possuem menor área, perímetro, largura, elipsidade e harmônicas de Fourier. A princípio isso pode parecer incoerente, pois espermatozoides com cromatina frouxo deveriam ser maiores. No entanto, a análise realizada no presente trabalho é bidimensional (dimensões X e Y), não avaliando a dimensão Z (profundidade), podendo ocorrer diferença em relação ao volume total do espermatozoide. Assim ficou claro que a maturação epididimária modifica a compactação da cromatina e consequentemente, a morfologia final dos espermatozoides.

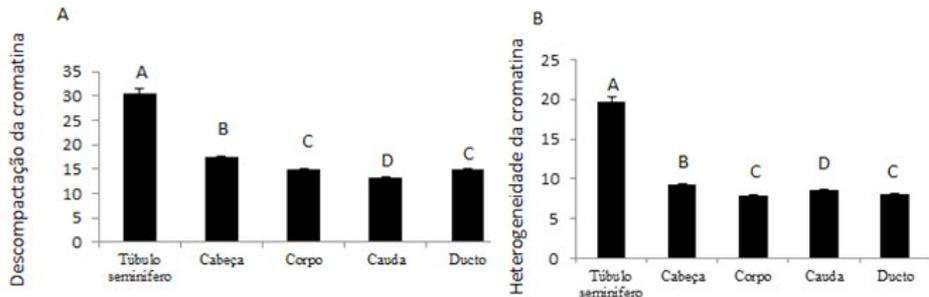


Figura 1, A) Descompactação e B) heterogeneidade da cromatina (média \pm e.p.m) de espermatozoide coletados de diferentes regiões (túbulo seminífero; cabeça, corpo e cauda do epidídimo; ducto deferente) do aparelho reprodutivo bovino,

A, B, C, D Letras diferentes indicam significância ($P < 0,05$).

Tabela 1. Parâmetros morfométricos (média \pm e.p.m) da cabeça de espermatozoides coletados em diferentes regiões (túbulo seminífero, cabeça, corpo e cauda do epidídimo; ducto deferente) do aparelho reprodutivo bovino.

	A (μm^2)	P (μm)	L (μm)	C (μm)	L/C	E	FF	F0	F1	F2	SLL	SAP
Túbulo seminífero (n = 482)	38,39 ^A $\pm 0,39$	19,81 ^A $\pm 0,1$	4,20 ^A $\pm 0,02$	7,16 ^A $\pm 0,03$	0,5885 ^A $\pm 0,001$	0,2604 ^A $\pm 0,04$	0,95 ^A $\pm 0,04$	2731,00 ^A $\pm 34,62$	340,40 ^A $\pm 7,86$	303,99 ^A $\pm 6,58$	0,9688 ^A $\pm 0,001$	0,9377 ^A $\pm 0,001$
Cabeça (n = 1635)	45,18 ^B $\pm 0,15$	21,75 ^B $\pm 0,04$	4,52 ^B $\pm 0,01$	7,91 ^B $\pm 0,01$	0,5714 ^B $\pm 0,001$	0,2735 ^B $\pm 0,001$	0,95 ^A $\pm 0,001$	3399,67 ^B $\pm 14,39$	430,86 ^{BC} $\pm 4,04$	363,73 ^B $\pm 3,89$	0,9698 ^{AB} $\pm 0,001$	0,9312 ^B $\pm 0,001$
Corpo (n = 1240)	45,06 ^B $\pm 0,19$	21,89 ^{BC} $\pm 0,05$	4,47 ^C $\pm 0,01$	7,99 ^C $\pm 0,01$	0,5604 ^C $\pm 0,001$	0,2826 ^C $\pm 0,001$	0,95 ^A $\pm 0,001$	3561,50 ^C $\pm 17,89$	452,32 ^C $\pm 5,26$	369,60 ^B $\pm 4,78$	0,9687 ^A $\pm 0,001$	0,9273 ^C $\pm 0,001$
Cauda (n = 2388)	45,49 ^B $\pm 0,15$	21,97 ^C $\pm 0,04$	4,46 ^C $\pm 0,009$	8,03 ^C $\pm 0,01$	0,5567 ^D $\pm 0,001$	0,2859 ^D $\pm 0,001$	0,94 ^B $\pm 0,001$	3640,01 ^D $\pm 17,18$	452,25 ^{BC} $\pm 5,00$	363,55 ^B $\pm 3,85$	0,9689 ^A $\pm 0,001$	0,9282 ^B $\pm 0,001$
Ducto (n = 1265)	45,52 ^B $\pm 0,17$	21,95 ^C $\pm 0,04$	4,46 ^C $\pm 0,01$	8,02 ^C $\pm 0,01$	0,5569 ^{CD} $\pm 0,001$	0,2854 ^{CD} $\pm 0,001$	0,94 ^B $\pm 0,001$	3612,73 ^D $\pm 15,59$	427,62 ^D $\pm 4,12$	354,14 ^B $\pm 4,75$	0,9705 ^B $\pm 0,001$	0,9320 ^B $\pm 0,001$

^{A,B,C,D} Letras diferentes dentro da coluna indicam significância ($P < 0,05$).

A, área; P, perímetro; L, largura; C, comprimento; L/C, razão largura comprimento; E, elipseidade; FF, fator forma; F0, Fourier 0; F1, Fourier 1; F2, Fourier 2; SLL, simetria latero-lateral; SAP, simetria anterior-posterior

Referências bibliográficas

[1] FRASER, L.; STRZEŻEK, J. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing–thawing? *Theriogenology*, v. 68, n. 2, p. 248-257.

[2] CRUZ, R. E. S.; BELETTI, M. E.; TRAVENÇOLO, B. A. N. Using image analysis and processing for morphological characterization of bovine spermatozoa. In: *Proceedings of the X Workshop de Visão Computacional, Uberlândia-MG.*, p. 270-274,

Agradecimentos: Agradecemos a FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Avaliação do uso de três diluidores comerciais no processo de refrigeração do sêmen bovino

Raiza Rocha Pereira¹

Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal / UFMS; email: raiza_rochapereira@hotmail.com

Fernanda Battistotti Barbosa¹

Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal / UFMS

Luiz Costa Filho

Veterinário Autônomo

Bianca Rodrigues Acacio¹

Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas / UFMS

Willian Vaniel Alves dos Reis¹

Mestrando do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal / UFMS

Maitê Cardoso Coelho da Silva¹

Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária / UFMS

Breno Fernandes Barreto Sampaio¹

Docente da FAMEZ / UFMS, e-mail: breno.sampaio@ufms.com.br

Abstract: The aim of the present study was to evaluate the quality of cooled bovine semen at 5°C by comparing three commercial diluents: one containing egg yolk and glycerol (Diluent 1) and two containing skimmed milk (Diluents 2 and 3). The treatments were evaluated in four moments (6h, 24h, 48h, 72h) using refrigerator or container Botuflex®. Five Nelore bulls ranging from 24 to 30 months were used and the seminal variables were analysed by flow cytometry and computerized sperm analysis. The results were submitted to the normality test and the means were compared by the Kruskal-Wallis test with significance level of 5%. The results showed that the Diluent 1 was able to maintain the semen up to 72h, the Diluent 2 for up to 48h and the Diluent 3 up to 24h without damage to sperm kinetics and their physical structure.

Keywords: spermatozoa; reproduction; seminal quality.

Palavras-chave: espermatozoide; reprodução; qualidade seminal.

Introdução - O processo de resfriamento do sêmen resulta em maior viabilidade espermática, permitindo o uso de menores concentrações espermáticas por dose de inseminação em comparação com o sêmen congelado. Assim, a utilização do sêmen resfriado apresenta-se como uma alternativa viável evitando danos associados ao congelamento, garantindo uma maior qualidade seminal [1] [2].

A preservação bem-sucedida do sêmen sob condições de refrigeração depende dos procedimentos de manuseio e da composição dos diluidores utilizados para a conservação de espermatozoides. Alguns autores propuseram que o glicerol interage com os espermatozoides

¹ Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

bovinos e é metabolizado e convertido em uma fonte extra de energia que é posteriormente usado durante o processo de fertilização [3] [4] [1].

O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade seminal no processo de resfriamento a 5°C do sêmen bovino, comparando três diluidores comerciais: dois a base de leite desnatado e um a base de gema de ovo com glicerol em quatro momentos (6h, 24h, 48h, 72h), utilizando dois modos de armazenamento geladeira e contêiner comercial.

Material e Métodos - Foram utilizados 5 Touros Nelore com idade entre 24-30 meses localizados no município de Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. As amostras de sêmen foram obtidas utilizando-se o método de eletroejaculação e avaliado subjetivamente para motilidade e vigor. Os touros foram apenas considerados adequados para o experimento quando o ejaculado apresentou 70% de células móveis, e 3 de vigor (Escala de 1-5).

A concentração espermática foi analisada utilizando câmara de Neubauer, 1:200. O ejaculado foi dividido em 3 tratamentos: Diluidor 1- Botu-Bov® (BB; Botupharma Ltda., Botucatu, São Paulo, Brasil) com 7% de glicerol; diluidor 2- Inra 96® (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, França) e diluidor 3 - BotuSêmen® (Botupharma Ltda., Botucatu, São Paulo; com duas formas de refrigeração a 5°C em Botuflex® (Botupharma Ltda., Botucatu, São Paulo, Brasil) e Geladeira.

Para todos os grupos foi fixada a concentração espermática de 40×10^6 espermatozoides/mL, envasados em palhetas de 0,5 mL (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, França). Utilizando a curva de refrigeração a 5°C taxa de 0.05° C/min. As amostras seminais foram analisadas no laboratório, nos períodos de 6h, 24h, 48h, 72h após a coleta. Cada amostra foi incubada, a 37 °C, por 10 min antes da análise. A cinética espermática foi avaliada pelo sistema computadorizado (modelo Sperm Class Analyzer - SCA). Foram avaliados, aleatoriamente, cinco campos por amostra.

Os parâmetros de cinética espermática avaliados foram: motilidade total (MT%), motilidade progressiva (PM%), As análises de Integridade de membrana plasmática, membrana acrossomal, e atividade mitocondrial foram feitas por citometria de fluxo no aparelho Cito-FLEX® (BeckmanCoulter). O fluorocromo Hoechst 33342 (100 mg/ML) foi usado para garantir que restos celulares e partículas fossem excluídos da aquisição e análise. Foi realizada a avaliação simultânea de integridade de membrana plasmática (IMP), integridade de membrana acrossomal (IMA) e potencial de membrana mitocondrial (PMM) pela associação das sondas iodeto de propídio (PI; P4170, Sigma Aldrich), FITC-PNA (L0770, Sigma Aldrich), Mito Status Red (53271, Sigma Aldrich), sondas Hoechst 33342 (14533, Sigma Aldrich). Os resultados obtidos na análise de IMP foram elencados em duas classes: membrana plasmática íntegra (MPI) ou membrana plasmática lesada (MPL). Na avaliação acrossomal as amostras foram classificadas como membrana acrossomal íntegra (MAI) ou membrana acrossomal lesada (MAL) e no teste de potencial de membrana mitocondrial (PMM) as células tiveram as classificações de alto potencial mitocondrial (PM+) e baixo potencial mitocondrial (PM -).

Para comparar as variáveis da cinética espermática, integridade da membrana plasmática e acrossomal e atividade mitocondrial empregou-se a análise de variância. Os resulta-

dos foram submetidos ao teste de normalidade e às médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%. A análise estatística foi conduzida pelo programa BioEstat 5.0.

Resultados e Discussão –

Tabela 1 - Avaliações dos diluidores nos momentos 6h, 24h, 48h, 72h.

*DIL.	*MOM.	MODO ARM.*	PM %*	MPI MAI* %	MPL MAL* %	MPI PM+* %	MPL PM- * %
1*	6h	A*	83.5 ± 4.65 ^a	70.63±11.02 ^a	9.74±3.98 ^a	56.79±15.40 ^a	27.99±12.25 ^a
2*	6h	A	77.34±26.33 ^a	52.03.±23.19 ^a	24.97±12.64 ^a	13.26±9.74 ^b	31.75±16.43 ^a
3*	6h	A	49.76±44.36 ^c	29.06±6.4 ^b	48.77±16.53 ^b	5.96±2.98 ^b	46.96±24.77 ^a
1	6h	B*	78.10±11.32 ^a	74.21±9.81 ^a	11.73±5.81 ^a	64.43±11.46 ^a	23.57±9.06 ^a
2	6h	B	76.96± 9.92 ^a	64.02±15.31 ^a	20.43±7.21 ^a	34.81±22.10 ^a	13.39±7.78 ^a
3	6h	B	52.64±42.97 ^c	40.14±1.51 ^b	40.33±13.23 ^b	10.47±6.78 ^b	28.01±16.61 ^a
1	24h	A	83.5 ± 12.06 ^a	61.52±17.94 ^a	26.9±21.13 ^a	36.08±20.25 ^a	28.19±11.08 ^a
2	24h	A	52.16±24.22 ^b	62.89±20.66 ^a	20.52±17.01 ^a	15.49±21.35 ^b	33.70±29.31 ^a
3	24h	A	34 ± 32.71 ^b	32.86±10.23 ^b	49.04±11.35 ^b	2.82±2.23 ^b	36.59±42.36 ^a
1	24h	B	78.8±8.53 ^a	72.34±11.20 ^a	13.84±6.67 ^a	52.14±10.90 ^a	26.59±11.14 ^a
2	24h	B	49.2±43.98 ^b	56.08±21.05 ^b	21.03±11.17 ^a	7.13±9.54 ^b	39.42±27.06 ^{a,b}
3	24h	B	28.98±11.32 ^b	31.90±6.91 ^c	40.33±13.23 ^b	2.31±3.02 ^b	54.72±32.06 ^{a,b}
1	48h	A	74.5 ± 13.92 ^a	70.51±12.82 ^a	13.3±6.43 ^a	52.52±11.97 ^a	34.89±17.78 ^a
2	48h	A	43.35±46.41 ^b	47.48±34.02 ^b	47.12±34.53 ^b	12.81±11.8 ^b	36.89±17.20 ^a
3	48h	A	12.07±2.70 ^b	17.90±13.24 ^c	70.56±16.69 ^b	0.78±0.58 ^b	60.42±6.51 ^b
1	48h	B	68.98±33.28 ^a	71.68±5.40 ^a	14.58±4.9 ^a	48.85±10.68 ^a	28.82±8.67 ^a
2	48h	B	46.22±38.71 ^b	43.24±20.21 ^b	39.21±18.59 ^b	6.84±7.4 ^b	41.20±19.04 ^b
3	48h	B	13.9±15.66 ^c	12.18±12.94 ^c	61.71±26.07 ^b	2.42±3.29 ^b	56.61±6.39 ^b
1	72h	A	60.3 ± 16.24 ^a	58.19.±22.05 ^a	15.47±4.72 ^a	37.69±32.72 ^a	22.93±10.22 ^a
2	72h	A	37.25 ± 35.5 ^b	26.77±19.91 ^b	59.74±20.05 ^b	0.86±0.8 ^b	70.47±21.62 ^b
3	72h	A	7.25 ± 7.32 ^c	4.29±5.9 ^c	89.41±5.35 ^b	0.34±0.54 ^b	90.59±11.40 ^b
1	72h	B	47.3±26.32 ^a	70.46±9.01 ^a	14.34±23.9 ^a	57.47±11.24 ^a	23.74±6.94 ^a
2	72h	B	44.14±39.78 ^a	37.67±20.64 ^b	48.82±1.69 ^b	9.04±12.90 ^b	60.38±20.77 ^b
3	72h	B	12.5±20.57 ^b	27.56±22.07 ^b	71.52±15.32 ^b	4.91±7.89 ^b	68.62±26.06 ^b

*DIL (diluidor) DIL 1 (diluidor1) DIL 2 (diluidor 2) DIL 3 (diluidor 3), MOM (momento de avaliação, MODO de Arm. (modo de armazenamento) A- Geladeira, B- Botuflex; MPI MAI- membrana plasmática íntegra membrana com membrana acrossomal íntegra, (MPL MAL Membrana plasmática lesada com membrana acrossomal lesada, MPI PM+ membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial (PM+), MPL PM - Membrana plasmática lesada e baixo potencial mitocondrial (PM -). Letras diferentes diferem significativamente (p<0,005).

Na análise de motilidade progressiva e motilidade total, o diluidor 1 não diferiu significativamente do diluidor 2 nos momentos 6h e 72h (Tabela 1). Porém, a partir das 6h de armazenamento, o diluidor 1 diferiu significativamente quando comparado ao diluidor 3. Os modos de armazenamento Geladeira e contêiner Botuflex não diferiram significativamente entre si. O diluidor 3 apresentou maiores quantidades de MPL ($p < 0.05$) quando comparado ao diluidor 1 nos momentos 6h, 24h, 48h e 72h de refrigeração; e o diluidor 2 também apresentou maiores quantidades comparando estes mesmos parâmetros com o diluidor 1 nos períodos 48h e 72h.

Após 24h de refrigeração não foi observada diferença significativa entre os diluidores 2 e 3 nas variáveis MPI e PM+, no entanto, o diluidor 1 mostrou melhores resultados em relação ao diluidor 2, 3. Nesta mesma análise, o diluidor 1 se mostrou estatisticamente superior ao 2 e 3 nos momentos 24h, 48h e 72h, não havendo diferença entre os diluidores 2 e 3. Da mesma forma, na análise de MPI associada MAI, o diluidor 1 se mostrou superior aos diluidores 2 e 3 após 24h, 48h de refrigeração respectivamente, não havendo diferença significativa entre os diluidores 2 e 3.

Trabalhos foram realizados comparando diluidores com glicerol e sem glicerol no armazenamento do sêmen refrigerado e criopreservado. Os resultados obtidos foram que o sêmen resfriado com glicerol obteve maior taxa de prenhez quando comparado ao sêmen criopreservado, e ao sêmen refrigerado sem glicerol [2] [3] [4]. A adição de glicerol tem provado ser uma boa alternativa para preservar a viabilidade do sêmen refrigerado. [3] [4]

Considerações Finais - De acordo com os resultados obtidos, o diluidor 1 se mostrou superior quando comparado aos diluidores 2 e 3 nas variáveis motilidade total, motilidade progressiva, IMP, IMA e PMM durante a refrigeração por 72 horas. O diluidor 2 garante um bom armazenamento por até 48 horas sem danos significativos à cinética do espermatozoide e sua estrutura física e o diluidor 3 pode ser utilizado para refrigeração do sêmen bovino até as 24h, sem grandes perdas estruturais das células espermáticas. Estas conclusões foram realizadas com base nas análises laboratoriais, porém mais estudos com esses diluidores associando os resultados *in vitro* à taxa de prenhez devem ser realizados.

Referências bibliográficas

- [1] Papa P.M., Maziero R.D., Guasti P.N., Junqueira C.R., Dell'Aqua C.P.F., Papa F.O., Vianna F.P., Alvarenga M. C., Crespilho A.M., Dell'Aqua Jr J.A. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology* 2015, 83, 107–113
- [2] Crespilho A. M., Papa F. O., Santos M. D. P., and Filho, M. F. D. S. Use of cooled bull semen as a strategy to increase the pregnancy rate in fixed-time artificial insemination programs – case report. *Am. J. Anim. Vet. Sci* 2012, 7, 175–179.
- [3] Verberckmoes S., Soom A.V., Dewulf J., Kruijff A. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology* 2005, 63, 912–22.
- [4] Borges-Silva J.C., Silva M.R., Marinho D.B., Nogueira E., Sampaio D.C., Oliveira L.O.F., Abreu U.G.P., Mourão G.P., Sartori R. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 2016. <http://dx.doi.org/10.1071/RD14185>.

Agradecimentos: Fundect, Capes, CNPQ.

Comparação entre o Nucleocounter® SP-100 e a espectrofotometria na determinação da concentração espermática em sêmen bovino

João Pedro Brandão Zandonaide¹
joao.zandonaide@altagenetics.com

Rodrigo Paz Sevilla²
Neimar Correa Severo¹

Abstract: Semen quality evaluations are essential to produce frozen semen that are used in artificial insemination. Semen collection and processing centers (CCPS) require accurate methods to determine sperm concentration and maximize the number and quality of doses prepared from pure semen and to optimize the fertility of thawed semen. Some equipment like spectrophotometry and nucleocounter are used in laboratories of the CCPS to estimate the concentration of spermatozoa in the semen of bulls. The aim of the present work is to compare the two methods to evaluate the concentration of fresh bovine semen. It was found a high correlation between these methods, the statistics used was Pearson correlation that result in 0,94. This result indicates that both treatments can be used to determine bovine semen concentration.

Keywords: Bull; Semen; Evaluation.

Palavras-chave: Touro; Sêmen; Avaliação.

Introdução – A avaliação da qualidade seminal é fundamental para a produção do sêmen congelado utilizado na inseminação artificial. Os centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS) necessitam de métodos acurados e precisos para determinar a concentração espermática e maximizar o número e a qualidade das doses preparadas a partir do sêmen puro e para otimizar a fertilidade do sêmen descongelado. A falta de precisão na estimativa da concentração espermática afeta diretamente a eficiência da produção dos CCPS, a qualidade do produto final e a fertilidade. Os espectrofotômetros são comumente utilizados nos laboratórios dos CCPS para estimar a concentração de espermatozoides no sêmen de touros. A leitura da concentração espermático nos espectrofotômetros é feita pela diferença de intensidade ótica que passa através da amostra exposta ao feixe de luz do equipamento [1]. Esses equipamentos são rotineiramente calibrados e padronizados, com o hemocítmetro, considerado o “padrão ouro” na determinação da concentração de espermatozoides [2]. Entretanto existem métodos diretos de avaliação como o NucleoCounter® SP 100™ (Chemometec, Allerod, Dinamarca) que utiliza um microscópio de fluorescência com um software de conta-

¹ Alta Genetics do Brasil.

² Universidade de Uberaba.

gem de espermatozoides corados pelo Iodeto de Propídio, que se liga ao DNA das células [3]. O equipamento possui configurações pré-definidas de fábrica para uso com sêmen bovino [2], suíno [4] e equino [5], tanto puro como diluído. O objetivo deste trabalho foi comparar os dois métodos descritos para avaliar a acurácia na determinação da concentração espermática do sêmen bovino puro.

Material e Métodos - As coletas de sêmen foram realizadas em centro de coleta e processamento de sêmen bovino localizado no município de Uberaba, MG. Foram coletados 30 ejaculados ($n=30$) de touros da raça Nelore com idades entre 48 a 96 meses. As amostras foram estrategicamente selecionadas para representar uma faixa entre 500 milhões a 3 bilhões de espermatozoides ejaculados por ml. As concentrações espermáticas de cada amostra pura foram avaliadas pela espectrofotometria (Genesys[®] 20, Thermo Spectronic, Estados Unidos) e pelo NucleoCounter[®] SP 100™. A avaliação da concentração pelo espectrofotômetro foi realizada em equipamento calibrado para sêmen bovino com comprimento de onda de 550 nm, na diluição de 50 μ l de sêmen puro em 7 ml de solução salina a 0,9% (diluição 1:140). O resultado da leitura da porcentagem de transmitância foi convertido para quantidade de espermatozoides por ml. Para o Nucleocounter foi diluído 50 μ l de sêmen puro em 20 ml de solução S-100 na diluição de 1:400, conforme descrito pelo fabricante. Após homogeneização foi realizada a aspiração da amostra no cassete apropriado e logo a seguir feita a leitura no equipamento. O resultado foi dado em quantidade de espermatozoides por ml. A correlação entre as técnicas foi medida utilizando o Coeficiente de Correlação de Pearson (r).

Resultados e Discussão - A relação entre as estimativas da contagem do NucleoCounter e do espectrofotômetro da concentração de espermatozoides em amostras de sêmen puro bovino é apresentada na **Figura 1**. Esses dados indicam um alto grau de correlação (R^2) com estimativas preditas praticamente idênticas na faixa das amostras avaliadas. Estes resultados são consistentes com os de outros autores em que o NucleoCounter foi utilizado como um método altamente preciso para medir a concentração de espermatozoides no sêmen puro de touros [2], cachaços [4] e garanhões [5].

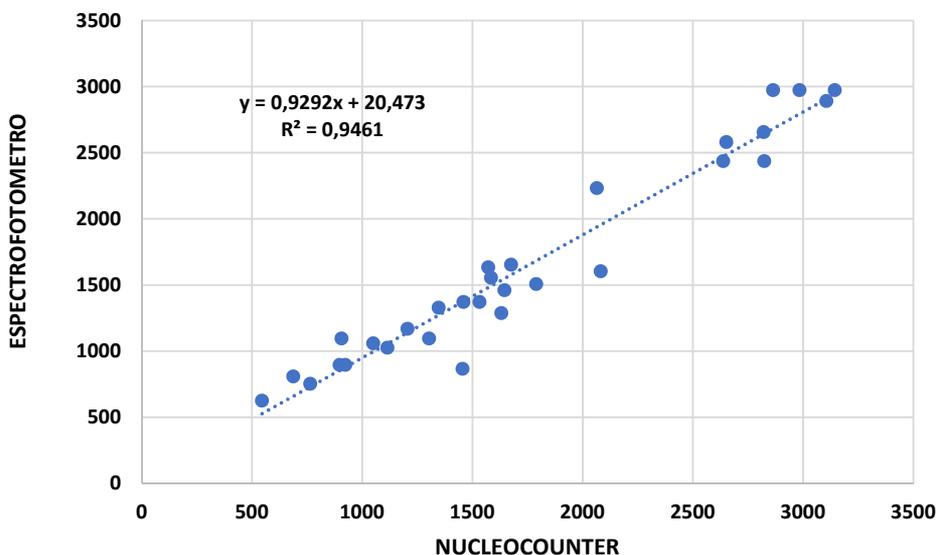


Figura 1. Correlação entre o NucleoCounter e o Espectrofotômetro na estimativa da concentração espermática de sêmen puro bovino ($\times 10^6$).

Considerações Finais - O NucleoCounter é extremamente preciso para estimar a concentração espermática em amostras de sêmen bovino puro. A precisão dessas estimativas é consistente com as contagens fornecidas pelo espectrofotômetro. Estes resultados, tornam o NucleoCounter uma alternativa para substituir o espectrofotômetro na determinação da concentração espermática em ejaculados de sêmen bovino. O NucleoCounter também pode substituir o hemocitômetro como “padrão ouro” para a calibração de espectrofotômetros e outros equipamentos utilizados para avaliar a concentração espermática dos ejaculados de mamíferos.

Referências bibliográficas

- [1] Graham, J.K. & Kaproth, M.T. Sperm concentration and calibration of spectrophotometers. Proc. 26th Techn. Conf. Art. Insem. & Reprod., 2016; 131-138.
- [2] DeJarnette, J.M.; Lefevre, K. Use of the NucleoCounter in a semen processing laboratory. Proc. 22nd Techn. Conf. Art. Insem. & Reprod., 2008; 89-93.
- [3] Lorton, S.P. Measurement of sperm concentration: the NucleoCounter[®] SP 100[™]. Proc. 24th Techn. Conf. Art. Insem. & Reprod., 2012; 182-185.
- [4] Hansen, C; Vermeiden, T; Vermeiden, J.P.W.; Simmet, C.; Day, B.C.; Feistma, H. Comparison of Sperm FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. Therio. 2006, 66(9):2188-2194.
- [5] Morrell, J.M.; Johannisson, A.; Juntilla L.; Rytty, K.; Bäckgren, L.; Dalin, A.-M; Rodriguez-Martinez, H. Stallion Viability, as Measured by the Nucleocounter SP-100, Is Affected by Extender and Enhanced by Single Layer Centrifugation. Vet. Med. Intern., 2010 (2010):659862.

Congelamento do sêmen de reprodutores bubalinos em período reprodutivo desfavorável para uso em IATF

Jaci de Almeida¹
Oswaldo Almeida Resende^{2,3}

Abstract: The reproductive seasonality, the difficulty of semen collection with electro-ejaculator and the lack of frozen semen of buffaloes in the national market are the three main obstacles to the efforts to advance the artificial insemination at fixed time in this species. Numerous researches are being developed in this area, generating a lot of information, especially in semen technology. The objective of this study is to present results of collection and freezing of buffalo semen on farm.

Keywords: coleta de sêmen, congelamento de sêmen, manejo reprodutivo.

Palavras-chave: semen collection, semen freezing, reproductive management.

Introdução - Na espécie bubalina, a sazonalidade reprodutiva, a dificuldade de coleta de sêmen com eletro-ejaculador e a falta de sêmen congelado de búfalos no mercado nacional são os três principais obstáculos para o avanço da inseminação artificial em tempo fixo nesta espécie. A qual através dos procedimentos de sincronização da ovulação esta sendo usada como estratégia técnica para o sucesso reprodutivo em período desfavorável, possibilitando inclusive a desestacionalização das fêmeas destinadas a produção de leite. Na pesquisa existem relatos de touros bubalinos, que mesmo condicionados à coleta com vagina artificial convencional em Centrais, se tornaram refratários ao serviço artificial ao longo do tempo [1 e Bernardes, 2017 - comunicação pessoal], dificultando e tornando inviável economicamente a sua manutenção em Centrais de congelamento de sêmen. Já no campo há dificuldade de utilizar a eletroejaculação em búfalos, devido a uma maior sensibilidade destes aos estímulos elétricos [2], podendo ocasionar acidentes, principalmente em animais adultos. Diante de tantas dificuldades, uma saída encontrada pelos proprietários e criadores de bubalinos é o congelamento do sêmen em suas propriedades para uso na IATF. Este trabalho pretende apresentar resultados do congelamento de sêmen bubalino em fazenda particular, procurando discutir o comportamento animal, técnicas de manejo e seus prováveis efeitos na eficiência da coleta de sêmen durante a estação reprodutiva desfavorável, como ferramenta para otimizar o uso de protocolos de IATF na espécie.

Material e Métodos - O experimento foi realizado na Fazenda Indiana, no município de São Sebastião do Passé/BA, Brasil, Latitude 12°30'45" Sul e Longitude 38°29'43" Oeste [3]. Algu-

¹ Centro Universitário de Barra Mansa-UBM.

² Embrapa Agrobiologia, RJ.

³ Pesagro/Cepao, RJ

mas recomendações foram repassadas ao proprietário, tais como: evitar vacinar, vermifugar, usar medicamentos carrapaticidas, alimentação contendo uréia e gossipol nos 60 dias, que antecederiam as coletas. Assim como, os animais serem condicionados no local definitivo de coletas com vagina artificial, e por último, não menos importante, separar os touros das fêmeas, argolar e manejar em local onde eles fossem se acostumando com a presença visual de outros reprodutores. Foram utilizados sete touros Murrah (*Bubalus bubalis*) da própria fazenda, durante o período reprodutivo desfavorável (PRD - primeira quinzena de março de 2019), com a idade de 5,8 a 17,9 anos; pesos de 660 a 900kg; ECC de 3 a 4 e PE de 36 a 40 cm, criados em sistema extensivo e com experiência sexual com fêmeas. Os reprodutores apresentavam histórico de fertilidade conhecida e eram manejados separados das fêmeas, sendo selecionados a partir de pré-condicionamento para coleta com vagina artificial e qualidade dos ejaculados seguindo recomendação do Manual de Andrologia [4]. Uma fêmea em cio natural ou induzido era contida em tronco específico para as coletas na parte da manhã e tarde. Após as coletas, os ejaculados eram direcionado para o laboratório e colocados em banho-maria a 37°C, para as análises das características físicas (volume, turbilhão, motilidade, vigor e concentração) e morfológicas (defeitos maiores, menores e totais) do sêmen, usando microscopia de contraste de fase e eosina.

As concentrações espermáticas foram determinadas utilizando uma câmara de Neubauer, para a obtenção, após diluição final, 40×10^6 SPTZ/mL. Todas as amostras foram diluídas em extensor comercial Botu-Bov[®] (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil), envasadas em palhetas de 0,5 mL e procesadas para estabilização e congelamento seguindo os procedimentos de Almeida [5]. Todas as amostras foram avaliadas antes do acondicionamento em botijão de nitrogênio, sendo armazenadas apenas amostras que mantivessem as características da qualidade espermática motilidade total > 30% e total de defeitos de espermatozoides ≤ 20%.

Resultados e Discussão - Os valores referentes as coletas seminais de cada reprodutor durante o período reprodutivo desfavorável, constam na tabela 1. Nesta é possível verificar que todos os animais tiveram o mesmo número de coletas, entretanto, houve variação de sucesso de coleta, amostras processadas e congelamentos efetuados. Dos sete animais trabalhados, apenas um (touro C), não teve material congelado, mesmo tendo apresentado 2 ejaculados com características que permitiram o processamento. Porém, a motilidade e vigor após o congelamento, ficaram abaixo do mínimo recomendado pelo CBRA [4], para serem liberados para uso. Por outro lado houveram animais que tiveram apenas 1 ejaculado congelado (tours F e G), e suas doses estavam com motilidade (35 e 40%) e vigor (3) pós-descongelamento.

Tabela 1 - Características de coletas de sêmen e de reprodutores bubalinos em fazenda no Estado da Bahia (2019).

Touros	Nº coletas	Sucesso* N(%)	Processado** N(%)	Congelado*** N(%)	Nº doses
A	8	6(75,0)	4(66,7)	3(75,0)	184
B	8	7(87,5)	3(42,9)	1(33,3)	270
C	8	6(75,0)	2(33,3)	0(0,0)	0
D	8	8(100,0)	4(50,0)	2(50,0)	450
E	8	8(100,0)	5(62,5)	4(80,0)	301
F	8	6(75,0)	2(33,3)	1(50,0)	35
G	8	7(87,5)	2(28,6)	1(50,0)	130
Total	56	48(85,7)	20(41,7)	12(60,0)	1370

*Sucesso = ejaculado/número de coletas; **Processado = processado/sucesso; ***Congelado = congelado/processado.

Na média geral, os parâmetros espermáticos para os touros avaliados, apresentaram valores acima dos máximos e mínimos recomendados no manual de andrologia [4] para a espécie bubalina (tabela 2). Somente o touro C não apresentou ejaculado com características físicas que permitissem o congelamento. Entretanto, permitiriam seu uso na IATF com o sêmen refrigerado.

O fato dos animais terem sido pré-condicionados para a coleta de sêmen 15 a 20 dias antes do início das coletas contribuiu para que os animais produzissem ejaculados de boa qualidade. Na bubalinocultura, o sistema adotado para produção de leite altera a estrutura social, pois os lotes são constituídos com animais de diferentes idades, produção e categorias, com mudança constante dos animais entre lotes (de acordo com a produção de leite), causando estresse exacerbado. No caso específico dos reprodutores, muitas vezes encontram-se em uma relação muito superior de touro/vaca ao recomendado para a espécie, em algumas situações de 1:100 ou mais de acordo com a formação dos lotes de ordenha. Situação que exige demais do reprodutor, pois se houver muitas fêmeas em cio no mesmo dia este animal pode ter sua reserva espermática esgotada e não fertilizar as demais fêmeas que manifestarem cios nos dias subsequentes, ou ainda o reprodutor ter preferência por uma ou outra fêmea e cobrir repetidas vezes e não demonstrar interesse em copular com outras em cio [5].

Tabela 2 - Médias e desvios-padrão das características seminais dos ejaculados de búfalos em fazenda no Estado da Bahia (2019).

Touros	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Defeitos maiores (%)	Defeitos menores (%)	Defeitos totais
A	1,9±0,7	81,3±5,2	3,3±0,5	6,8±0,7	13,8±2,3	20,5±2,4
B	1,6±0,9	80,0±5,3	3,4±0,5	7,1±1,1	14,6±2,4	21,5±2,6
C	2,3±0,7	58,8±10,6	2,5±0,5	8,3±1,0	17,5±2,1	25,8±2,8
D	2,1±0,8	84,4±4,2	3,8±0,7	7,9±0,6	12,0±1,1	19,9±1,2
E	2,1±0,8	85,0±4,6	3,7±0,6	6,5±0,5	11,3±1,0	18,0±1,3
F	1,9±0,8	73,8±4,4	3,3±0,5	8,3±0,7	15,0±1,1	23,3±1,3
G	1,7±0,4	75,0±6,0	3,6±0,7	7,9±0,6	15,0±2,4	22,9±2,5
Total	1,9±0,7	76,9±10,2	3,3±0,6	7,5±1,0	14,2±2,6	21,7±3,1

Em um sistema de monta natural comum nas criações extensivas de búfalos, deve-se respeitar a proporção touro/vaca, que é de 1 touro:45 a 60 vacas “animais adultos: > 5 anos” [6]. Mas estes valores podem ser superiores se o reprodutor tiver sido aprovado por um exame andrológico completo (com teste de libido), tendo sêmen de alta qualidade, ser de alto valor zootécnico e dependendo do ambiente onde se encontra (piquetes planos, boa alimentação, água *ad libitum* e sombra ou local para banho).

Considerações Finais - Os reprodutores bubalinos são passíveis de condicionamento para coleta de ejaculados com vagina artificial em fazendas para ser usado em IATF como sêmen refrigerado e congelado. Entretanto, podem não apresentar uma constância na produção de ejaculados com qualidade, ou mesmo não ejacular. Vale ressaltar que segundo a Instrução Normativa MAPA N° 36, de 27 de outubro de 2015 [7], somente poderá ser distribuído no Brasil o sêmen bovino ou bubalino coletado em centros de coleta e processamento de sêmen, registrados no Ministério da agricultura pecuária e Abastecimento (MAPA). Isto significa que o sêmen coletado e processado em fazendas particulares, somente poderá ser utilizado pelo produtor e não é permitida sua comercialização.

Referências bibliográficas

- [1] Prabhu SS, Bhattacharya P. Influence of factors affecting sex drive on semen production of buffaloes. I - Physiological state of the “teaser” cow. *Indian J Vet Sci Anim Husband*, 1954:5-50.
- [2] Ohashi OM. Inseminação artificial em bubalinos. In: Gonçalves PBD. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. (2ª ed.), Roca, 2008:97-110.
- [3] <https://www.geografos.com.br/cidades-bahia/sao-sebastiao-do-passe.php> 2019.
- [4] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA)*. 3ª ed. Belo Horizonte; 2013.
- [5] Almeida J. Sêmen refrigerado e seu potencial de uso na inseminação artificial de búfalas (*Bubalus bubalis*). 2018. 195p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- [6] Baruselli OS, Oliveira JFS, Mendes MLM, Jorge AM, Fujii T, Palazzo JPC. Diagnóstico da bubalinocultura do Vale do Ribeira. Campinas. Documento Técnico CATI 1993:(94)16.
- [7] MAPA - Instrução Normativa MAPA N° 36, de 27 de outubro de 2015. http://www.lex.com.br/legis_27037049_Instrucao_Normativa_N_36_de_27_de_outubro_2015.aspx

Micro-RNAs diferentes expressos em touros férteis e subfértéis

Lucas Melo Gonçalves¹

Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária – lucasmelo3942@hotmail.com.

Ricardo Tomaz da Silva¹

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária.

Matheus de Souza Gomez¹

Laboratório de Bioinformática e Análises Moleculares.

Patrícia Tieme Fujimara¹

Laboratório de Genética.

Carlos Ueira-Vieira¹

Laboratório de Genética.

Muller Carrara Martins¹

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária.

Marcelo Emílio Beletti¹

Laboratório de Biologia da Reprodução – mbeletti@ufu.br.

Abstract: Infertility or subfertility in bovine males may be related to spermatogenic microRNAs (miRNAs), whose function seems to be associated with the regulation of gene expression, degradation of messenger RNAs (mRNAs) for later translation into early embryonic development. Semen samples from two bulls (*Bos taurus*) which were subfertile (T1 and T2) and one fertile (Tc) were used to perform the RNAseq technique for miRNAs. In sum, 1306 miRNAs were identified in the samples. The bta-miR-380-5p, bta-miR-155, btamiR-122, bta-miR-30c and bta-miR-34a genes were identified by computational analysis as being differentially expressed between the groups, indicating that these genes may present themselves as possible fertility markers. However, it has become clear that there is no single miRNA that marks different types and causes of subfertility.

Keywords: bovine; sperm; fertility.

Palavras-chave: bovino, espermatozoide, fertilidade.

Introdução - A reprodução animal tem sido beneficiada com pesquisas na área da biologia molecular, apresentando a possibilidade de melhoria dos índices de fertilidade a partir de maior e mais específicos conhecimentos do mecanismo de atuação, identificação e caracterização dos RNAs. Parte das dúvidas quanto aos mecanismos fisiológicos da infertilidade em machos poderiam ser esclarecidas pela identificação e reconhecimento das funções dos micro-RNAs (miRNAs) [1]. Pequenos RNAs não-codificantes, os miRNAs participam da regulação de diversos processos fisiológicos, aparentemente atuando após a fecundação e sua descoberta permitiu uma nova visão quanto aos mecanismos de regulação dos genes (Nishi-

¹ Universidade Federal de Uberlândia-MG, Brasil.

mura & Dode, 2014). O propósito deste estudo foi descrever o perfil de miRNAs diferencialmente expressos em amostras de sêmen de touros (*Bos taurus*) férteis e subférteis e avaliar se são passíveis de serem utilizados como marcadores de fertilidade.

Material e Métodos - Foram utilizadas oito amostras de 0,5ml de sêmen congelado de um touro comercial de fertilidade comprovada em central de inseminação artificial identificado como Tc (Touro controle), e oito amostras sêmen de 0,5 ml de outros dois touros subférteis (amostras T1 e T2). Amostras de cada touro foram submetidas a protocolos de extração de RNA feita conforme procedimentos descritos pelo mirVana™ miRNA Isolation Kit (AM1560) da Life (Life Technologies Corporation). Em seguida, foram realizadas a ampliação dos miRNAs e construção da biblioteca de miRNA (kit Íon Total RNA-Seq v2), a reação de PCR emulsão, enriquecimento, bem como a injeção da amostra no chip pelo equipamento Íon Chef. O sequenciamento foi feito no equipamento Íon Próton (Ion Proton™ System, Thermo Fisher Scientific Inc.). Os miRNAs isolados, de cada touro avaliado, foram encaminhados para a análise de bioinformática, para que fossem identificados aqueles diferencialmente expressos nos animais avaliados. Foi estabelecida a comparação entre as amostras, utilizando-se duas metodologias de busca de alvos para aumentar a robustez do procedimento analítico: o programa miRanda utilizando como cutoff energia mínima livre da hibridização -20 kcal/mol, 100% de identidade entre os nucleotídeos 2 e 8 do miRNA e, o programa RNAhybrid, utilizando como cutoff energia mínima livre da hibridização -20 kcal/mol. Implementou-se ambos os procedimentos em plataforma Linux offline para realização do experimento de forma high-throughput. Foi criado um banco de dados de 3' UTR de *Bos taurus* utilizando Biomart-Ensembl para realização da busca de alvos para os miRNAs identificados como diferencialmente expressos, identificando as moléculas em maior expressão nos animais altamente férteis (resultados satisfatórios no exame andrológico e na Produção *in vitro* de Embriões) e subférteis (resultados insatisfatórios no exame andrológico e na Produção *in vitro* de Embriões).

Resultados e Discussão - A expressão de miRNAs apresentou variações entre animais férteis e subférteis, sendo que os miRNAs miR-380-5p e miR-155 foram mais expressos na amostra T1 enquanto o miR-34a apresentou menor grau de expressão na amostra T2, quando comparadas à amostra controle (touro fértil). O resultado observado levanta a hipótese de que existem diferenças quanto ao conteúdo de miRNA entre indivíduos férteis e subférteis, e mesmo entre os subférteis, pois foi observado que os miRNAs identificados não foram os mesmos nas amostras T1 e T2. Enquanto os miRNAs bta-miR-380-5p, bta-miR-155 e bta-miR-30c apresentaram maior expressão na amostra T1, o bta-miR-122 nem mesmo foi identificado na amostra. O fato pode ser atribuído a diferentes causas de subfertilidade, pois não se podem esperar respostas biológicas idênticas de organismos distintos, apesar de mesma raça e sexo, outras variáveis podem ter levado à diferença observada. Os miRNAs bta-miR-380-5p, bta-miR-155, bta-miR-122, bta-miR-30c e bta-miR-34a diferencialmente expressos neste estudo carecem de estudos mais específicos para a determinação de seus mecanismos de ação, mas, cabe considera-los como possíveis marcadores não somente de fertilidade em touros, mas

também marcadores da causa da subfertilidade, tais como injúria testicular, deficiência no processo de fertilização propriamente dito e no desenvolvimento embrionário.

Considerações Finais - Existem diferenças quanto ao conteúdo de miRNAs em touros férteis e subférteis, no entanto, não é possível identificar um único miRNA que seja diferencialmente expresso em todos os touros subférteis, provavelmente por serem subfertilidade de causas diferentes.

Referências bibliográficas

[1] Nishimura RC, Dode MAN, RNAs de espermatozoide: qual a sua função fisiológica? Rev bras reprod anim. 2014; 38: 32-36.

Agradecimentos: Agradecemos a FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Osmolaridade ideal para execução do teste hiposmótico no sêmen *in natura* de ovinos (*Ovis aries*)

Alexandre Rossetto Garcia¹

alexandre.garcia@embrapa.br

Ana Beatriz Bossois Moura²

Narian Romanello³

Jeferson Ferreira da Fonseca⁴

Felipe Zandonadi Brandão²

Messy Hannear de Andrade Pantoja⁵

Andréa do Nascimento Barreto⁶

Marco Antonio de Paula Sousa⁶

Daniela Botta⁶

Alessandro Giro⁶

Abstract: The study aimed to establish the most suitable osmolarity range of the hypoosmotic solution for testing the membrane integrity in raw semen of rams. Sodium citrate and fructose based solutions (S) with the following osmolarities (mOsm/L) were used: 50 (S1), 75 (S2), 100 (S3), 125 (S4), 150 (S5), 175 (S6), 200 (S7), 250 (S8), 290 (S9) and 300 mOsm/L (S10). Nine mature Santa Ines rams (21.5±0.5 months; 72.9±1.6 kg) had semen collected one month apart. After the hypoosmotic swelling test (HOST) the ejaculates were evaluated using a phase-contrast microscope. A total of 200 spermatozoa were counted and sperm cells were classified as spermatozoa with coiled tails (CD, %), strongly coiled tail (CFD, %) or non-coiled tails. According to CD, S1, S2, S3, S4, S5, S6 and S7 were superior to S8, S9 and S10 (P<0,05). According to CFD, S2, S3, S4, S5, S6 and S7 were superior to S8, S9 and S10 (P<0,05). Results suggest that the 75 up to 200 mOsm/L solution would be best for using in HOST when raw semen of rams is analyzed.

Keywords: ram; sperm; hypoosmotic solution.

Palavras-chave: ovinos; espermatozoide; solução hiposmótica.

Introdução – A expansão da ovinocultura tem tido destaque nas últimas décadas em diversas regiões do país, sendo uma atividade atrativa para produção de leite, carne e couro de qualidade¹. Contudo, inúmeras biotécnicas da reprodução aplicadas ao sêmen ovino são baseadas em métodos desenvolvidos para outras espécies². Assim, torna-se crucial a execução de estudos espécie-

¹ Embrapa Pecuária Sudeste.

² Universidade Federal Fluminense.

³ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP.

⁴ Embrapa Caprinos e Ovinos.

⁵ Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP.

⁶ Universidade Federal do Pará.

-específicos que possam melhorar a eficiência reprodutiva desses animais. O teste hiposmótico (HOST) é uma técnica diagnóstica capaz de indicar a condição estrutural da membrana espermática, sendo executada com osmolaridade já estabelecida e relatada na literatura, em espécies como bovinos e equinos^{3,4}. Porém, para os ovinos, essa referência ainda não foi propriamente estabelecida. As membranas celulares são responsáveis pela homeostase, por possibilitarem transporte seletivo de moléculas entre os meios intra e extracelular⁵. Quando o espermatozoide é inserido em ambiente hiposmótico, o solvente do meio extracelular tende a entrar na célula, a fim de promover equilíbrio celular⁶. O influxo de solvente provoca turgidez celular, fazendo com que a cauda espermática se dobre, indicando que a membrana espermática se encontra íntegra e funcional⁷. Assim, considerando a necessidade de refinamento de técnicas reprodutivas para a espécie, o objetivo do trabalho foi estabelecer a osmolaridade mais adequada da solução hiposmótica usada para avaliação da integridade da membrana espermática no sêmen *in natura* de ovinos.

Material e Métodos - O experimento foi conduzido de janeiro a maio de 2016, na Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos-SP, Brasil. Foram utilizados 9 reprodutores ovinos Santa Inês, em grupo experimental homogêneo (21,5±0,5 meses, 72,9±1,6 kg e ECC 3,3±0,1). Os animais foram mantidos em lote único sob as mesmas condições de manejo nutricional e sanitário, permanecendo em confinamento, com fornecimento diário de dieta composta por 80% volumoso e 20% de concentrado, com acesso *ad libitum* a água e sal mineral. A avaliação da integridade de membrana plasmática consistiu na utilização de soluções hiposmóticas, composta por D-frutose e citrato de sódio dihidratado. As soluções apresentavam 10 osmolaridades diferentes (mOsm/L): 50 (S1), 75 (S2), 100 (S3), 125 (S4), 150 (S5), 175 (S6), 200 (S7), 250 (S8), 290 (S9) e 300 (S10), determinadas por extrapolação alométrica em relação à espécie caprina². O sêmen foi coletado mensalmente por vagina artificial, totalizando 5 coletas/animal. Após a coleta, o sêmen *in natura* foi avaliado quanto aos aspectos quantitativos. Atendendo às premissas de normalidade para a espécie⁸, o ejaculado era destinado aos tratamentos. Uma alíquota de 20 µL de sêmen foi adicionada a cada uma das diferentes soluções hiposmóticas (500 µL), sendo as amostras homogeneizadas e incubadas a 37°C por 60 minutos. Após, foram adicionados 500 µL de solução formol-salina tamponada e as amostras mantidas a 5°C até a análise. Foram avaliadas 200 células por amostra, em microscopia de contraste de fase (1000x)⁹. Os espermatozoides foram classificados como portadores de membrana plasmática íntegra ao apresentar intumescimento celular visualizado mediante o dobramento da cauda³. Adicionalmente ao total caudas dobradas (CD, %), as células que apresentaram forte enrolamento da cauda (CFD, %) também receberam classificação, a fim de minimizar o efeito de possíveis defeitos morfológicos do ejaculado sobre o teste hiposmótico. Para a contagem de CD foram consideradas todas as células que apresentavam qualquer tipo de dobra na cauda, incluindo a CFD. Para análise estatística, os dados de integridade de membrana plasmática foram submetidos à avaliação da normalidade dos resíduos, seguida de análise de variância. Em caso de significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey. O nível de significância previamente adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão – A CD e a CFD apresentaram diferença significativa quando as células espermáticas foram expostas às diversas osmolaridades das soluções hiposmóticas (Figura 1).

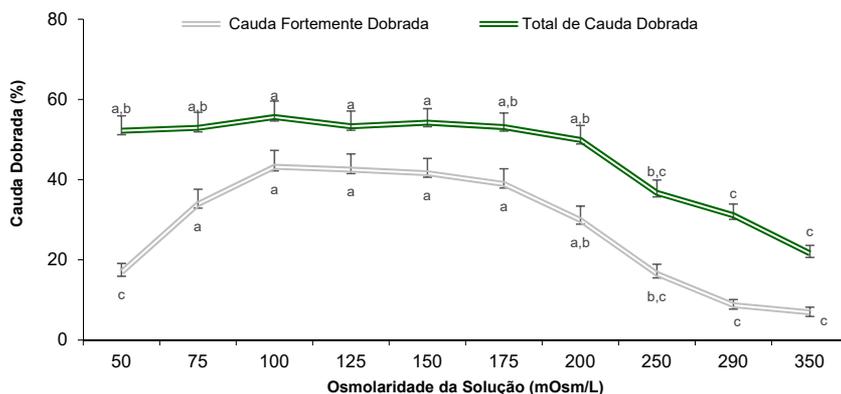


Figura 1. Médias (\pm erro padrão) do número de caudas dobradas (%) em soluções hiposmóticas com diferentes osmolaridades (mOsm/L). Letras distintas indicam diferença significativa entre as soluções, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

As populações espermáticas apresentaram elevada porcentagem de CD da solução S1 à S7, atingindo menores valores nas soluções S8 a S10. Essa tendência também foi notada para CFD, diferindo apenas na particularidade de que em S1 os valores não apresentaram distinção de S8, S9 e S10 ($P > 0,05$). A comparação entre CD e CFD foi propositalmente executada para inferência do efeito das diferentes osmolaridades, pois o dobramento intenso da cauda do espermatozoide pode sugerir um defeito morfológico celular prévio⁸ e não, de fato, ser consequente à exposição hip-osmolar. Assim, no presente estudo, com o comportamento semelhante de CD e CFD, pode-se inferir que não houve influência de defeitos morfológicos na análise pretendida. Por conceito, a solução hiposmótica considerada ideal deve ocasionar um estresse osmótico suficientemente grande para causar aumento observável no volume intracelular, mas sem levar à lise da membrana espermática⁶. Isso justifica a notável redução na proporção de células com CD e CFD, observadas nas S8 (250 mOsm/L), S9 (290 mOsm/L) e S10 (300 mOsm/L), permitindo inferir que essas concentrações não são adequadas para execução do HOST em ovinos. Sendo assim, as osmolaridades de 75 a 200 mOsm/L aparentemente apresentaram ser mais eficientes para o teste, o que difere a técnica daquela utilizada para outras espécies, como, caprinos (100 a 200 mOsm/L)², bovinos (150 mOsm/L)³ e equinos (25 a 100 mOsm/L)¹⁰. A CD diminuiu significativamente da primeira à quinta coleta de sêmen (Figura 2A) e diferiu entre animais (Figura 2B). Sabe-se que a qualidade seminal está associada à influência da frequência de coletas, além de certas variáveis do ambiente¹¹, o que pode ter ocorrido no presente estudo, explicando a queda da CD ao longo das coletas. A influência das características seminais individuais dos animais também são relatadas por outros autores¹², o que corrobora os achados desse trabalho.

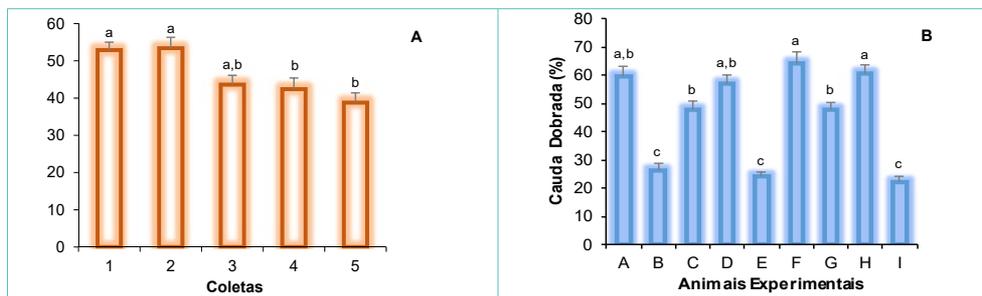


Figura 2. A- Médias (\pm erro padrão) do número de células com caudas dobradas (%) obtidas do agrupamento de todas as soluções hiposmóticas, avaliadas em 5 coletas de sêmen consecutivas. **B-** Médias (\pm erro padrão) do número de células com caudas dobradas (%) obtidas do agrupamento de todas as soluções hiposmóticas, avaliadas por animal. Letras distintas indicam diferença significativa, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

Conclusão - O presente estudo demonstrou que as osmolaridades de 75 a 200 mOsm/L aparentemente foram mais eficientes para uso no HOST em sêmen *in natura* de ovinos.

Referências Bibliográficas

- [1] EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2018. Novo Censo Agropecuario mostra crescimento efetivo de caprinos e ovinos do Nordeste. Disponível em: <https://www.embrapa.br/modelo/busca-de-noticias/-/noticia/36365362/novo-censo-agropecuario-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>. (Acesso em 10.04. 2019).
- [2] Fonseca JF, Torres CAA, Maffili VV, Borges AM, Santos ADF, Rodrigues MT, Oliveria RFM. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim Reprod* 2005; 2, 139-144.
- [3] Revell SG, Mrode RA. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 1994; 36, 77-86.
- [4] Arruda RP, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Ver Bras Reprod Anim* 2011; 35, 145-151.
- [5] Dell'Aqua JA, Papa FO, Zahn FS, Alvarenga MA, Leonardo H. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. *Rev Bras Reprod Anim* 2002; 26, 189-191.
- [6] Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LID. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70, 219-225.
- [7] Fuse H, Ohta S, Sakamoto M, Kazana T, Katayama T. Hypoosmotic swelling test with a medium of distilled water. *Arch Andrology* 1993; 30,111-116.
- [8] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA). 3rd ed. Belo Horizonte; 2013.
- [9] Moura ABB, Brandão FZ, Esteves, Novita S, Souza GN, Fonseca JF, Pantoja MHA, Romanello N, Botta D, Giro A, Garcia AR. Differences in the thermal sensitivity and seminal quality of distinct ovine genotypes raised in tropical conditions. *Theriogenology* 2019; 123, 123-131.
- [10] Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51, 721-727.
- [11] Aguirre V, Orihuela A, Vázquez R. Effect of semen collection frequency on seasonal variation in sexual behaviour, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair rams (*Ovis aries*). *Trop Anim Health Prod.* 2007; 39(4):271-277.
- [12] Prasad JK, Kumar S, Mohan G, Shanker U, Agarwal SK. Hypo-osmotic swelling tests (HOST) and its response in fresh and freeze-thawed semen. *Indian J Anim Sci* 1999; 69, 766-769.

Agradecimentos: À Embrapa Pecuária Sudeste (Projetos Rede BIOTEC # 11.13.06.001.04.01.001 e SUPEROV #02.13.06.026.00.06), à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Proteínas espermáticas marcadoras de fertilidade e subfertilidade em bovinos

Muller Carrara Martins¹

mullercarrara@hotmail.com

Lucas Melo Gonçalves¹

Pollyanne G. M. Cunha¹

Romualdo Morandi-Filho¹

Amanda Nonato¹

Ricardo Tomaz da Silva¹

Marcelo Emílio Beletti¹

mebeletti@ufu.br

Abstract: The objective of this work was to evaluate the bovine sperm nuclear proteins from fertile and subfertile animals, in an attempt to identify molecular markers of fertility and subfertility in bulls. Eight samples of frozen semen of different ejaculates from four Girolando bulls were used, two highly fertile and two subfertile animals. The sperm nuclei were isolated and the protein content was evaluated by advanced mass spectrometry. A total of 766 different proteins were identified, 20 of which were found in higher numbers in highly fertile bulls and 18 of them were found in higher numbers in subfertile bulls. A total of 766 different proteins were identified, 20 of which were found in higher numbers in highly fertile bulls, therefore they are possible markers of fertility, and 18 of them were found in higher numbers in subfertile bulls, therefore they are possible markers of subfertility. The top five fertility protein markers were Keratin type II cytoskeletal 71 kDa, Plasma serine protease inhibitor, 60S ribosomal protein L9, Protein FAM71D and Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit. The top five subfertility protein markers were Tubulin beta-2B chain, ATP synthase subunit delta, Ferritin light chain, 60S ribosomal protein L30 and 60 kDa heat shock protein.

Keywords: proteome; spermatozoon; bull.

Palavras-chave: proteoma; espermatozoide; touro.

Introdução - A compreensão da composição e fisiologia do espermatozoide é importante para compreender a subfertilidade transitória ou permanente em touros. A comparação do perfil de proteínas de espermatozoides em diferentes estágios de maturação de diferentes espécies animais revelam diferentes conjuntos de proteínas. Algumas proteínas podem exercer diferentes papéis no organismo e exercer funções específicas nos espermatozoides. Durante a maturação dos espermatozoides observou-se, em homens férteis, que as proteínas envolvidas na geração de gametas, motilidade celular, metabolismo energético e processos de fosforilação oxidativa mostraram níveis de expressão crescentes e aquelas envolvidas na biossíntese, transporte, ubiquitinação e resposta aos processos de estresse oxidativo mostraram redução

¹ Universidade Federal de Uberlândia.

de seus níveis de expressão e, ainda que o número de proteínas decresce de acordo com o nível de maturação dos espermatozoides [1]. Estudos mostram que a maior ou menor expressão de proteínas espermáticas funcionais de touros mestiços pode estar relacionada à alta incidência de subfertilidade nestes animais [2]. Portanto, proteínas espermáticas podem servir como marcadores de fertilidade em machos de mamíferos, incluindo touros. Objetivou-se com este trabalho avaliar as proteínas nucleares de espermatozoides de bovinos férteis e subférteis, na tentativa de se identificar marcadores moleculares de fertilidade e subfertilidade em touros

Material e Métodos - Foram utilizadas oito amostras de sêmen congelado de diferentes ejaculados oriundas de quatro touros girolando, testados anteriormente em rotinas de produção *in vitro* de embriões, sendo dois altamente férteis e dois subférteis. As cabeças dos espermatozoides foram isoladas por sonicação e ultracentrifugação. As membranas dos espermatozoides foram degradadas por banhos em solução contendo triton X100 e a cromatina foi descondensada por tampão contendo 1,4-ditiotreitol (DTT). Posteriormente o material foi tratado com DNase e RNase. Finalmente as amostras passaram por redução e alquilação das proteínas, digestão enzimática das proteínas com tripsina e “clean up/desalting” das amostras. As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo LTQ Orbitrap ELITE (Thermo-Finnigan) acoplado a um sistema de cromatografia de nanoflow (LC-MS/MS), obtendo-se o proteoma total da cabeça dos espermatozoides. Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo “Computational Proteomics Analysis System – CPAS”. Para obter um número representativo da quantidade de cada proteína em cada amostra, foi realizada uma normalização das análises, transformando-se o número de peptídeo de cada proteína em porcentagem do número total de peptídeo encontrado na amostra. Para identificação de possíveis marcadores proteicos de fertilidade e subfertilidade, foi realizada análise estatística (ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, significância com $p \leq 0,05$) para identificar as proteínas em maior quantidade nos animais altamente férteis quando comparados com os subférteis e vice-versa.

Resultados e Discussão - Foram identificadas 766 diferentes proteínas, sendo que 20 delas foram encontradas em maior quantidade em touros altamente férteis quando comparado a touros subférteis. São elas em ordem decrescente de significância estatística: “Keratin, type II cytoskeletal 71 kDa” ($p=0,00075$), “Plasma serine protease inhibitor” ($p=0,00090$), “60S ribosomal protein L9” ($p=0,00098$), “Protein FAM71D” ($p=0,0034$), “Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit” ($p=0,0039$), “Keratin, type I cytoskeletal 10 kDa” ($p=0,0065$), “cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha” ($p=0,0087$), “Histone H2A.J” ($p=0,0091$), “Acyl-protein thioesterase 1” ($p=0,011$), “Keratin, type II cytoskeletal 59 kDa” ($p=0,014$), “40S ribosomal protein S8” ($p=0,015$), “Beta-nerve growth factor” ($p=0,015$), “Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B beta isoform” ($p=0,021$), “Cilia- and flagella-associated protein 20 kDa” ($p=0,022$), “Malate dehydrogenase, mitochondrial” ($p=0,037$), “Proteasome subunit alpha type-6”, ($p=0,041$), “Seminal plasma protein A3” ($p=0,043$), “Secretoglobin family 1D member”, ($p=0,046$), “Histone H2B subacrosomal variant”, ($p=0,049$), “Outer dense fiber protein 1” ($p=0,050$). Portanto, estas

proteínas possuem grande potencial para serem utilizadas como marcadores proteicos de fertilidade. 18 delas foram encontradas em maior quantidade em touros subfêrteis quando comparado a touros férteis. São elas em ordem decrescente de significância estatística: “Tubulin beta-2B chain”(p=0,00010), “ATP synthase subunit delta” (p=0,00016), “Ferritin light chain” (p=0,00018), “60S ribosomal protein L30” (p=0,00091), “60 kDa heat shock protein” (p=0,0011), “60S ribosomal protein L12” (p=0,0020) “Acetyl-CoA acetyltransferase” (p=0,0078) “Serum albumin” (p=0,0078), “60S ribosomal protein L8” (p=0,0078) “Tetraspanin-8” (p=0,014), “40S ribosomal protein S7” (p=0,016), “Stress-70 protein, mitochondrial” (p=0,019), “Double-strand-break repair protein rad21 homolog” (p=0,019), “NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 5” (p=0,020), “Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial” (p=0,024), “Heat shock protein beta-9” (p=0,035), “Adiponectin” (p=0,038), “Transitional endoplasmic reticulum ATPase” (p=0,040). Portanto, estas proteínas possuem grande potencial para serem utilizadas como marcadores proteicos de subfertilidade, necessitando novos trabalhos para validação desta hipótese.

Referências bibliográficas

- [1] Cui Z, Sharma R, Agarwal A. Proteomic analysis of mature and immature ejaculated spermatozoa from fertile men. *Asian Journal of Andrology* 2016, 18:735-746
- [2] Aslam MKM, KUMARESAN A, RAJAK SK, TAJMUL M, DATTA TK, MOHANNTY TK, SRINIVASAN A, YADAV S. Comparative proteomic analysis of Taurine, Indicine, and crossbred (*Bos taurus* × *Bos indicus*) bull spermatozoa for identification of proteins related to sperm malfunctions and subfertility in crossbred bulls. *Theriogenology* 2015, 84:624-633.

Agradecimentos: Agradecemos a FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Proteínas espermáticas marcadores de fertilidade em bovinos

Lucas Melo Gonçalves¹

Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária – lucasmelo3942@hotmail.com.

Ricardo Tomaz da Silva¹

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária.

Amanda Nonato¹

Laboratório de Biologia da Reprodução.

Romualdo Morandi Filho¹

Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Muller Carrara Martins¹

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária.

Gabriel Lucas Istorino de Souza¹

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária.

Marcelo Emílio Beletti¹

Laboratório de Biologia da Reprodução – mbeletti@ufu.br.

Abstract: Understanding the composition and physiology of spermatozoa is important for transient or permanent subfertility in bulls. The aim of this study was to evaluate the nuclear proteins of fertile bovine spermatozoa in the attempt to identify molecular markers of fertility in bulls. Spermatozoon heads semen samples from four bulls, two fertile and two subfertile, were used to Identification and quantification of sperm nucleus proteins by advanced masses. These samples were also used in routine in vitro production of embryos (IVEP), obtaining the rate of cleavage and formation of blastocysts of each sample. We identified 20 possible fertility markers proteins in bulls. Protein Acithioesterase1 (APT-1), beta nerve growth factor (Beta-NGF), plasma protein (BSP-3), Histone H2A.J, FAM71D protein, 40S-S8 ribosomal proteins and 60S-L9, the plasma serine protease inhibitor (Protein C inhibitor) (PCI) (Serpin A5) and the catalytic alpha subunit of the cAMP-dependent protein kinase were considered as having potential to be used as fertility markers.

Keywords: bovine; sperm; fertility.

Palavras-chave: bovino, espermatozoide, fertilidade.

Introdução - A compreensão da composição e fisiologia do espermatozoide é importante para compreender a subfertilidade transitória ou permanente em touros. A comparação do perfil de proteínas de espermatozoides em diferentes estágios de maturação de diversas espécies animais revela conjuntos distintos de proteínas. Algumas proteínas podem exercer diferentes papéis no organismo e exercer funções específicas nos espermatozoides. Durante a maturação dos espermatozoides [1] observou-se, em homens férteis, um aumento na

¹ Universidade Federal de Uberlândia-MG, Brasil.

expressão de proteínas envolvidas na geração de gametas, motilidade celular, metabolismo energético e processos de fosforilação oxidativa mostraram níveis de expressão crescentes e redução na expressão daquelas envolvidas na biossíntese, transporte, ubiquitinação e resposta aos processos de estresse oxidativo e, ainda que o número de proteínas decresce de acordo com o nível de maturação dos espermatozoides. Portanto, proteínas espermáticas podem servir como marcadores de fertilidade em mamíferos, incluindo touros. Objetivou-se com este trabalho avaliar as proteínas nucleares de espermatozoides de bovinos férteis e subférteis, na tentativa de se identificar marcadores moleculares de fertilidade em touros.

Material e Métodos - Foram utilizadas oito amostras de sêmen congelado de diferentes ejaculados oriundas de quatro touros girolando, sendo dois altamente férteis e dois subférteis. As cabeças dos espermatozoides foram isoladas por sonicação e ultracentrifugação. As membranas dos espermatozoides foram degradadas por banhos em solução contendo triton X100 e a cromatina foi descondensada por tampão contendo 1,4-ditiotreitol (DTT). Posteriormente o material foi tratado com DNase e RNase. Finalmente as amostras passaram por redução e alquilação das proteínas, digestão enzimática das proteínas com tripsina e “clean up/desalting” das amostras. As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo LTQ Orbitrap ELITE (Thermo-Finnigan) acoplado a um sistema de cromatografia de nanoflow (LC-MS/MS), obtendo-se o proteoma total da cabeça dos espermatozoides. Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo “Computational Proteomics Analysis System – CPAS”. Para obter um número representativo da quantidade de cada proteína em cada amostra, foi realizada uma normalização das análises, transformando-se o número de peptídeo de cada proteína em porcentagem do número total de peptídeo encontrado na amostra. Para identificação de possíveis marcadores proteicos de fertilidade, foi realizada análise estatística (ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, significância com $p \leq 0,05$) para identificar as proteínas em maior quantidade nos animais altamente férteis (resultados satisfatórios no exame andrológico e na Produção *in vitro* de Embriões) quando comparados com os subférteis (resultados não satisfatórios no exame andrológico e na Produção *in vitro* de Embriões).

Resultados e Discussão - Foram identificadas 766 diferentes proteínas, sendo que 20 delas foram encontradas em maior quantidade em touros altamente férteis quando comparado a touros subférteis. São elas em ordem decrescente de significância estatística: “Keratin, type II cytoskeletal 71 kDa” ($p=0,00075$), “Plasma serine protease inhibitor” ($p=0,00090$), “60S ribosomal protein L9” ($p=0,00098$), “Protein FAM71D” ($p=0,0034$), “Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit” ($p=0,0039$), “Keratin, type I cytoskeletal 10 kDa” ($p=0,0065$), “cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha” ($p=0,0087$), “Histone H2A.J” ($p=0,0091$), “Acyl-protein thioesterase 1” ($p=0,011$), “Keratin, type II cytoskeletal 59 kDa” ($p=0,014$), “40S ribosomal protein S8” ($p=0,015$), “Beta-nerve growth factor” ($p=0,015$), “Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B beta isoform” ($p=0,021$), “Cilia- and flagella-associated protein 20 kDa” ($p=0,022$), “Malate dehydrogenase, mitochondrial” ($p=0,037$), “Proteasome subunit alpha type-6” ($p=0,041$), “Seminal plasma protein A3” ($p=0,043$), “Secretoglobin family 1D member” ($p=0,046$), “Histone H2B

subacrosomal variant”, (p=0,049), “Outer dense fiber protein 1” (p=0,050). Estas proteínas possuem grande potencial para serem utilizadas como marcadores proteicos de fertilidade, necessitando novos trabalhos para validação desta hipótese.

Considerações Finais - Dentre as 20 proteínas associadas a fertilidade, a “Keratin, type II cytoskeletal 71 kDa”, “Plasma serine protease inhibitor” e “60S ribosomal protein L9” são as de maior potencial (menores valores de p) para serem utilizadas como marcador proteico de fertilidade de touros.

Referências bibliográficas

[1] Cui Z, Sharma R, Proteomic analysis of mature and immature ejaculated spermatozoa from fertile men. *AJA*. 2016; 18: 735-746.

Agradecimentos: Agradecemos a FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Proteínas espermáticas que influenciam a fertilização *in vitro* em bovinos

Marcelo Emílio Beletti¹

mebeletti@ufu.br

Muller Carrara Martins¹

Lucas Melo Gonçalves¹

Pollyanne G. M. Cunha¹

Romualdo Morandi-Filho¹

Amanda Nonato¹

Ricardo Tomaz da Silva¹

Abstract: The objective of this study was to identify sperm proteins that, when in greater quantity, influence the fertilization process of bovine oocytes. Eight samples of frozen semen of different ejaculates from four Girolando bulls were used, two highly fertile and two subfertile animals. The sperm nuclei were isolated and the protein content was evaluated by advanced mass spectrometry. The same ejaculates were used to perform *in vitro* embryo production routines (IVEP). For the identification of sperm proteins that positively or negatively are associated with the fertilization process, the Pearson correlation test was performed between the amount of each protein and the cleavage rate. A total of 766 different proteins were identified in the spermatozoa of the samples, five of which had a positive correlation coefficient with the cleavage rate and another five had a negative correlation coefficient, that is, five proteins are associated positively the fertilization process and five other proteins are associated negatively. The proteins that positively are associated with the fertilization process were Seminal plasma protein A3, Beta-nerve growth factor, Lingual antimicrobial peptide, Calicin and Acyl-protein thioesterase 1, and the other five proteins that negatively are associated with the fertilization process were Transitional endoplasmic reticulum ATPase, NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 5, NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3, Cytochrome c oxidase subunit 2 and Prohibitin-2.

Keywords: proteome; spermatozoon; bull; cleavage rate.

Palavras-chave: proteoma; espermatozoide; touro; taxa de clivagem.

Introdução - Como modo de aumentar a eficiência da bovinocultura, vem sendo utilizadas biotecnologias, principalmente aplicadas à reprodução animal. Dentre essas biotécnicas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem tido um papel importante nesse processo, ao possibilitar a produção de um número maior de bezerros por vaca de alto potencial genético em um menor período de tempo. Entretanto, o processo de PIVE é extremamente custoso e possui baixa eficiência no aproveitamento de ovócitos. Uma das etapas da PIVE que ainda necessita de aperfeiçoamento é o processo de fertilização *in vitro*[1]. O espermatozoide é uma

¹ Universidade Federal de Uberlândia.

célula haploide com muito pouco citoplasma, que até pouco tempo, acreditava-se ter como única função levar o conteúdo genético masculino até o ovócito no início da tuba uterina. Hoje sabe-se que além do genoma masculino, o espermatozoide carrega sinais epigenéticos situados no DNA (metilação), em proteínas histônicas e microRNAs [2]. Muitos são os fatores que podem interferir no processo de fecundação e entre eles estão proteínas encontradas no espermatozoide. Com intuito de fornecer informações que possam ser utilizadas na melhoria da fertilização *in vitro*, objetivou-se com este estudo identificar proteínas espermáticas que quando em maior quantidade influenciem o processo de fecundação de ovócitos bovinos.

Material e Métodos - Foram utilizadas oito amostras de sêmen congelado de diferentes ejaculados oriundas de quatro touros girolando, sendo dois altamente férteis e dois subférteis. Todas as amostras foram utilizadas em rotinas de produção *in vitro* de embriões, sendo utilizados 419 ovócitos para os touros férteis e 336 para os subférteis. Foi calculada a taxa de clivagem de todas as amostras após 48 horas do processo de fertilização, ou seja, a porcentagem de ovócitos que iniciaram a clivagem. Para a avaliação proteômica, as cabeças dos espermatozoides foram isoladas por sonicação e ultracentrifugação. As membranas dos espermatozoides foram degradadas por banhos em solução contendo triton X100 e a cromatina foi descondensada por tampão contendo 1,4-ditiotreitol (DTT). Posteriormente o material foi tratado com DNase e RNase. Finalmente as amostras passaram por redução e alquilação das proteínas, digestão enzimática das proteínas com tripsina e “clean up/desalting” das amostras. As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo LTQ Orbitrap ELITE (Thermo-Finnigan) acoplado a um sistema de cromatografia de nanoflow (LC-MS/MS), obtendo-se o proteoma total da cabeça dos espermatozoides. Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo “Computational Proteomics Analysis System – CPAS”. Para obter um número representativo da quantidade de cada proteína em cada amostra, foi realizada uma normalização das análises, transformando-se o número de peptídeo de cada proteína em porcentagem do número total de peptídeo encontrado na amostra. Para identificação das proteínas espermáticas que influenciaram positivamente ou negativamente o processo de fecundação, foi realizado o teste de correlação de Pearson entre a quantidade de cada proteína encontrada nas amostras com a taxa de clivagem obtidas nas rotinas de PIVE. Aquelas proteínas que apresentaram coeficiente de correlação negativo e com valor de $p \leq 0,05$ foram consideradas como tendo influência negativa no processo de fecundação e as com coeficiente de correlação positivo ($p \leq 0,05$) foram consideradas como tendo influência positiva no processo de fecundação.

Resultados e Discussão – As PIVEs dos animais férteis apresentaram 53,2% de taxa de clivagem e 50,2% de taxa de blastocistos. Já os animais subférteis apresentaram 35,1% de taxa de clivagem e 3,4% de taxa de blastocisto. Foram identificadas 766 diferentes proteínas nos espermatozoides das amostras, sendo que apenas cinco delas apresentaram coeficiente de correlação negativo significativo com a taxa de clivagem. São elas em ordem decrescente de significância estatística: “Transitional endoplasmic reticulum ATPase” ($r = -0,99$, $p = 0,0025$), “NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5” ($r = -0,99$, $p = 0,0036$),

“NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3” ($r=-0,99$, $p=0,0037$), “Cytochrome c oxidase subunit 2” ($r=-0,99$, $p=0,0092$) e “Prohibitin-2” ($r=-0,98$, $p=0,017$). Outras cinco proteínas apresentaram coeficiente de correlação positivo significativo com a taxa de clivagem. São elas em ordem decrescente de significância estatística: “Seminal plasma protein A3” ($r=0,99$, $p=0,014$), “Beta-nerve growth factor” ($r=0,99$, $p=0,015$), “Lingual antimicrobial peptide” ($r=0,98$, $p=0,017$), “Calicin” ($r=0,97$, $p=0,029$) e “Acyl-protein thioesterase 1” ($r=0,95$, $p=0,048$). Dentre as cinco proteínas que apresentaram correlação com a taxa de clivagem, a “NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3”, a “Prohibitin-2”, a “Lingual antimicrobial peptide” e a “Calicin” não foram encontradas em quantidades significativamente diferentes nas amostras de touros férteis e subférteis. A taxa de clivagem estaria diretamente, mas não de forma absoluta, relacionada com a fertilização do ovócito. Esta relação não é absoluta, pois existem ovócitos não fertilizados que iniciam a clivagem. Mesmo assim, pode-se inferir que a presença destas proteínas em grande quantidade nos espermatozoides influencia o processo de fertilização *in vitro*. As taxas de blastocisto poderiam corrigir o problema causado por clivagem em ovócitos não fecundados, no entanto, a grande diferença entra as taxas de clivagem e blastocistos encontradas nos animais subférteis, são mais sugestivas de problemas espermático que não interferem no processo de fecundação, mas interferem no desenvolvimento embrionário, como por exemplo, alterações de cromatina leves [2].

Referências bibliográficas

- [1] Mello RRC, Ferreira JE, Sousa SLG, Mello MRB, Palhano HB. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. Revista Brasileira de Reprodução Animal 2016, 40:58-64.
- [2] Beletti M. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. Revista Brasileira de Reprodução Animal 2013, 37:92-96.

Agradecimentos: Agradecemos a FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Proteínas espermáticas que influenciam o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos

Marcelo Emílio Beletti¹

mebeletti@ufu.br

Muller Carrara Martins¹

Lucas Melo Gonçalves¹

Pollyanne G. M. Cunha¹

Romualdo Morandi-Filho¹

Amanda Nonato¹

Ricardo Tomaz da Silva¹

Abstract: The objective of this study was to identify sperm proteins that in some way influence the early embryonic development. Eight samples of frozen semen of different ejaculates from four Girolando bulls were used, two highly fertile and two subfertile animals. The sperm nuclei were isolated and the protein content was evaluated by advanced mass spectrometry. The same ejaculates were used to perform in vitro embryo production routines (IVEP). For the identification of sperm proteins that positively or negatively influenced the embryonic development, the Pearson correlation test was performed between the amount of each protein and the blastocyst rate. A total of 766 different proteins were identified in the spermatozoa of the samples, 14 of which had a positive correlation coefficient with the blastocyst rate and another eight had a negative correlation coefficient, that is, 14 proteins influenced positively the early embryonic development and eight other proteins influenced negatively. The top five proteins that positively influenced the embryonic development were Spermatogenesis-associated protein 6, Serine racemase, 60S ribosomal protein L9, Protein FAM71D and Plasma serine protease inhibitor. The top five proteins that negatively influenced the embryonic development were 40S ribosomal protein S7, 60S ribosomal protein L12, DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2, Activated CDC42 kinase 1 and Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2.

Keywords: proteome; spermatozoon; embryo; blastocyst rate.

Palavras-chave: proteoma; espermatozoide; embrião; taxa de blastocisto.

Introdução - Espermatozoides são caracterizados como células altamente diferenciadas e compartimentalizadas, incapazes de sintetizar proteínas. No entanto, proteínas incorporadas ao espermatozoide durante a espermatogênese podem interferir no desenvolvimento embrionário inicial, já que ao contrário do que muitos imaginam, quase todo o conteúdo do espermatozoide, incluindo cauda e cabeça, penetra no ovócito durante o processo de fecundação [1]. Pouco se sabe sobre o conteúdo proteico da matriz nuclear do espermatozoide e menos ainda da influência destas proteínas sobre o desenvolvimento embrionário inicial. Mesmo assim, acredita-se na capacidade das proteínas espermáticas em interferir no metabolismo celular do zigoto e

¹ Universidade Federal de Uberlândia.

exercer papel regulatório, no desenvolvimento embrionário inicial, principalmente por meio de proteínas presentes na matriz espermática [2]. Portanto, é clara a necessidade do estudo mais aprofundado das proteínas presentes no espermatozoide para que seja possível esclarecer quais proteínas estão presentes e como atuam na fertilização, viabilidade do embrião e desenvolvimento embrionário inicial. Objetivou-se com este estudo identificar proteínas espermáticas que de alguma maneira influenciem o desenvolvimento embrionário inicial.

Material e Métodos - Metodologia

Foram utilizadas oito amostras de sêmen congelado de diferentes ejaculados oriundas de quatro touros girolando, sendo dois altamente férteis (cobertura natural com menos de 20% de taxa de retorno e PIVE com mais de 45% de taxa de blastocistos) e dois subférteis (cobertura natural com mais de 50% de taxa de retorno e PIVE com menos de 20% de taxa de blastocistos). Todas as amostras foram utilizadas em rotinas de produção *in vitro* de embriões. Foi calculada a taxa de formação de blastocisto de todas as amostras no sétimo dia após o processo de fertilização, ou seja, a porcentagem de estruturas que iniciaram a clivagem e atingiram a forma de blastocisto morfológicamente normal. Para a avaliação proteômica, as cabeças dos espermatozoides foram isoladas por sonicação e ultracentrifugação. As membranas dos espermatozoides foram degradadas por banhos em solução contendo Triton X100 e a cromatina foi descondensada por tampão contendo 1,4-ditiotreitol (DTT). Posteriormente o material foi tratado com DNase e RNase. Finalmente as amostras passaram por redução e alquilação das proteínas, digestão enzimática das proteínas com tripsina e “clean up/desalting” das amostras. As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo LTQ Orbitrap ELITE (Thermo-Finnigan) acoplado a um sistema de cromatografia de nano-flow (LC-MS/MS), obtendo-se o proteoma total da cabeça dos espermatozoides. Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo “Computational Proteomics Analysis System – CPAS”. Para obter um número representativo da quantidade de cada proteína em cada amostra, foi realizada uma normalização das análises, transformando-se o número de peptídeo de cada proteína em porcentagem do número total de peptídeo encontrado na amostra. Para identificação das proteínas espermáticas que influenciaram positiva ou negativamente o desenvolvimento embrionário, foi realizado o teste de correlação de Pearson entre a quantidade de cada proteína encontrada com a taxa de blastocisto. A taxa de blastocisto calculada considerando o número total de ovócitos utilizados desde a maturação ovocitária representa indiretamente a fertilidade do animal, pois é influenciada pelo processo de fertilização propriamente dito e pelo desenvolvimento embrionário inicial. Aquelas proteínas que apresentaram coeficiente de correlação positivo e com valor de $p \leq 0,05$ foram consideradas como tendo associação positiva no desenvolvimento embrionário inicial e aquelas que apresentaram coeficiente de correlação negativo e com valor de $p \leq 0,05$ foram consideradas como tendo associação negativa no desenvolvimento embrionário inicial.

Resultados e Discussão - Foram identificadas 766 diferentes proteínas nos espermatozoides das amostras, sendo que 14 delas apresentaram coeficiente de correlação positiva significativo

com a taxa de blastocisto. São elas em ordem decrescente de significância estatística: “Spermatogenesis-associated protein 6” ($r=0,99$, $p=0,0021$), “Serine racemase” ($r=0,99$, $p=0,0066$) “60S ribosomal protein L9” ($r=0,99$, $p=0,0079$), “Protein FAM71D” ($r=0,99$, $p=0,0091$), “Plasma serine protease inhibitor” ($r=0,99$, $p=0,99$, $p=0,011$), “Signal peptidase complex subunit 3” ($r=0,99$, $p=0,013$), “40S ribosomal protein S8” ($r=0,98$, $p=0,016$), “T-complex protein 1 subunit gamma” ($r=0,98$, $p=0,017$), “cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha” ($r=0,98$, $p=0,028$), “Acyl-protein thioesterase 1” ($r=0,097$, $p=0,030$), Coiled-coil domain-containing protein 63 kDa” ($r=0,96$, $p=0,042$), “Beta-nerve growth factor” ($r=0,96$, $p=0,043$), “Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial” ($r=0,95$, $p=0,045$) e “Histone H2A.J” ($r=0,95$, $p=0,049$). Outras oito proteínas apresentaram coeficiente de correlação negativo significativo com a taxa de blastocisto. São elas em ordem decrescente de significância estatística: “40S ribosomal protein S7” ($r=-0,98$, $p=0,015$), “60S ribosomal protein L12” ($r=-0,97$, $p=0,035$), “DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2” ($r=-0,97$, $p=0,035$), “Activated CDC42 kinase 1” ($r=-0,97$, $p=0,035$), “Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2” ($r=-0,97$, $p=0,035$), “Acetyl-CoA acetyltransferase” ($r=-0,96$, $p=0,037$), “Heat shock protein beta-9” ($r=-0,096$, $p=0,040$), “Limbin” ($r=-0,96$, $p=0,045$). Das 14 proteínas com correlação positiva com a taxa de blastocisto, oito (“60S ribosomal protein L9”, Protein FAM71D”, “Plasma serine protease inhibitor”, “40S ribosomal protein S8”, “cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha”, “Acyl-protein thioesterase 1”, “Beta-nerve growth factor”, “Histone H2A.J) estavam entre as proteínas mais encontradas nos animais férteis e das oito proteínas com correlação negativa com a taxa de blastocisto, quatro (“40S ribosomal protein S7”, “60S ribosomal protein L12”, “Acetyl-CoA acetyltransferase”, “Heat shock protein beta-9”) estavam entre as proteínas mais encontradas nos animais subférteis. O fato de nem todas as proteínas encontradas expressas diferentemente nos animais férteis e subférteis terem correlação com a taxa de blastocisto, corrobora com o fato da fertilidade do touro ser afetada por fatores que influenciam diretamente o processo de fertilização e por fatores que influenciam o desenvolvimento embrionário. O presente trabalho identificou proteínas correlacionadas apenas com o desenvolvimento embrionário inicial. Ou seja, a presença destas proteínas em grande quantidade nos espermatozoides pode interferir diretamente no desenvolvimento embrionário inicial ou pode ser um indicativo de algum problema espermático que interfira nesta etapa do desenvolvimento, ou seja, é um marcador molecular de um problema espermático que interfere no desenvolvimento embrionário inicial.

Referências bibliográficas

- [1] Gahlawat, S.K., Duhan, J.S., Salar, R.K., Siwach, P., Kumar, S., Kaur, P. *Advances in Animal Biotechnology and its Applications*. 1ed. Springer: Zurich, 2018.
- [2] Ashrafzadeh A, Karsani SA, Nathan S. Mammalian sperm fertility related proteins. *International Journal of Medical Sciences* 2013, 10:1649-1657.

Agradecimentos: Agradecemos a FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Viabilidade *in vitro* do sêmen ovino criopreservado com dimetilformamida como substituto total ou parcial do glicerol

Renata Oliveira Barreto¹
renata.obrt@hotmail.com

Rodrigo Freitas Bittencourt¹
rfb@ufba.br

Gabriel Felipe Oliveira de Menezes¹

Isabella de Carneiro Brandão¹

Elton Amorim Romão¹

Gleice Mendes Xavier¹

Isabela Costa Vasconcelos¹

Adrielle da Silva Lima¹

Maicon Pereira Lents¹

Elisiane Sateles dos Santos¹

Abstract: Twenty five ejaculates from five Santa Ines rams were cryopreserved with dimethylformamide (DMF) with or without association with glycerol (GL) in the following concentrations: G1: GL6%; G2: DMF3%; G3: GL5% + DMF1%; G4: GL4% + DMF2%; G5: GL3% + DMF3%; G6: GL2% + DMF4%; G7: GL1% + DMF5%. The spermatic kinetics parameters were evaluated through a computer analysis system, as well as for the structural integrity of the plasma membrane via flow cytometry, using the probes carboxyfluorescein diacetate (DIC) and propidium iodide (IP). Statistical difference was only demonstrated in between treatments G7 and G4 ($P>0.05$) at the structural integrity evaluation, but those did not differ from the other groups. The results indicate that the dimethylformamide is an efficient substitute of glycerol in all concentrations tested, although it is not able to overcome the negative effects caused by it in the cryopreservation of ovine semen.

Keywords: ovine; cryoprotectants, sperm; CASA.

Palavras-chave: ovinos, crioprotetores, espermatozoides, CASA.

Introdução – Entre os fatores que interferem com o sucesso de um protocolo de criopreservação, destaca-se o emprego de um crioprotetor eficiente e na concentração adequada [1]. O glicerol (GL) é um crioprotetor muito utilizado na congelação do sêmen ovino, evitando a formação de cristais de gelo intracelular. Porém, ocasiona efeitos negativos na avaliação pós-descongelação, relacionados ao estresse osmótico, mudanças na organização, *fluidez* e permeabilidade da membrana plasmática e desorganização da sua composição lipídica [2]. Esse fato tem incentivado pesquisas com outros crioprotetores, entre eles o grupo das amidas, que apresentam menor vis-

¹ Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

cosidade e peso molecular em relação ao glicerol, diminuindo o estresse osmótico ao espermatozoide. A dimetilformamida é um composto que foi testado em equinos [3], coelhos [1] e ovinos [4]. Objetivou-se neste trabalho avaliar os efeitos sobre a cinética e integridade de membrana espermática pós-descongelamento na utilização da dimetilformamida para a criopreservação do sêmen ovino em substituição total ou parcial ao glicerol, em diferentes concentrações.

Material e Métodos – Foram obtidos para 25 ejaculados a partir da colheita por vagina artificial de 5 ovinos da raça Santa Inês. Cada ejaculado foi dividido e submetido a todos os tratamentos, sendo diluídos em um meio-base de Tris-gema acrescido de DMF e/ou GL a diferentes concentrações de acordo com os grupos experimentais delineados: Grupo 1- GL a 6% (controle); Grupo 2- DMF 3%; Grupo 3- GL a 1% e DMF a 5%; Grupo 4- GL a 2% e DMF a 4%; Grupo 5- GL a 3% e DMF 3%; Grupo 6- GL a 4% e DMF a 2%; Grupo 7- GL a 5% e DMF a 1%. Os ejaculados foram envasados em palhetas de 0,25mL com concentração de 100×10^6 spz por palheta, e foram então resfriadas, congeladas, raqueadas e armazenadas em botijão de sêmen até o momento da descongelamento.

A cinética espermática foi avaliada a partir da análise computadorizada de sêmen (CASA, Microptics, S.L. Versão 5.1, Barcelona, Espanha), com *set-up* para ovinos. Uma alíquota do sêmen foi diluída em tampão fosfato-salino – PBS, até se obter uma diluição final de aproximadamente 48×10^6 spz/mL. Após cinco a dez minutos de incubação (37°C), 5 µL do sêmen diluído foram analisados no microscópio entre lâmina e lamínula, sob aumento de 100x. Foram avaliados os parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e progressiva (MP), velocidades curvilínea (VCL), do percurso médio (VAP) e em linha reta (VSL), deslocamento lateral de cabeça (ALH), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e hiperatividade (HYPERACT).

A avaliação de integridade estrutural de membrana plasmática, feita através do citômetro de fluxo (BD FACSCalibur®, BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA), foi realizada utilizando-se duas sondas fluorescentes: o diacetato de carboxifluoresceína (DIC, 21879, Sigma Aldrich) e iodeto de propídeo (IP, P4170, Sigma Aldrich), em uma solução de trabalho composta por PBS (200µL de sêmen diluído na concentração de 2×10^6 spz/mL), DIC na concentração final de 20,0µM e IP na concentração final de 15µM. Foram adicionados, 5µL de IP e 5µL de DIC. Os espermatozoides DIC+/IP- foram classificados como não lesados e os DIC+/IP+, DIC-/IP+ e DIC-/IP- como lesados.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, onde os ejaculados foram considerados repetições e os protocolos de processamento do sêmen foram considerados tratamentos. A média e desvio padrão das variáveis foram obtidas por análise descritiva. Os dados foram processados pelo Pacote estatístico SAS, Versão 9.0 (2002). Foi feita análise de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo Kruskal-Wallis e as normais pelo teste SNK. O índice de significância utilizado foi de 5%.

Resultados e Discussão – Na Tabela 1 encontram-se as médias e desvios padrão das variáveis analisadas pelo sistema de análise computadorizada de sêmen de acordo com cada gru-

po experimental. Ao comparar os parâmetros de cinética espermática avaliados, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

Tabela 1. Médias e desvios padrão de motilidade total (MT) e progressiva (MP), velocidades curvilínea (VCL), do percurso médio (VAP) e em linha reta (VSL), deslocamento lateral de cabeça (ALH), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e hiperatividade (HYPER) de sêmen ovino criopreservado com diferentes concentrações de glicerol e dimetilformamida.

VARIÁVEL	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
MT (%)	43,7 ± 23,5	35,2 ± 24,4	44,4 ± 26,7	47,6 ± 27,9	48,9 ± 27,0	49,9 ± 29,5	36,5 ± 27,7
MP (%)	6,7 ± 3,9	4,9 ± 4,5	8,1 ± 6,3	8,0 ± 4,6	8,7 ± 5,4	8,5 ± 4,8	4,9 ± 4,1
VCL (µm/s)	56,7 ± 14,5	54,5 ± 16,5	58,9 ± 12,0	56,9 ± 14,0	57,0 ± 13,6	55,0 ± 20,6	45,7 ± 15,2
VSL (µm/s)	22,9 ± 8,7	20,5 ± 9,3	23,4 ± 6,9	22,7 ± 8,0	24,1 ± 8,7	21,6 ± 8,3	17,2 ± 8,3
VAP (µm/s)	33,9 ± 10,1	31,3 ± 10,9	34,4 ± 7,4	33,4 ± 9,1	34,2 ± 10,4	31,8 ± 12,2	25,8 ± 10,1
LIN (%)	39,7 ± 8,6	36,7 ± 10,2	39,6 ± 8,75	39,4 ± 7,3	41,6 ± 8,6	38,1 ± 9,5	36,3 ± 6,9
STR (%)	66,2 ± 7,6	63,6 ± 13,0	67,0 ± 8,2	66,9 ± 7,2	69,6 ± 6,9	69,7 ± 9,5	65,0 ± 7,5
ALH (µm)	3,7 ± 0,7	3,7 ± 0,9	3,9 ± 0,6	3,8 ± 0,7	3,8 ± 1,0	3,9 ± 1,0	3,5 ± 0,7
BCF (Hz)	9,3 ± 2,2	10,1 ± 1,8	10,1 ± 1,8	9,5 ± 1,7	9,9 ± 2,6	9,6 ± 2,7	9,2 ± 1,9
HYPER (%)	4,8 ± 3,6	4,9 ± 3,6	4,9 ± 3,6	5,1 ± 3,4	5,9 ± 3,9	5,4 ± 3,5	3,0 ± 2,7

G1: GL6%; G2: DMA3%; G3: GL5%+DMA1%; G4: GL4%+DMA2%; G5: GL3%+DMA3%; G6: GL2%+DMA4%; G7: GL1%+DMA5%

Na avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática espermática, foi observada diferença entre os grupos G4 e G7 ($P < 0,05$). E estes grupos não diferiram quando comparados aos demais ($P > 0,05$), como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de integridade de membrana plasmática de sêmen ovino criopreservado com diferentes concentrações de glicerol e dimetilformamida avaliado em citometria de fluxo.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
LESADOS (%)	77,1 ± 9,8 ^{ab}	75,5 ± 15,2 ^{ab}	76,7 ± 9,4 ^{ab}	70,9 ± 13,6 ^a	77,1 ± 10,6 ^{ab}	77,7 ± 13,5 ^{ab}	85,0 ± 9,2 ^b
NÃO LESADOS (%)	16,6 ± 8,3 ^{ab}	17,9 ± 14,8 ^{ab}	17,3 ± 8,3 ^{ab}	26,6 ± 13,0 ^a	16,3 ± 9,2 ^{ab}	15,9 ± 13,2 ^{ab}	8,5 ± 8,5 ^b

G1: GL6%; G2: DMA3%; G3: GL5%+DMA1%; G4: GL4%+DMA2%; G5: GL3%+DMA3%; G6: GL2%+DMA4%; G7: GL1%+DMA5%; Não lesados: DIC+/IP-; Lesados: DIC+/IP+, DIC-/IP+ e DIC-/IP-

Os impactos do menor estresse osmótico no sêmen para os tratamentos com DMA esperados não foram observados nesse estudo, visto que os parâmetros de cinética espermática não diferiram entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). No entanto, a utilização da amida ou

sua associação ao GL não ocasionaram efeitos deletérios sobre as células espermáticas nas avaliações realizadas. Os baixos valores encontrados na avaliação da MP são atribuídos à configuração do *software* que tem parâmetros fixos para a classificação do padrão de movimento dos SPTZ, porém todos os tratamentos foram submetidos à mesma configuração, padronizando a avaliação e seus resultados.

O alto percentual de membranas lesadas se dá pela crioinjúria natural a esse processo, sendo comum em outros trabalhos similares e não estando necessariamente relacionados aos tratamentos empregados [5]. Apesar de não haver diferença entre os grupos na análise de cinética espermática, a avaliação da integridade estrutural da membrana demonstrou disparidades. Esse efeito pode ser explicado pelo fato de que espermatozoides lesionados podem manter capacidade móvel, o que demonstra a importância de analisar mais de um parâmetro do sêmen para determinar sua viabilidade [6]. A diferença encontrada entre G4 e G7 pode ser atribuída a um melhor equilíbrio entre as concentrações de DMF e GL que refletiu nos melhores parâmetros de manutenção da viabilidade celular no grupo GL a 4% + DMF a 2%. Estudos posteriores se fazem necessários para determinar a extensão desse efeito de melhor sinergia das concentrações de GL e DMF empregadas.

Considerações Finais – Meios diluidores para a criopreservação espermática contendo DMF nas concentrações empregadas nesse estudo são eficientes na crioproteção do SPTZ nesse processo.

Referências bibliográficas

- [1] Bittencourt, R. F., Oba, E., Ribeiro Filho, A. D. L., Chalhoub, M., Azevedo, H. C., & Bicudo, S. D. (2013). Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. *Ciência Animal Brasileira*, 14(4), 522-536.
- [2] Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871-891.
- [3] Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal reproduction science*, 89(1-4), 105-113.
- [4] BITTENCOURT, R., RIBEIRO FILHO, A. L., MENEZES, G., ANDRADE, R., MASCARENHAS, L., FERRAZ, P., ... & CHALHOUB, M. (2011). Associação dos crioprotetores dimetilformamida e glicerol para criopreservação do sêmen ovino. *XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões-SBTE*, 335.
- [5] Bittencourt, R. F., Oba, E., de Almeida Biscarde, C. E., Azevedo, H. C., Bittencourt, M. V., de Menezes, G. F. O., ... & de Lisboa Ribeiro Filho, A. (2018). Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation. *Cryobiology*, 85, 1-6.
- [6] Morrell, J. M. (1991). Applications of flow cytometry to artificial insemination: a review. *The Veterinary Record*, 129(17), 375-378.

Agradecimentos: Fundação Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Aspectos relacionados ao procedimento de inseminação artificial que podem afetar a taxa de concepção

Leticia Zoccolaro Oliveira¹

leticiazo@vet.ufmg.br

Ana Carolina Bahia Teixeira¹

Juliana Horta Wutke Diniz¹

Deborah Freitas Silva¹

Dara Miranda Castro¹

Amanda Guimarães da Silva²

André Luis Rios Rodrigues²

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effect of difficulty for insemination on conception rate (CR), as well as the time required to perform artificial insemination (AI) in Nellore cows. All animals (n=165) were submitted to the same timed-AI protocol. On the day of AI, a score (from 1 to 3) was given for insemination difficulty (Dif.AI) and the time to perform the AI procedure was recorded. Statistical tendency for higher ($P<0.10$) CR was observed in animals that did not present any insemination difficulties (Dif.AI1; TP=42%) compared to animals with moderate or high difficulty for AI (Dif.IA2+Dif.IA3; TP=27%). The time required for completing AI procedure was lower ($P<0.05$) in animals classified as Dif. AI 1 ($17:31\pm 06:02$ sec) compared to animals classified as Dif.AI2-3 ($30:10\pm 15:45$ sec). It was concluded that higher difficulty and/or time required for completing the AI procedure may be a potential factor for fertility reduction in timed-AI programs.

Keywords: bovine; fertility; IATF.

Palavras-chave: bovinos; fertilidade; IATF.

Introdução – Diversas são as variáveis que podem influenciar a taxa de concepção da inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Dentre elas, podem ser destacadas o escore de condição corporal (ECC) da fêmea, o padrão racial e/ou a categoria animal (Peres et al., 2009; Sartori et al., 2016), o grau de expressão de estro e/ou tamanho do corpo lúteo formado (Perry et al., 2007; Mesquita et al., 2014), o touro, a partida e/ou o manejo de palhetas (Oliveira et al., 2012). Assim, além da variação de resposta da fêmea perante ao protocolo hormonal utilizado, esses fatores podem explicar as inúmeras variações de resultados observadas nos programas reprodutivos. Adicionalmente, embora seja notório que alguns aspectos relacionados ao procedimento de inseminação artificial podem afetar a taxa de concepção, estes não costumam ser pontuados. Neste sentido, a dificuldade para se completar o procedimento de inseminação poderia ser um outro fator de influência na fertilidade durante a realização da

¹ Escola de Veterinária, UFMG

² Faculdade de Veterinária, UFF

IATF, visto que algumas fêmeas bovinas podem apresentar cérvix mais tortuosa e/ou estreita que outras. Assim sendo, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da dificuldade de inseminação artificial (Dif.IA) sobre a taxa de concepção, bem como o tempo necessário para a realização do procedimento de inseminação artificial (IA) em fêmeas Nelore submetidas a um protocolo de IATF, de modo a verificar se estes fatores interferem nas taxas de concepção a campo desses programas reprodutivos.

Material e Métodos - Este estudo foi conduzido em uma fazenda comercial de gado de corte, onde foram coletados os dados de inseminações para primeiro serviço de 165 fêmeas bovinas da raça Nelore (Protocolo CEUA UFF 884/2016). Todas as fêmeas receberam o mesmo protocolo de IATF descrito por Peres et al. (2009). O protocolo hormonal se iniciou (D0) com as vacas recebendo um dispositivo intravaginal contendo progesterona (P4; CIDR, Zoetis Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e uma injeção intramuscular (IM) de 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol, Zoetis Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Sete dias após (D7), os animais receberam 25 mg (IM) de Prostaglandina F_{2α} (Dinoprost trometamina; Lutalyse Zoetis Saúde Animal, São Paulo, Brasil). O dispositivo de P4 foi removido no dia 9 (D9), quando os animais receberam injeções de 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Novormon 5000 UI, Zoetis Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 0,5 mg de cipionato de estradiol (ECP, Zoetis Saúde Animal, São Paulo, Brasil), ambos pela via IM. Dois dias após a remoção do dispositivo (ou seja, no D11), os animais foram inseminados (IATF). Em todas essas fêmeas, foram utilizadas doses de sêmen de quatro touros da raça Angus, aleatoriamente distribuídos nos dias de IA, de forma equiparada. Para a realização das inseminações, dois experientes inseminadores intercalaram-se entre si a cada animal que passava pelo tronco de contenção (brete). Todos os procedimentos de campo envolvendo este estudo foram realizados em um curral bem estruturado e coberto.

No dia da IATF (D11), foram anotados número do animal, ECC, inseminador, touro e número da partida de sêmen. Adicionalmente, no D11, cada animal recebeu uma nota de dificuldade de inseminação (Dif.IA) e o tempo decorrido para se completar cada inseminação (tempo de IA) foi cronometrado.

A nota de Dif.IA foi definida pelo próprio inseminador, sendo avaliada de 1 a 3. A nota 1 (Dif.IA 1) correspondeu ao procedimento de transposição da cérvix para a realização da IA com extrema facilidade (ou seja, ausência de dificuldade para se completar a inseminação). A nota 2 (Dif.IA 2) correspondeu ao procedimento de transposição da cérvix com dificuldade moderada, e a nota 3 (Dif.IA 3) correspondeu a um procedimento de transposição da cervix com alto grau de dificuldade para se completar a inseminação. Durante esse momento, o tempo necessário para se completar a inseminação (tempo de IA) também foi aferido com cronômetro zerado. A contagem do cronômetro foi iniciada no momento da inserção do aplicador de sêmen no vestíbulo vaginal do animal. Tal cronometragem foi finalizada no momento em que o aplicador foi retirado do trato reprodutivo da fêmea (já sem a presença de sêmen em seu interior), sendo completamente removido do limite definido pela vulva do animal.

Aos 40 dias após as inseminações, a gestação foi diagnosticada com ultrassonografia transretal, por meio de transdutor linear (7.5 MHz).

Diferenças estatísticas foram analisadas por regressão logística utilizando procedimento GLIMMIX do SAS (SAS, 2001). As variáveis (médias \pm desvio padrão) foram comparadas por análise de variância (teste de Tukey). Nas análises estatísticas, considerou-se $P > 0,05$ e $< 0,10$.

Resultados e Discussão – No programa reprodutivo do presente estudo não foi observado efeito de ECC, touro e inseminador sobre a taxa de concepção. Porém, conforme demonstrado na tabela 1, foi observada tendência estatística para maior ($P = 0,0964$) taxa de concepção nos animais em que não existiu dificuldade de IA em comparação aos animais que apresentaram moderada ou alta dificuldade de IA. Adicionalmente, observa-se na tabela 1 que menor tempo ($P < 0,001$) foi necessário para se completar a IA nos animais Dif. IA 1 do que nos animais Dif. IA 2 e 3.

Tabela 1. Taxa de concepção (%) e média (\pm desvio padrão) do tempo de inseminação (tempo de IA) em fêmeas bovinas da raça Nelore submetidas ao mesmo protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo, de acordo com a nota de dificuldade aferida ao se completar o procedimento de inseminação artificial (IA)

Dificuldade de Inseminação	Taxa de Concepção	Tempo de IA
Dif. IA 1	42% (n=143) ^A	17:31 \pm 06:02seg ^a
Dif. IA 2 e 3	27% (n=22) ^B	30:10 \pm 15:45seg ^b

A,B: Letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam $P < 0,10$

a,b: Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam $P < 0,05$

Dif. IA 1 = procedimento de transposição da cérvix para a realização da IA com nenhuma dificuldade;

Dif. IA 2 e 3 = procedimento de transposição da cervix com moderado ou alto grau de dificuldade para se completar a inseminação.

Nas fêmeas bovinas com maior dificuldade de se realizar a inseminação artificial, aumenta-se a chance de deposição da dose inseminante no(s) último(s) anel(éis) cervical(is) e não no corpo do útero. Em bovinos **já** não existem mais dúvidas sobre a vantagem da deposição de sêmen no corpo uterino em comparação à deposição na cérvix. De acordo com Peters et al. (1984), erros de inseminação são comuns, de modo que as inseminações **intracervicais** profundas podem representar mais de 20% das tentativas de deposição do sêmen no corpo uterino, o que pode prejudicar a fertilidade, principalmente quando se utiliza sêmen congelado. A deposição do sêmen dentro do útero proporciona maior sobrevivência do espermatozoide em comparação com a inseminação intracervical e reduz as perdas espermáticas por fagocitose durante a migração uterina (Senger et al., 1988). Adicionalmente, uma interação entre elevada temperatura ambiente e o aumento do intervalo da deposição de sêmen pode ocorrer devido a uma incubação prolongada do sêmen descongelado na palheta (DeJarnette et al., 2002).

Considerações Finais - O presente estudo demonstrou que maior dificuldade e/ou tempo necessário para se completar a IA **são fatores** relacionados ao procedimento de inseminação artificial que podem afetar a taxa de concepção de fêmeas bovinas inseminadas em tempo fixo.

Referências bibliográficas

- [1] Dejarnette JM, Shepard RW, Kaproth MT, Michael NA, Dalton JC, Goodell GM, Lee CN. Effects of sequential insemination number after batch-thawing on conception rates of cryopreserved bovine semen: a review, In: Proceedings of the 19th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, 23–24 August, NAAB, Columbia, Missouri, USA, pp. 102–110.
- [2] Mesquita FS, Pugliesi G, Scolari SC, França MR, Ramos RS, Oliveira M, Papa PC, Bressan FF, Meirelles FV, Silva LA, Nogueira GP, Membrive CM, Binelli M. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology* 2014;81:861-869.
- [3] Oliveira LZ, Arruda RP, Andrade AFC, Santos RM, Beletti ME, Peres RFG, Martins JPN, Hossepian de Lima, VFM. Effect of sequence of insemination after simultaneous thawing of multiple semen straws on conception rate to timed AI in Nelore cows. *Theriogenology* 2012;78:1800-1813.
- [4] Peres RFG, Claro Júnior I, Sá Filho OG, Nogueira GP, Vasconcelos JLM. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 2009; 72:681-689.
- [5] Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, Geary TW. Relationship between size of ovulatory follicle and pregnancy beef heifers. *J Anim Sci* 2007;85:684-689.
- [6] Peters JL, Senger PL, Rosenberger JL, O'Connor ML. Radiographic evaluation of bovine artificial inseminating among professional and herdsman-inseminators using .5- and .25-ml french straws. *J Anim Sci* 1984;59:1671-1683.
- [7] Sartori R, Gimenes LU, Monteiro PL Jr, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology* 2016;86:32-40.
- [8] Senger PL, Becker WC, Davidge ST, Hillers JK, Reeves JJ. Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. *J Anim Sci* 1988;60:3010-3016.

Agradecimentos: CAPES e Zoetis Saúde Animal.

Características seminais e ultrassonografia testicular de touros jovens da raça Nelore dos 14 aos 24 meses de idade

Guilherme Fazan Rossi¹
guilhermemedvet@yahoo.com.br

Naiara Nantes Rodrigues¹
naiara_nantes@hotmail.com

Dayane Priscila Virsman¹

Erika Aline Ribeiro Dias²

Natália Marins Bastos¹

Fábio Morato Monteiro²

Flávia Fernanda Simili²

Roberta Vantini¹

Gisele Zoccal Mingoti³

Joaquim Mansano Garcia¹

Abstract: The objective was to evaluate the growth, seminal and ultrasonographic characteristics of young Nelore bulls from 14 to 24 months of age. Forty-eight Nelore bulls were used. Growth, seminal and ultrasonographic evaluations were performed every 28 days, totaling 12 collections. The data were analyzed by the SAS procedure PROC MIXED. The reproductive and seminal characteristics showed improvement according to the growth and increase of the age of the animals. Thus, from the age of 20 months, these were close to the desired reproductive characteristics.

Keywords: Males; Semen; Ultrasound.

Palavras-chave: Machos, Sêmen; Ultrassom.

Introdução – A puberdade é definida como o surgimento da atividade sexual, revelada pela espermatogênese e interesse sexual [1]. Já, a maturidade sexual é a idade em que o animal atinge o seu máximo potencial reprodutivo, sendo capaz de realizar a cópula e promover a fecundação do oócito [2]. Nos bovinos, o crescimento das gônadas está associado à secreção de esteróides e o perímetro escrotal (PE) apresenta correlação significativa com idade à puberdade e maturidade sexual [3]. Assim, é de suma importância a avaliação das características reprodutivas e seminais dos machos para estimar o desempenho reprodutivo dos mesmos. Neste contexto, a ultrassonografia é uma ferramenta que permite auxiliar o exame andro-

¹ FCAV-UNESP Jaboticabal.

² Instituto de Zootecnia (IZ) de Sertãozinho.

³ FMVA – UNESP Araçatuba.

lógicos nos touros. Segundo Lunstra, Ford e Echternkamp [4], a ecotextura testicular está diretamente associada à maturidade sexual, além de estar correlacionada com a capacidade espermatogênica do órgão, apresentando associação com a área dos túbulos seminíferos. Assim, o objetivo foi avaliar as características de crescimento, seminais e ultrassonográficas de touros jovens da raça Nelore dos 14 aos 24 meses de idade.

Material e Métodos – Foram utilizados 48 touros jovens da raça Nelore. Os animais são provenientes da linha de seleção do Instituto de Zootecnia (IZ). Os touros foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv Marandu, acoplados com bebedouros e cocho de sal mineral ad libitum. As avaliações hormonais (testosterona), crescimento, seminais e ultrassonográficas foram realizadas a cada 28 dias, totalizando 12 coletas. A testosterona total foi quantificada por meio de radioimunoensaio (RIA) utilizando o kit Coat-A-Count® Total Testosterone (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de eletroejaculador. Logo após as colheitas foram avaliados a concentração e morfologia espermática, além das análises da motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP; %) realizados pelo sistema computadorizada da cinética espermática (CASA; Hamilton Thorne Research, IVOS-14, EUA). A ultrassonografia testicular foi realizada pelo aparelho de ultrassom (Mindray Z5, Shenzhen, China) e transdutor linear de 7,5Mhz. As imagens foram analisadas pelo *software* Image Pro Plus versão 7.01 (Media Cybernetics Inc., San Diego, CA, USA), com valores numéricos de pixel em escala de cinza de 0 (preto absoluto) a 255 (branco absoluto), para determinação da ecogenicidade e heterogeneidade do parênquima testicular. Os dados foram analisados por medida repetida no tempo pelo procedimento PROC MIXED do SAS. A significância estatística foi declarada quando $P < 0,05$.

Resultados e Discussão – As características reprodutivas e seminais apresentaram melhora de acordo com o crescimento e aumento da idade dos animais, 14 aos 24 meses de idade (Tabela 1). Foi observado associação inversa entre MT, MP, concentração espermática e testosterona com os defeitos maiores e totais, assim quando houve aumento de motilidade e concentração, os defeitos diminuíram, esta melhora da qualidade espermática ocorreu de acordo com o aumento da idade dos touros e proximidade com a maturidade sexual ($P < 0,001$).

Tabela 1. Características de crescimento, seminais e ultrassonográficas de touros jovens da raça Nelore.

Variáveis de crescimento ¹	Coletas												EPM*	P-valor [#]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Idade (meses)	14,3	15,3	16,2	17,1	18,0	19,0	19,9	20,9	21,8	22,7	23,7	24,6	0,09	<0,001
Peso médio (kg)	388,8	406,8	425,6	451,4	470,9	492,3	500,7	515,7	521,2	527,7	517,7	521,3	4,59	<0,001
ECC (1-9)	6,5	6,1	6,3	6,3	6,4	6,3	6,6	6,2	6,3	5,6	5,4	5,5	0,08	<0,001
Test (ng/mL)	8,3	11,6	8,1	6,4	6,8	8,2	7,1	11,1	13,4	15,9	16,3	22,7	1,48	<0,001
PE (cm)	27,0	28,8	28,5	29,2	30,2	31,1	31,8	32,3	32,3	32,9	32,9	33,6	0,34	<0,001
Avaliação seminal²														
Conc (x 10 ⁶ /ml)	43,6	102,3	140,1	202,5	282,9	359,1	373,4	440,0	479,9	474,2	587,3	644,7	42,09	<0,001
Def. mai (%)	59,4	59,0	53,0	40,8	29,1	19,3	16,6	10,8	10,5	7,3	6,4	9,6	3,18	<0,001
Def. tot (%)	62,3	65,5	57,4	49,7	40,9	35,7	33,2	24,4	19,3	17,7	18,0	15,1	2,94	<0,001
MT (%)	42,0	49,9	64,4	71,5	76,6	78,6	86,2	80,4	85,0	83,9	85,3	82,8	2,91	<0,001
MP (%)	26,1	36,5	47,6	54,7	59,1	62,1	69,1	64,6	68,9	67,6	64,8	62,2	2,61	<0,001
RAP (%)	38,0	46,8	60,3	66,5	71,6	72,8	81,4	75,5	81,3	79,4	81,3	79,8	2,90	<0,001
US³														
Média pixels	116,2	100,2	99,0	92,4	96,6	92,2	85,5	80,1	84,6	86,0	94,0	89,6	4,12	<0,001
Máx pixels	173,5	156,5	146,4	138,1	142,7	137,3	129,8	124,1	128,1	129,9	139,0	133,4	5,19	<0,001
Mín pixels	59,0	47,3	51,3	47,4	51,2	48,7	44,1	40,6	44,4	45,7	51,1	48,6	1,65	<0,001
Heterog.	0,18	0,16	0,12	0,10	0,10	0,09	0,08	0,07	0,07	0,08	0,09	0,08	0,005	<0,001

*EPM = erro padrão da média; #Valor de P a cada 28 dias; ¹ECC = escore de condição corporal; Test = concentração plasmática de testosterona; PE = perímetro escrotal; ²Conc = concentração espermática; Def. mai = defeitos maiores; Def. tot = defeitos totais; MT = motilidade espermática total; MP = motilidade progressiva; RAP = velocidade espermática rápida; ³US = ultrassonografias do parênquima testicular; Máx = máximo; Min = mínimo; Heterog = heterogeneidade de pixels da imagem.

A maturidade sexual é definida como sendo o período em que o animal pode ser utilizado na reprodução e apresenta ejaculado com 70% ou mais de espermatozoides normais [2]. De acordo com CBRA [5] as características seminais desejáveis para sêmen fresco são: motilidade $\geq 60\%$, concentração $\geq 350 \times 10^6$ spzt/ml, defeitos maiores $\leq 10\%$ e totais $\leq 30\%$. No presente estudo, essas características foram observadas quando os animais apresentavam média de idade de 20,9 meses. A produção de testosterona pode ser um indicador da fertilidade em touros jovens, por estar relacionada com a idade à puberdade e maturidade sexual [6]. O desenvolvimento das gônadas está relacionado ao aumento da produção de testosterona [7], exercendo papel fundamental na manutenção da espermatogênese [8]. Chandolia et al. [9] e Ahmad [4], avaliando o parênquima testicular por ultrassonografia observaram que o aumento da ecogenicidade de acordo com a idade ocorre por uma proliferação celular, a qual inicia-se com a divisão das espermatogônias e a formação de mais células maduras da espermatogênese. Posteriormente, ocorre aumento da densidade das células, caracterizada pela

formação das espermátides e, em seguida, transformação em espermatozoides. Os mesmos autores verificaram outra fase no qual a ecogenicidade testicular diminuiu, e atribuíram este fato à formação do lúmen dos túbulos seminíferos e consequente produção de fluido pelas células de Sertoli, necessários à espermatogênese. Isto justifica a queda de pixels dos 14 aos 19 meses de idade no presente estudo e posterior aumento em relação a idade (20 a 24 meses).

Considerações Finais – Os touros jovens da raça Nelore apresentaram melhora das variáveis de crescimento, reprodutivas, ultrassonográficas e seminais de acordo com o aumento da idade dos animais. Assim, a partir dos 20 meses de idade obtiveram características reprodutivas desejáveis e aumento dos pixels no parênquima testicular.

Referências bibliográficas

- [1] Freneau GE. Biopsia testicular aberta efetuada na puberdade e na pós-puberdade e suas conseqüências sobre a gametogênese e o sêmen de touros Nelore. Belo Horizonte: Escola de Veterinária-UFMG. 1996. 167p. (Tese de Doutorado).
- [2] Brito LFC, Silva AEDF, Unanian MM, Dode MAN, Barbosa RT, Kastelic JP. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. *Theriogenology*, v.62, p.1198-1217, 2004.
- [4] Lunstra, DD, Ford JJ, Echternkamp SE. Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *Journal of Animal Science*, v.46, p.1054-1066, 1978.
- [4] Ahmad E, Ahmad N, Naseer Z, Aleem M, Khan MS, Ashiq M, Younis M. Relationship of age to body weight, scrotal circumference, testicular ultrasonograms, and semen quality in Sahiwal bulls. *Tropical Animal Health and Production*, v.43, p.159-164, 2011.
- [5] CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte, MG, 2013. 104 p.
- [6] Post TB, Christensen HR, Seifert GW. Reproductive performance and productive in beef bulls selected for different levels of testosterone response to GnRH. *Theriogenology*, v.27, n.2, p.317-328, 1987.
- [7] Moura A, Erickson BH. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationships with testis size and number of Sertoli and germ cells in beef bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.111, p.183-190, 1997.
- [8] Zirkin BR. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. *Cell and Developmental Biology*, v.9, p.417-421, 1998.
- [9] Chandolia RK, Honaramooz A, Omeke BC, Pierson R, Beard AP, Rawlings NC. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology*, v.48, p.119-132, 1997.

Agradecimentos: FAPESP (Processo nº 2015/06733-5 e nº 2013/13696-3) e a CAPES (BEX 11820/2013-06).

Correlação entre concentração de testosterona sérica e classificação andrológica por pontos (CAP) nas raças Nelore e Tabapuã

Tulio César Neves

FACISA-Unai/MG tcneves@yahoo.com.br

Ivo Pivato

UnB – Universidade de Brasília pivato@unb.br

Abstract: The objective of this study was to correlate levels of testosterone and PAC (Andrological Classification by Points) in Nelore and Tabapuã bulls. 42 bulls were used, being 22 Neloeres and 20 Tabapuã, with ages of 36, 48 and 60 months. There was no difference in testosterone means by age or race. There was no difference in mean testosterone between the times evaluated. Animals with higher testosterone presented higher scores in CAP. The Nelore breed had a moderate correlation of testosterone with CAP x ($r = 0.55$), while in the Tabapuã race there was a strong correlation between the variables, $r = 0.89$.

Keywords: Fertility, andrology, testosterone.

Palavras-chave: Fertilidade, andrologia, testosterona.

Introdução – A seleção de touros por meio da avaliação andrológica, visa obter avaliação da capacidade sexual dos machos, ajudando a eleger animais aptos à atividade reprodutiva (1). Assim, o touro contribuirá para a melhoria da fertilidade e conseqüente aumento da lucratividade do rebanho (3). Uma ferramenta para determinar a fertilidade de touros é a CAP (Classificação Andrológica por Pontos) (2), que pontua touros de acordo com o perímetro escrotal em função da faixa etária, conjuntamente com os aspectos físicos e morfológicos do sêmen e pode ser utilizada de forma complementar ao exame andrológico, auxiliando na avaliação do potencial reprodutivo dos touros (4). Já testosterona é essencial à função reprodutiva dos machos, pois atua estimulando os estádios finais da espermatogênese, prolonga a vida útil dos espermatozoides no epidídimo, estimula o crescimento, o desenvolvimento e a atividade secretora dos órgãos sexuais, bem como, as características sexuais secundárias e a libido do macho (5)(6). As concentrações de testosterona circulante podem ser indicadores úteis para determinar a fertilidade em touros jovens e um indicador efetivo da fertilidade (Post et al.,1987). Objetivou-se então, verificar a correlação entre a CAP e as concentrações séricas de testosterona em touros das raças Nelore e Tabapuã em condições de campo.

Material e Métodos – Foram utilizados 42 touros *Bos indicus*, com idade entre 36 e 72 meses, sendo 20 animais da raça Tabapuã e 22 animais da raça Nelore, resguardado um período de

60 dias de repouso sexual, após saírem da estação de monta de janeiro à maio de 2017. A coleta de sangue para dosagem de testosterona de todos 42 animais foi entre 07:00h e 10:00h da manhã (T1), e novamente todos animais coletados no período da tarde entre 14:00 e 17:00 (T2), com a intenção de mensurar as concentrações médias de testosterona nos animais (T média), pois vários trabalhos têm demonstrado que a concentração de testosterona apresenta picos durante o dia (24 horas), os quais, geralmente, estão associados aos picos de LH (1). Imediatamente após a coleta, a amostra de sangue foi resfriada a 4°C por aproximadamente, 30 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 300g por 20 minutos. O plasma sanguíneo, obtido após a centrifugação, foi transferido para tubos criogênicos esterilizados, devidamente identificados, e congelados à -20°C (9) para posterior armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C), até o momento da análise. As amostras devidamente identificadas e conservadas foram analisadas no Laboratório de Nutrição Animal do CENA – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo em Piracicaba. As dosagens quantitativas das concentrações séricas de testosterona foram realizadas por radioimunoensaio de fase sólida pelo método direto utilizando-se kits comerciais IMMUNOTECH SAS®– Marseille, France. (2017). Quanto às avaliações andrológicas dos animais, estas seguiram as recomendações do CBRA (8), onde foram avaliados vigor (1 a 5), motilidade progressiva (%) e morfologia espermática (%). A circunferência escrotal (CE) foi obtida com auxílio de uma fita métrica e a idade verificou-se nos registros dos animais. Com base nestas informações, os animais foram classificados em quatro categorias, excelentes (de 86 a 100 pontos), muito bons (de 66 a 86 pontos), bons (de 40 a 66 pontos) e questionáveis (menor que 40 pontos) de acordo com Fonseca et al., (1997). Estes dados foram correlacionados com as concentrações de testosterona dos animais.

Resultados e Discussão – Na tabela 1, verifica-se as concentrações plasmáticas de testosterona nas raças em função dos horários de colheita. Não foi observada diferenças significativas nas médias das concentrações entre as raças nos momentos T1, T2 e T média. Quanto aos valores por raça, a Tabapuã apresentou valores de testosterona superiores a raça Nelore. Observou-se um elevado desvio padrão, demonstrando grande variação das concentrações séricas nos animais. Essas variações individuais podem ser influenciadas por diversos fatores como por exemplo idade, nutrição (1) e patologias (9).

Tabela 1. Concentrações plasmáticas de testosterona em função dos períodos de colheita por raça.

	T1 (manhã) ng/ml	T2 (tarde) ng/ml	T média ng/ml
Nelore	1,21±2,23a	1,82±2,62a	1,52±2,37
Tabapuã	2,04±3,46a	3,03±4,39a	2,53±3,79

Médias seguidas da mesma letra na coluna e linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Verifica-se na Tabela 2, que a raça Nelore apresentou uma correlação CAP x Testosterona moderada ($r=0,55$), enquanto na raça Tabapuã, observou-se uma forte correlação entre as variáveis ($r=0,89$). Verificou-se que animais que obtiveram a CAP mais elevada também obtiveram valores séricos de testosterona mais elevados, diferindo significativamente das demais classes da CAP. Talvez por promover no testículo, estímulos que possibilitem além de um maior desenvolvimento do parênquima, repercutindo num maior perímetro escrotal, além de proporcionar um melhor maturação epididimária, diminuindo defeitos e melhorando sua motilidade (3)(5), conforme já cita a literatura.

Tabela 2. Valores da CAP, Testosterona Média e correlação por Raça

CAP	Pontuação	Nelore			Tabapuã		
		N	CAP média	Tmédia ng/ml	N	CAP média	Tmédia ng/ml
Excelente	86 – 100	1	91,00a	9,97a	2	86,50±9,23 ^a	8,35±1,8a
Muito bom	66 < 86	6	81,33±16,57b	1,71±1,60b	6	72,67±8,34b	3,87±2,85b
Bom	40 < 66	15	53,87±14,33c	0,87±1,35b	11	50,73±11,16c	0,95±1,72b
Questionável	< 40	0	0	0	1	35,00d	0,28
Correlação			r=0,5529			r=0,8957	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Vigor e motilidade progressiva correspondem à 25% da pontuação enquanto características de patologia espermática, correspondem à 35% da pontuação, porém a característica que tem grande peso na CAP é o perímetro escrotal com 40% da pontuação (3). Sendo assim a CAP uma composição que expressa a capacidade funcional de um touro, concentrações maiores de testosterona podem influenciar diretamente a fisiologia testicular aumentando o perímetro escrotal e melhorando a qualidade espermática (9). Correlações positivas entre a concentração de testosterona sérica e a fertilidade de touros são citados por diversos autores (1)(6)(7)(9). Correlação direta entre CAP e libido, enfatizando a eficiência da classificação na funcionalidade dos touros também foram apontadas (10)(11). A ação direta e indireta da testosterona na multiplicação e diferenciação das células germinativas, pode ser a explicação da associação deste hormônio com a qualidade espermática (12). Pode-se então presumir, que a concentração mais elevada da testosterona agiria influenciando tanto as características de vigor e motilidade, quanto melhor morfologia espermática, repercutindo assim numa maior pontuação na CAP.

Considerações Finais - A Classificação Andrológica por Pontos se mostrou uma ferramenta interessante para selecionar animais por fertilidade nas duas raças. Possivelmente as concentrações séricas de testosterona, apesar de apresentarem grande variação entre animais, influenciam diretamente nos parâmetros que compõe a CAP, tendo alta correlação na raça Tabapuã e moderada na raça Nelore.

Referências bibliográficas

- [1] BARBOSA, RT; FONSECA, V.O.; BARBOSA, P.F. et al. Concentrações plasmáticas de testosterona e suas relações com características reprodutivas em touros das raças Canchim e Nelore. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.16, n.1-2, p.1-11, 1992.
- [2] FONSECA, V. O.; SANTOS, N. R.; MALINSKI, P. R. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfo-físicas do sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 21, n. 2, p. 36-39, 1997.
- [3] FONSECA, V. O.; FRANCO, C. S.; BERGMANN, J. A. G. et al. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) acasalados com elevado número de vacas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.49, p.53-62, 1997.
- [4] LOPES, F.G.; KOETZ JUNIOR, C.; BARCA JÚNIOR, F.A.; OKANO, W.; SILVA, L.C.; SILVA JÚNIOR, M.A.G.. Maturidade sexual e classificação andrológica por pontos (CAP) em touros jovens da raça nelore puros de origem (PO). *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 168-173, Jan./Feb. 2013.
- [5] VALE FILHO, V. R. Subfertilidade em touros: parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. *Cad. Tec. Vet. Zootec.*, n.35, p.81-87, 2001.
- [6] DIAS, J.C.; EMERICK, L.L.; ANDRADE, V.J.; MARTINS, J.A.M.; VALE FILHO, V.R.. Concentrações séricas de testosterona em touros jovens guzerá e suas associações com características reprodutivas. *Archives of Veterinary Science* v.19, n.1, p.24-31, 2014.
- [7] POST, T.B.; CHRISTENSEN, H.R.; SEIFERT, G.W. Reproductive performance and productive traits of beef bulls selected for different levels of testosterone response to GnRH. *Theriogenology*, v.27, p.317-328, 1987.
- [8] CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- [9] MOURA, M.I.; SILVA, L.A.F.; FONSECA, A.M.; HELOU, J.B.; FREITAS, S.L.R.; CAETANO, L.B.; PRADO, T.D.. Níveis séricos de testosterona em bovinos da raça nelore com dermatite digital. *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. Ciência Animal Brasileira. Suplemento 1*, 2009.
- [10] CHAVES, R.M.; SOUZA, J.A.T.; NASCIMENTO, I.M.R. et al. Avaliação da capacidade reprodutiva de touros da raça Nelore através da classificação andrológica por pontos (CAP) e do teste da libido. *Medicina Veterinária*, v.1, p.26-32, 2007.
- [11] FRENEAU, G.E.; PUOLI, J.R.; ARNHOLD, E.. Evolução após quatro anos de aplicação da capacidade andrológica por pontos (CAP) em touros nelore e estudo da relação com a prenhez em estação de acasalamento. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.18, 1-12, e-31274, 2017.
- [12] DIAS, J.C.; EMERICK, L.L.; ANDRADE, V.J.; MARTINS, J.A.M.; VALE FILHO, V.R.. Concentrações séricas de testosterona em touros jovens guzerá e suas associações com características reprodutivas. *Archives of Veterinary Science* v.19, n.1, p.24-31, 2014.

Agradecimentos: DPG/UnB.

Degeneração testicular em bovino causada por complicações da babesiose

Juliana Horta Wutke Diniz¹

julianahortawd@gmail.com

Deborah Freitas Silva¹

Ana Carolina Bahia Teixeira¹

Rodrigo Libério Araujo Palhano¹

Rodrigo Melo Meneses¹

Leticia Zoccolaro Oliveira¹

Gabriel Augusto Monteiro¹

Abstract: This study aims to report a case of bovine babesiosis as a primary cause of testicular degeneration in a Holstein bull. At 20 months of age, the animal demonstrated satisfactory reproductive parameters. However, at 25 months, presented clinical babesiosis with hyperthermia, whose signs were aggravated in the following months by pneumonia and laminitis and, again, hyperthermia. Aging 28 months, scrotal circumference and testicular consistence were reduced. Ultrasonography revealed heterogeneous testicular parenchyma, compatible with testicular degeneration. At 36 months of age, reproductive status was again evaluated presenting testicular consistency of 3 (score 1-5) and sperm parameters according to the CBRA standards. It was concluded that babesiosis, when severely affects cattle, can cause hyperthermia and secondary diseases, interfering with the physiological mechanisms of testicular thermoregulation. The recovery of reproductive tract and spermatid patterns may vary according to the severity of testicular/epididymal lesions that occurred, as well as the time elapsed for restoration of animal's health.

Keywords: hipertermia; termorregulação; touro.

Palavras-chave: hyperthermia; thermoregulation; bull.

Introdução - A babesiose é uma doença hemolítica transmitida por carrapatos, que acomete várias espécies de mamíferos. No Brasil, esta doença ocorre de forma enzoótica em bovinos, onde duas espécies de babésias são mais frequentes, *Babesia bigemina* e *B. bovis*. Os animais acometidos podem desenvolver quadro agudo a crônico e apresentar apatia, anorexia, mucosas pálidas, hemoglobinúria e febre [1]. O aumento da temperatura corporal causado pela febre, associada à deficiência em regular a temperatura dos testículos, são alguns dos principais fatores predisponentes à degeneração testicular [2]. As gônadas masculinas precisam estar 4 a 6°C abaixo da temperatura corporal para manterem a função fisiológica normal do órgão, como a produção de gametas e hormônios sexuais. Os principais mecanismos de termorregulação testiculares são músculo cremáster, túnica dartus, glândulas sudoríparas e

¹ Depto de Clínica e Cirurgia Veterinárias - Escola de Veterinária - UFMG

o plexo pampiniforme [3]. A degeneração é uma alteração frequente devido ao fato de o epitélio seminífero ser sensível aos fatores e condições adversas, pode afetar um ou os dois testículos, e o acometimento dos túbulos seminíferos pode ser parcial, tendo produção espermática normal em alguns segmentos [1]. Ao exame físico, os testículos se apresentam com volume e consistência alterados, inicialmente apresentam flacidez e redução do tamanho, em casos mais avançados pode ocorrer atrofia, disseminação de tecido fibroso tornando-os firmes à palpação [4,5]. O ejaculado de animais acometidos resulta em baixa concentração espermática, baixa motilidade e defeitos morfológicos como gotas citoplasmáticas proximais, diadema e vacúolos [6]. Durante o exame ultrassonográfico, importante aliado ao diagnóstico, o estroma apresenta-se heterogêneo [7]. A função reprodutiva do animal pode ser reestabelecida, principalmente quando não há comprometimento severo do epitélio germinativo, e a espermatogênese pode ocorrer normalmente em torno de 60 a 100 dias após a retirada da causa, isto ocorre em virtude da resistência das espermatogônias tronco, células de Sertoli e células de Leydig [8-9]. O objetivo deste trabalho é relatar um caso de degeneração testicular em bovino com quadro clínico de babesiose associadas à pneumonia, que obteve recuperação da espermatogênese após resolução do quadro clínico.

Casuística - Um touro da raça holandesa de 20 meses de idade foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG em dezembro de 2017 para realização de exame andrológico visando acompanhamento reprodutivo. No exame físico específico do aparelho genital foi constatado perímetro escrotal de 34 cm, durante a palpação testicular verificou-se consistência 3 (classificação de 1-5) e não foram encontradas alterações dignas de nota. A coleta do sêmen foi realizada por meio de vagina artificial e no espermiograma foi constatada motilidade espermática de 60% e vigor 4 (1-5). Os defeitos morfológicos se encontraram dentro do limite aceitável pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) [10], com 4% de defeitos maiores e 11% de defeitos menores. No entanto, no mês de maio de 2018 (aos 25 meses de idade) o animal apresentou quadro de apatia, taquicardia (96 bpm), atonia ruminal, hipertermia (41,4°C), membranas mucosas hipocoradas, dificuldade de locomoção e hemoglobinúria. Foi realizado o esfregaço sanguíneo de ponta de cauda no qual foi identificada a presença do parasita *Babesia bovis*. O tratamento para babesiose foi realizado com Dipropionato de Imidocarb (3mg/kg), Flunexim meglumine (1.1mg/kg) e hidratação oral por meio de sonda nasogástrica. Em junho foi observada intensa secreção nasal mucopurulenta, de coloração esverdeada e odor fétido, no exame físico constatou-se estertores pulmonares (crepitações), taquipneia e hipertermia (40,3°C), sendo diagnosticado com pneumonia aspirativa. O tratamento foi realizado com Gentamicina (6.6mg/kg) associado a Ceftiofur (5mg/kg). Ademais, no mês de julho o animal foi diagnosticado com laminite após apresentar edema, hiperemia, hipertermia, áreas de hemorragia e grande sensibilidade na região da coroa do casco dos quatro membros, além de descolamento do tecido córneo próximo à banda coronária. Foi realizada a biópsia do casco que confirmou o quadro. Em agosto de 2018 (aos 28 meses de idade) o quadro reprodutivo foi reavaliado. Foram verificadas redução do perímetro escrotal para 29 cm e flacidez testicular acentuada (flacidez considerada 1, na classificação de 1-5). Na ultrassonografia foi apurado padrão testicular heterogêneo, áreas

múltiplas hiperecoicas no parênquima, sendo compatível com degeneração testicular. Devido à severidade do quadro clínico do animal (estado geral e sequelas no casco) a realização da coleta do sêmen foi impossibilitada. No mês de outubro deste mesmo ano foi constatada melhora do quadro clínico do animal. Para acompanhamento do *status* reprodutivo do animal, realizou-se novamente o exame andrológico no mês de abril de 2019 (aos 36 meses de idade). Detectou-se perímetro escrotal de 32 cm, consistência testicular 3, e no exame ultrassonográfico ainda foi observado padrão testicular heterogêneo com pontos hiperecoicos. O exame termográfico da região escrotal demonstrou-se normal. A coleta do sêmen foi realizada por meio de eletroejaculador e no espermograma a motilidade espermática foi de 77%, o vigor 3 (1-5) e na avaliação da morfologia espermática os percentuais de defeitos estavam dentro do limite aceitável pelo CBRA (10% de defeitos maiores e 13% de defeitos menores).

Resultados e Discussão – Diante do histórico do animal, associado ao exame físico e ultrassonográfico realizados após o início do quadro de babesiose, foi levantada a hipótese de desenvolvimento do processo de degeneração testicular aguda. O caso em questão, caracterizado pela diminuição do perímetro escrotal, 34 cm para 29 cm, flacidez testicular [1][5], perda do padrão homogêneo característico de testículo em condições normais, com estroma heterogêneo e pontos hiperecoicos [7], foi compatível com a suspeita inicial. O quadro de hipertermia, em decorrência da infecção por *B. bovis*, foi responsável por prejudicar a termorregulação normal dos testículos e provocar o início do processo de degeneração. A temperatura corporal elevada prejudica a termorregulação testicular e aumenta o metabolismo celular sem aumentar o fluxo sanguíneo local, causando hipóxia tecidual. O processo patológico leva a uma maior produção de espécies reativas ao oxigênio, porém sem aumento da síntese de antioxidantes nas células testiculares, o que gera danos ao DNA e processo de apoptose, dando início à degeneração testicular [4]. Assim, a alta temperatura persistente do animal favoreceu maior produção de espécies reativas ao oxigênio, que associada à baixa circulação sanguínea e produção de antioxidantes, resultou em maior porcentagem de apoptose celular no estroma. Com o número reduzido de células ativas, reduz-se também o volume do testículo e a consistência do órgão [9,11]. Em um estudo com bovinos, foi observado que a injúria causada por aumento da temperatura afetou principalmente células espermáticas na fase de meiose e de espermiogênese, sugerindo que essas são fases mais sensíveis [12]. Em estudo feito com carneiros que sofreram degeneração testicular por estresse calórico foi possível observar retorno da atividade espermatogênica 77 dias após a retirada da causa da patologia [11]. No presente estudo, cinco meses após o início das intercorrências apresentadas, o animal demonstrou melhora do quadro clínico e após seis meses, com o resultado do exame andrológico, também foi possível observar melhora do quadro reprodutivo. O reestabelecimento da consistência e o aumento do perímetro testicular são sugestivos de que as células espermatogênicas retomaram sua atividade e se multiplicaram. No presente estudo, o resultado do espermograma (dentro dos critérios do CBRA) evidenciou regeneração do epitélio dos túbulos seminíferos em níveis fisiológicos. A recuperação da função testicular é possível quando a causa é removida e a injúria não foi severa [9,11]. A produção de gametas masculinos com alta motilidade e sem grande quantidade de defeitos morfológicos são fa-

tores que demonstram que a espermatogênese e a maturação espermática estão voltando a ocorrer dentro do padrão fisiológico.

Considerações Finais - A babesiose, quando acomete severamente os bovinos, pode causar hipertermia persistente e doenças secundárias, interferindo nos mecanismos fisiológicos de termorregulação testicular. Após removida a causa e constatada a recuperação clínica do animal é possível observar recuperação do quadro reprodutivo e a retomada de parâmetros andrológicos do reprodutor avaliado. Cabe ressaltar que o tempo de recuperação do quadro clínico reprodutivo e dos padrões espermáticos podem variar em função da severidade da lesão testicular e epididimária que ocorreram durante a doença, bem como do período transcorrido para completo restabelecimento da higidez do animal.

Referências bibliográficas

- [1] Santos RL, Alessi AC. Patologia veterinária. São Paulo: Roca, 2014. 892 p.
- [2] Garcia AR. Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental. 2004. 258f. Tese - FMVZ, USP, 2004.
- [3] Nunes AS. Morfologia do funículo espermático e dos escrotos em caprinos nativos do Estado do Piauí, com diferentes configurações escrotais. 2005. 57p. Dissertação - CCA, UFPI, 2005.
- [4] Setchell BP. 1998. The Parkes Lecture. Heat and the testicles. *J Reprod Fertil*; 114:179-94.
- [5] Van Camp SD. 1997. Common causes of infertility in the bull. *Vet Clin North America: Food Animal Practice*; 13:203-231.
- [6] Wenkoff MS. The evaluation of bulls for breeding soundness. Ontário: Canadian Veterinarian Medical Association, 1988. 48 p.
- [7] Cardilli DJ, Toniollo GH, Pastore AA. et al. 2009. Alterações do padrão ultrassonográfico do parênquima testicular em bovinos jovens da raça Nelore. *Acta Scient Vet*. 37(4): 367-370.
- [8] Oliveira MEF, Teixeira PPM, Silva JCB. et al. 2014. Effect of Scrotal Insulation Associated to Environmental Discomfort on Andrologic Characteristics in Santa Inês Rams. *J Anim Sci Adv*. 4(10):1051-1058.
- [9] Hansen PJ. 2009. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* v.364, n.1534, p.3341-3350.
- [10] Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- [11] Garner DL, Hafez ESE. Espermatozoides e plasma seminal. In: Hafez ESSE, Hafez B. (Eds.). *Reprodução animal*. Barueri: Manole, 2004. p.97-110.
- [12] Rahan MB, Vandaele L, Rijsselaere T. et al. 2011. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. *Theriogenology*; 76:1246-1257.

Desenvolvimento sexual de tourinhos Senepol e respostas adaptativas em ambiente tropical

Bruna Ferrari¹
Caroline Carvalho de Oliveira²
Rodrigo Albuquerque Lara Franco²
Maryene Beatriz Souza Molina Borges¹
Fabiana Villa Alves³
Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes³
Lucas Nascimento Silva⁴
Andrea Alves Egito⁴
Thyara de Deco-Souza⁴
Eliane Vianna da Costa-e-Silva⁴
eliane.silva@ufms.br

GERA-MS – Grupo de Estudos em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul

Abstract: The objective was to verify the correlation between physiological strategies of thermal regulation and the sexual precocity of Senepol young bulls (n=51). They were submitted to attempts of seminal collection for analysis of the andrological profile and classification as to precocity. A Thermolytic Capacity Test was performed to calculate the Heat Tolerance Index, in which physiological and thermographic variables were also recorded. There wasn't difference between the precocity classes ($p > 0.05$) for the physiological parameters. The class early maturing (EM) obtained higher value for average daily gain of weight. Values closer to the normal physiological threshold indicate greater probability of EM. Animals that use thermoregulatory mechanisms in a more efficient way, are more likely to be EM, making possible the use of thermotolerance for selection.

Keywords: Heat stress, infrared thermography, thermoregulation.

Palavras-chave: estresse por calor, termografia, termorregulação.

Introdução - Uma estratégia para mitigar o impacto do estresse por calor e preservar os bons índices reprodutivos, é realizar a seleção de animais mais precoces, porém, que também sejam adaptados ao ambiente de criação [1]. Uma opção é a utilização de raças taurinas adaptadas ao clima tropical, como a Raça Senepol. Todavia, ainda se faz necessário identificar características que viabilizem a seleção de indivíduos mais adaptados e que possam ser adotadas em Programas de Melhoramento Genético. Dessa forma foi realizado um estudo com

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS.

² Zootecnista.

³ Embrapa Gado de Corte.

⁴ Docente da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

o objetivo de verificar a associação entre as estratégias fisiológicas de regulação térmica e a precocidade sexual de tourinhos da raça Senepol.

Material e Métodos - O experimento foi realizado em uma propriedade rural na região de Miranda, Mato Grosso do Sul, Brasil (20° 05' 10" S e 56° 36' 75" W). O clima é do tipo Aw (tropical quente e úmido). Foram utilizados 51 machos bovinos Senepol, com idade inicial média de 11 ± 0,3 meses de idade e 276, 5 ± 41,0 kg de peso vivo. Para a avaliação do perfil andrológico e classificação da puberdade, os animais foram submetidos a três tentativas de coleta seminal nos meses de agosto, janeiro e março. O método utilizado foi eletroejaculação com análise quantitativa e qualitativa do ejaculado de acordo com a metodologia de [2]. A cada coleta, os tourinhos eram considerados púberes se atingissem 10% de motilidade espermática e 50 milhões de espermatozoides totais no ejaculado. Sendo então classificados quanto a precocidade sexual em três classes: Superprecoces até 13 meses, Precoces entre 13 e 15 meses, e Tardios acima de 15 meses de idade. Durante a tentativa de coleta seminal do mês de janeiro, os animais também foram submetidos a um Teste de Capacidade Termolítica, que consiste em avaliar a capacidade do animal em perder calor e recompor a temperatura corporal normal após o término da exposição solar, para cálculo de um Índice de Tolerância ao Calor (ITC), obtido pela seguinte equação: $(ITC) = 10 - (TR2 - TR1)$; em que: TR1 corresponde a temperatura retal (TR; °C) antes da exposição solar; TR2 corresponde a TR após a exposição solar. Durante o Teste de Capacidade Termolítica, também foram aferidas as seguintes variáveis fisiológicas: frequência cardíaca (FC; batimentos/ minuto), frequência respiratória (FR; movimentos/ minuto) e temperatura superficial (TS; °C), na cabeça (TScab), dorso (TSdor) e escroto (TSesc) e por termografia por infravermelho (TIV; °C), na cabeça (TIVcab), dorso (TIVdor) e escroto (TIVesc). O microclima foi avaliado concomitantemente ao Teste de Capacidade Termolítica, foram obtidos os registros de temperatura de bulbo seco (°C), temperatura do ponto de orvalho (°C), umidade relativa do ar (%), utilizando o modelo de abrigo meteorológico [3], com o uso de um termohigrômetro digital com data logger. Foi calculado o Índice de temperatura e Umidade (ITU) para caracterização do ambiente, sendo classificado como $ITU \leq 70$ ambiente não estressante; entre 71 e 78 crítico; de 79 a 83 situação de perigo; e acima de 83, situação de emergência [4]. O experimento foi aprovado pela CEUA/UFMS, protocolo n. 649/2014.

Resultados e Discussão - A análise de variância não encontrou diferenças significativas entre as médias de variáveis do Índice de Tolerância ao Calor (ITC) e das variáveis fisiológicas, obtidos durante o Teste de Capacidade Termolítica ($p > 0,05$). Observou-se média de $FR = 49,73 \pm 1,54$ movimentos/minuto, $FC = 98,90 \pm 2,83$ batimentos/minute, $TR = 39,24 \pm 0,07$ °C e $ITC = 9,73 \pm 0,09$. As temperaturas obtidas por termografia médias foram de $40,11 \pm 0,07$, $39,33 \pm 0,12$, $37,27 \pm 0,09$, TIVcab, TIVdor e TIVesc, respectivamente. A temperatura de superfície obtida foi $37,60 \pm 0,08$, $37,42 \pm 0,11$, $35,16 \pm 0,11$ °C para TSCcab, TSdor e TSesc, respectivamente.

O PE médio dos animais à puberdade foi diferente significativamente, registrando-se $29,67 \pm 0,85$, $32,89 \pm 0,49$ e $30,96 \pm 0,59$ cm para animais superprecoces, precoces e tardios,

respectivamente. Observou-se que animais superprecoces tiveram maior ganho de peso diário que os precoces e tardios: $0,621 \pm 0,03$, $0,601 \pm 0,02$ e $0,525 \pm 0,03$ kg, respectivamente, mas o crescimento testicular médio foi igual para as três classes de $0,033 \pm 0,001$ cm/dia.

A FC apresentou-se acima dos valores de referência ($98,90 \pm 2,83$ bat/min). A FC é o primeiro mecanismo acionado para dissipação do calor, seguido da sudorese, que embora não tenha sido avaliada neste estudo, sabe-se que os animais da raça Senepol possuem 96% das glândulas sudoríparas do tipo saculiforme, o que os torna eficientes na evaporação cutânea [5]. Visto que a FR é o terceiro mecanismo utilizado pelos bovinos para evitar o estresse térmico e nesse trabalho não apresentou valores elevados ($49,73 \pm 1,54$ mov/min), sendo considerado normal até 60 movimentos por minuto [6], pode se inferir que apenas com as duas primeiras estratégias de termorregulação (FC e sudorese), os animais conseguiram manter sua homeostase. A TR obtida neste estudo ($39,24 \pm 0,07$ °C) reitera essa afirmativa, sobretudo por ser o principal indicativo de adaptabilidade fisiológica a ambientes quentes, na qual quando acima da normalidade ($39,3$ °C) aponta perda da eficácia dos demais mecanismos de termólise [7] ou seja, a TR evidencia que os animais não estavam em estresse térmico.

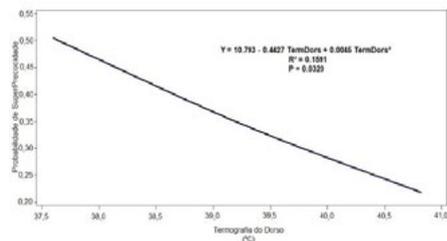


Figura 1. Probabilidade de SuperPrecocidade em função da termografia do dorso (°C) de bovinos machos Senepol em Miranda-MS.

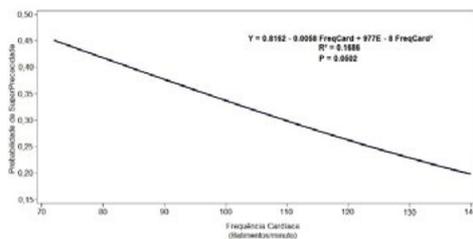


Figura 2. Probabilidade de Superprecocidade em função da frequência cardíaca (batimento/minuto) de bovinos machos Senepol em Miranda-MS.

Na interpretação do ITC, quanto mais próximo a 10, mais adaptado o animal está ao ambiente [8], portanto a média das classes ($9,73 \pm 0,09$) indica que esses animais estavam bem adaptados à condição ambiental avaliada, corroborando com os resultados encontrados de TR, principalmente pelos valores de ITU acima dos ideais ao qual os animais estavam submetidos.

A análise de regressão logística demonstrou que três das variáveis analisadas (TIVdor; FC e TSesc) que contribuíram com maior intensidade para a probabilidade de Superprecocidade, são variáveis fisiológicas e estão diretamente ligadas a termorregulação dos bovinos. Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas pelo teste de t ($p > 0,05$) entre as classes para essas variáveis, observa-se que a classe Superprecocida apresentou os menores valores para todas.

Houve uma variação de aproximadamente 28% da probabilidade de Superprecocidade em função da TIVdor (Figura 1), na qual quanto mais próxima a temperatura se encontrava da zona de normalidade, maior a chance dos animais serem Superprecoces. A análise da Su-

perprecocidade em função da FC (Figura 2) demonstrou um padrão semelhante com cerca de 25% de variação.

A análise de regressão logística ratifica a importância dos mecanismos termorregulatórios, como a FC para o metabolismo dos tourinhos Senepol.

Considerações Finais – Os animais mais adaptados podem expressar melhor seu potencial genético neste ambiente em questão, em virtude disto apresentam melhor desempenho e acabam sendo classificados como “superprecoces”, como foi evidenciado com o aumento da probabilidade. A característica de termotolerância deve receber atenção para seleção em ambiente tropical, devido sua influência sob características de interesse econômico, como idade à puberdade, que afetam diretamente a rentabilidade do rebanho.

Referências bibliográficas

- [1] Costa Mello, RR, Ferreira, JE, Mello, MRB, Palhano, HB. Influência do manejo na fisiologia reprodutiva do macho bovino. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umarama, v. 19, n. 1, pp. 57-63, 2016.
- [2] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** (CBRA). 3rd ed. Belo Horizonte; 2013.
- [3] Trumbo BA, Wise LM, Hudy M (2012) Influence of protective shielding devices on recorded air temperature accuracy for a rugged outdoor thermal sensor used in climate change modeling. **National Environment Science**, 3(1):42-50
- [4] Hahn GL, Mader TL (1997) Heat waves in relation to thermoregulation, feeding behavior and mortality of feedlot cattle. In: **Proceedings of 5th International Livestock Environment Symposium**, Vol I. ASAE SP01-97. ASAE, Minneapolis, Minn., pp 563-571
- [5] McManus, C, Prescott, E, Paludo, GR, Bianchini, E, Louvandini, H, Mariante, AS. Heat tolerance in naturalized Brazilian cattle breeds. **Livestock Science**, v. 120, p. 256-264, 2009.
- [6] Perissinotto, M, Moura, DJ, Cruz, VF, Souza, SRL, Lima, KAO, Mendes, AS. Conforto térmico de bovinos leiteiros confinados em clima subtropical e mediterrâneo pela análise de parâmetros fisiológicos utilizando a teoria dos conjuntos fuzzy. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1492-1498, 2009.
- [7] Mota, LS. **Adaptação e interação genótipo-ambiente em vacas leiteiras**. 1997, 69 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 1997.
- [8] Baccari Júnior F, Polastre R, Fré CA, Assis PS (1986) Um novo índice de tolerância ao calor para bubalinos: correlação com o ganho de peso. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Campo Grande, MS. **Anais...**

Agradecimentos: À CAPES e FUNDECT, pela concessão da bolsa. À FUNDECT, pela concessão de recursos financeiros.

Ecotextura testicular e sua correlação com o laudo andrológico em touros jovens da raça Nelore – resultados preliminares

Ana Paula Luiz de Oliveira¹

Ricardo Andres Ramirez Uscategui¹

Yury Tatiana Granja Salcedo²

Rodrigo Freitas Bittencourt³

E-mail: rfbvet1@gmail.com

Jeanne Broch Siqueira¹

Orientador E-mail: jeanne.siqueira@ufvjm.edu.br

Abstract: The objective of this study was to verify the existence of a correlation between the andrological exam and testicular qualitative echotexture in young bulls of Nelore breed evaluated before breeding season. Thirteen male Nelore bulls, aged between 18 and 20 months, were evaluated in August and October 2018 in the city of Unaí, MG, Brazil. There was a correlation between the andrological examination and testicular echotexture, suggesting that ultrasonography may serve as a screening test to verify reproductive aptitude in young Nelore bulls evaluated before mating, since greater testicular ecotexture, through pixels analysis, was correlate with lower seminal quality. A larger study is recommended to establish cohort values.

Keywords: animal reproduction, bovine, ultrasonography.

Palavras-chave: reprodução animal, bovino, ultrassonografia.

Introdução - Métodos de avaliação não-invasivos, como a ultrassonografia, são úteis na obtenção de dados confiáveis sem haver interferência direta nos sistemas orgânicos, reduzindo o estresse em diversos graus [1]. As alterações mais evidentes do parênquima testicular e que são facilmente detectadas ao exame ultrassonográfico, podem apresentar correlação com a qualidade seminal [2]. Objetivou-se verificar a existência de correlação entre o exame andrológico e a ecotextura testicular em touros jovens *Bos indicus* da raça Nelore avaliados pré-estação de monta.

Material e Métodos - Foram avaliados 13 animais, machos, não castrados da raça Nelore, com idade entre 18 e 20 meses, nos meses de agosto e outubro de 2018 no município de Unaí, MG, Brasil. Os animais foram contidos em tronco para obtenção das imagens ultrassonográficas dos testículos e realização do exame andrológico. Para avaliação ultrassonográfica foi

¹ Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, Unaí, MG, Brasil.

² Departamento Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

³ Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, BA, Brasil.

utilizado um aparelho de ultrassom (Chison, Eco 1 VET, Chison Medical Technologies CO., LTD.), acoplado ao transdutor linear de 7,5 MHz (Chison, L7V-A Linear Array, Chison Medical Technologies CO., LTD.). Foi utilizado gel acústico sobre a bolsa testicular, formando imagens em plano longitudinal e transversal de testículos esquerdo e direito de cada animal. As imagens foram guardadas e posteriormente analisadas no software *Image J* (programa de domínio público do *National Institutes of Health*), por avaliadores sem conhecimento do resultado do exame andrológico. As imagens foram analisadas e obtidas captando a média da intensidade de pixels (IP) de cada imagem das regiões testiculares, em uma escala de valores variando de 0 (anecóico) a 255 pixels (hiperecóico). De forma a padronizar as avaliações das imagens, foram definidas áreas de 0,384 cm² em formato circular, como regiões de interesse (ROI). As regiões de interesse foram distribuídas de forma aleatória ao longo das imagens avaliadas tentando incluir a maior área de parênquima possível em relação ao plano longitudinal e feitas em todos animais nos mesmos locais. Foram verificadas seis áreas do parênquima testicular e três áreas do mediastino. Ao plano transversal, foram verificadas oito áreas no parênquima testicular e uma área em mediastino. Quanto ao exame andrológico, iniciou-se pelas mensurações testiculares (comprimento e largura testicular (cm), perímetro escrotal (cm)) e classificação da consistência testicular. Para obtenção dos ejaculados, foi utilizado o método de eletroejaculação. Após a coleta de sêmen, foram avaliadas as características físicas e morfológicas dos espermatozoides [3]. A maturidade sexual foi classificada, em quatro classes andrológicas: 1: aptos à reprodução; 2: aptos à reprodução em regime de monta natural; 3: temporariamente inaptos à reprodução; 4: animais descartados [4]. Análises estatísticas descritivas (média e desvio padrão) foram calculadas para todas as características andrológicas (perímetro escrotal; comprimentos e larguras testiculares; turbilhonamento, motilidade e vigor; e defeitos maiores, menores e totais) e ponderais (peso e altura), utilizando Software Microsoft Excel®. Os valores gerados pelo “*Image J*” em relação a intensidade de pixels foram: média, desvio padrão, mínimo e máximo. A partir desses dados foram geradas médias em dois grupos: as áreas relativas ao parênquima e as áreas relativas ao mediastino de cada testículo. Em relação ao plano longitudinal, ainda foram agrupadas em: superior e inferior. A análise estatística de comparação e correlação foi realizada com a ajuda do software R (*RTM Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*). As variáveis foram comparadas entre as distintas regiões e testículos pelo teste de *MannWitney* e aquelas que apresentaram resultados similares foram calculadas as médias e utilizadas para a correlação com a qualidade seminal do touro pelo teste de *Spearman* ($\alpha=0.05$). Subsequentemente os parâmetros que apresentaram significância ($p \leq 0,05$) foram submetidos a uma análise de componentes principais objetivando identificar o efeito dos parâmetros estudados com a qualidade seminal.

Resultados e Discussão - Ao exame andrológico, sete animais foram considerados aptos à reprodução, representando 54% do total de animais; dois foram considerados aptos à regime de monta natural, 15% do total de animais; e quatro animais foram considerados temporariamente inaptos à reprodução, representando um total de 31% do total de animais. Dos quatro animais considerados temporariamente inaptos à reprodução, dois não responderam à eletroejaculação e um não apresentou número de células espermáticas no ejaculado suficiente para a realização

da avaliação física do sêmen e a morfológica dos espermatozoides. Foram comparados os parâmetros de ecotextura entre as diferentes regiões de interesse avaliadas para cada um dos cortes (longitudinal e transversal) e dos testículos (direito e esquerdo). Assim, no plano longitudinal do parênquima do testículo direito as áreas de imagem superior mostraram ecotextura maior do que as áreas inferiores ($P = 0,001$); tanto para os pixels mínimos, médios e máximos. No plano longitudinal do mediastino do testículo direito as áreas de imagem estudadas mostraram ecotextura similar ($P = 0,610$). Da mesma forma, em relação ao plano longitudinal do parênquima do testículo esquerdo as áreas de imagem superior mostraram ecotextura maior do que as áreas inferiores ($P = 0,001$); isso tanto para os pixels mínimos, médios e máximos. No plano longitudinal do mediastino do testículo esquerdo as áreas de imagem estudadas mostraram ecotextura similar ($P = 0,277$). Em relação ao plano transversal do parênquima do testículo direito e esquerdo as áreas de imagem estudadas mostraram ecotextura ($P = 0,098$, $P = 0,125$, respectivamente) similares. De maneira geral, a intensidade de pixels das áreas de imagens estudadas do testículo direito e esquerdo no plano longitudinal e transversal do parênquima e do mediastino foram similares ($P > 0,05$). Quanto à correlação dos parâmetros de ecotextura com a classificação andrológica, observou-se correlação da classificação andrológica com os seguintes parâmetros: média dos valores de intensidade de pixels em plano longitudinal da região superior e inferior do parênquima testicular; desvio padrão dos valores de intensidade de pixels em plano longitudinal da região inferior do parênquima testicular; valores mínimos e máximos de intensidade de pixels em plano longitudinal da região superior do parênquima testicular; valores mínimos de intensidade de pixels em plano longitudinal da região inferior do parênquima testicular; média e máxima dos valores de intensidade de pixels em plano longitudinal do mediastino testicular; média dos valores de intensidade de pixels e valores máximos e mínimos em plano transversal do parênquima testicular; médias dos valores de intensidade de pixels em plano transversal do mediastino testicular. Estes parâmetros foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) comparando os grupos de animais formados a partir do resultado do exame andrológico (animais aptos à reprodução; animais aptos à reprodução em regime de monta natural; e animais temporariamente inaptos para reprodução) e as médias dos valores de ecotextura dos testículos de touros jovens da raça Nelore em pré-estação de monta. Verificou-se que dos sete touros Nelore considerados aptos à reprodução pelo exame andrológico, cinco animais ficaram agrupados no segundo quadrante do plano cartesiano, um foi agrupado no terceiro quadrante e outro no primeiro quadrante. Dos quatro animais considerados temporariamente inaptos à reprodução, dois foram agrupados no primeiro quadrante e dois foram agrupados no quarto quadrante, assim como as médias dos valores de pixels que apresentaram correlação ao teste de *Spearman*, o que significa que quanto maior a ecotextura testicular em pixels, menor a qualidade seminal dos animais.

Considerações Finais - Houve correlação entre o exame andrológico a ecotextura testicular, sugerindo que a ultrassonografia pode servir como triagem para verificar a aptidão reprodutiva em touros jovens da raça nelore avaliados na pré-estação de monta. Quanto maior a ecotextura testicular, menor a qualidade seminal dos touros. Recomenda-se um estudo de maior montante para estabelecer valores de corte.

Referências bibliográficas

- [1] Chacur MGM, Souza CD, Andrade IB. Aplicações da termografia por infravermelho na reprodução animal e bem-estar em animais domésticos e silvestres. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.3, p.88-94, 2016.
- [2] Barth AD, Alisio L, Avilés M, et al. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. **An. Repr. Sci.**, v.106, p.274-288, 2008.
- [3] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3rd ed. Belo Horizonte, 2013.
- [4] Guimarães JD. **Avaliação andrológica e estudos quantitativos e qualitativos da espermatogênese de touros mestiços F1 Holandês x Zebu e Red Angus x Zebu**. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p.186, 1997.

Agradecimentos: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Efeito de estação sobre o prognóstico reprodutivo de ovinos de diversos grupamentos genéticos no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil

Marcos Vargas da Silveira¹
marcos.vetufms@gmail.com

Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo²

Ana Cristina Andrade Bezerra³

Joana Carolina Trindade Barbosa⁴

Fernanda Battistotti Barbosa⁵

Gustavo Guerino Macedo⁶

Eliane Vianna da Costa e Silva⁶
eliane.silva@ufms.br

GERA-MS – Grupo de Estudos em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul

Abstract: The reproductive seasonality of rams is a factor of importance for farms, since these animals are more sexually active during the negative photoperiod stages. The objective of this work is to evaluate the relationship between season and the prognosis of reproductive capacity of ram from several genetic groups kept in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. The andrological examination followed the methodology suggested by the Brazilian College of Animal Reproduction. Regarding the reproductive capacity of the breeds evaluated, 36.87% were eligible for breeding, 19.55% were fit with restrictions, 36.87% were temporary unfit and 6.7% were not eligible. Seminal characteristics (vigor, major and total defects) varied significantly according to race and age category but didn't compromise reproductive capacity. The variations observed in the ejaculate do not allow to distinguish if the effects would come from the nutritional offer or the photoperiod.

Keywords: fertility; seasonality; rams.

Palavras-chave: fertilidade; sazonalidade; carneiros.

Introdução – A sazonalidade reprodutiva de ovinos é um fator de importância para as fazendas de cria, uma vez que esses animais são mais ativos sexualmente durante os estágios de fotoperíodo negativo [1]. Estudos relatam que, durante a primavera, a produção de espermatozoides não é completamente suprimida, mas é quatro vezes inferior à produção durante o

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS.

² Programa de Residência em Reprodução de Grande Animais, HV/UEL.

³ Médica Veterinária.

⁴ Graduanda em Medicina Veterinária/UFMS.

⁵ Pós-graduação em Ciência Animal, FAMEZ/UFMS.

⁶ Docente, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

outono [2]. O objetivo desse trabalho é avaliar a influência da estação do ano sobre o prognóstico de aptidão reprodutiva de ovinos de diversos grupamentos genéticos mantidos no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

Material e Métodos - Neste trabalho foi utilizado o banco de dados de exame andrológico de prestação de serviço do LRA-UFMS/FAMEZ com 207 animais de nove raças distintas; Bergamacia (n=4); Dorper (n=28); Hampshire (n=2); Ile de France (n=37); Pantaneira (n=44); Santa Inês (n=22); Suffolk (n=38); Texel (n=18); White Dorper (n=14); avaliados nos meses de abril, setembro, outubro e novembro. Os animais são oriundos de 16 criatórios do estado de Mato Grosso do Sul. O sistema de criação das propriedades caracteriza-se por sistema extensivo e suplementação com sal mineral.

O exame clínico foi realizado inclui, exame clínico da genitália externa, biometria testicular, coleta do ejaculado por eletroejaculação, aspectos físicos do ejaculado e morfológicos [3]. Após as análises laboratoriais os animais foram classificados quanto à aptidão [4].

Analisou-se os dados por meio de análise de variância considerando os efeitos fixos de estação, faixa etária e raça sobre as características de perímetro escrotal (PE), motilidade (MOT), vigor (VIG), concentração/ml (CONC), defeitos maiores (DMA), defeitos menores (DME) e defeitos totais (DTT) todos transformados em raiz quadrada de $x + 1$. As médias foram comparadas por meio de teste de Duncan entre faixas etárias e teste de t de Student entre estação seca e chuvosa, considerando o nível de significância de 5%. A dispersão de frequência dos prognósticos de fertilidade foi comparada por qui-quadrado, considerando estação, raças e categoria de idade.

Resultados e Discussão- O prognóstico de fertilidade observado nesta população foi de 36.87% de animais aptos a reprodução, 16.55% aptos com restrições, 36.87% inaptos temporários e 6.7% inaptos definitivos, Figura 1. A frequência observada de prognósticos de fertilidade variou em função das estações, Figura 2 ($X^2 = 11,7014$, $P = 0,0085$), observou-se uma diferença estatisticamente significativa na frequência de animais inaptos temporários na seca, contudo a porcentagem de animais aptos não variou, indicando uma não interferência sazonal sobre a capacidade reprodutiva.

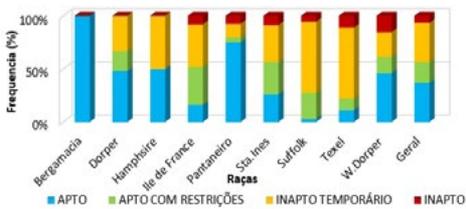


Figura 1. Classificação quanto à aptidão reprodutiva de carneiros de acordo com a raça no Estado de Mato Grosso do Sul.

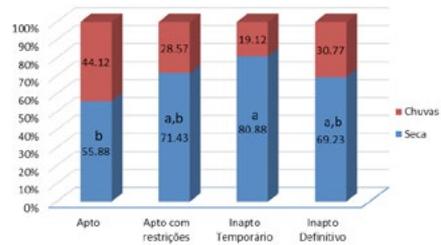


Figura 2. Classificação quanto à aptidão reprodutiva de carneiros de diversas raças de acordo com a estação seca e chuvosa no estado de Mato Grosso do Sul.

De acordo com a variação de aptidão reprodutiva em relação a estação, podemos analisar que nos períodos de chuva, ou seja, de maior calor, houve diminuição de animais aptos. Desta forma, podemos inferir que em ovinos nessa região, interferências nutricionais (Seca), tem menor interferência reprodutiva do que altas temperaturas (Chuvos). Lembrando que não houve queda no potencial reprodutivo dos animais entre as estações, uma hipótese para isso seria as condições ambientais não conseguirem anular a capacidade termolítica dos animais [5].

Carneiros Pantaneiros apresentam leve melhora reprodutiva na estação chuvosa [6]. Contudo, no presente trabalho em ambas as estações houve alta taxa de animais aptos, corroborando com outros resultados [7], e mostra que os carneiros pantaneiros apresentam características andrológicas adequadas com potencial fértil. Quanto à morfologia espermática observou-se que DMA e DTT variaram de acordo com a estação ($P < 0.05$) (Tabela 1). Como a variação de defeitos, não foi acompanhada de variação nos aspectos físicos do sêmen não se pode distinguir se os efeitos seriam advindos de variações nutricionais ou efeito sazonal de fotoperíodo.

Tabela 1. Características do ejaculado de carneiros de diversas raças na estação seca e chuvosa

	Estação chuvosa	Estação seca
Motilidade	59,81 ± 2,00 ^a	59,88 ± 1,56 ^a
Vigor	3,60 ± 0,09 ^a	3,52 ± 0,06 ^a
Volume	1,32 ± 0,13 ^a	0,86 ± 0,06 ^a
Defeitos menores	6,53 ± 0,91 ^a	6,94 ± 0,65 ^a
Defeitos maiores	13,90 ± 1,48 ^b	26,68 ± 2,02 ^a
Defeitos totais	20,44 ± 1,70 ^b	33,71 ± 2,22 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste t de Student em nível de 5%.

Em clima temperado a qualidade do sêmen é influenciada pela combinação entre fotoperíodo e temperatura; já em regiões tropicais, relacionado com a chuva por seu efeito na nutrição [8]. Uma realidade dos criatórios é o fornecimento de alimento de baixa qualidade

consequente, baixo teor de proteína na dieta, podendo causar atraso no desenvolvimento tanto do animal quanto do PE [9]. Observou-se PE médio de $32,23 \pm 1,09$; $31,88 \pm 0,66$; $30,00 \pm 0,0$; $33,03 \pm 0,47$; $30,17 \pm 0,42$; $31,43 \pm 0,54$; $28,87 \pm 0,49$; $30,32 \pm 0,92$; $31,82 \pm 1,09$ para Bergamacia; Dorper; Hampshire; Ile de France; Pantaneira; Santa Inês; Suffolk; Texel; White Dorper, respectivamente. Os carneiros das raças com o peso corporal maior (Ile de France, Dorper) apresentaram PE maior em relação aos mais leves, como os Pantaneiros, que apresentam uma curva de desenvolvimento abaixo da média, porém, quando analisados quanto a capacidade reprodutiva apresentam uma satisfatória aptidão.

Considerações finais: As variações observadas no ejaculado não permitem distinguir se os efeitos seriam advindos da oferta nutricional ou do fotoperiodismo. Mais estudos são necessários para esclarecer esse aspecto.

Referências bibliográficas

- [1] Zarazaga LA, Malpoux B, Chemineau P. Amplitude of the plasma melatonin nycthemeral rhythms is not associated with the dates of onset and offset of the seasonal ovulatory activity in the Ile-de-France ewe. **Reprod Nutr Dev** 2003; 43; 167-177.
- [2] Thiéry JC, Chemineau P, Hernandez X, Migaud M, Malpoux B. Neuroendocrine interactions and seasonality. **Domest Anim Endocrinol** 2002; 23; 87-100.
- [3] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** (CBRA). 3rd ed. Belo Horizonte; 2013.
- [4] Fonseca VO, Crudeli GA, Costa e Silva EV. Aptidão reprodutiva de touros da raça Nelore. Efeito das diferentes estações do ano sobre as características seminais circunferência escrotal e fertilidade. **Arq Bras Med Vet Zootec** 1992; 44; 7-15.
- [5] Macias-Cruz U, López-Baca MA, Vicente R, Meija A, Alvarez FD, Correa-Calderon A. Efeitos do estresse térmico sazonal (primavera vs verão) sobre variáveis fisiológicas e metabólicas em ovinos em região árida. **Int J Biometeorol** 2015; 60; 1279 – 1286.
- [6] Fumaçalli MH. **Avaliação das Características Andrológicas de Carneiros do Grupo Genético Pantaneiro nas Estações Seca e Chuvosa**. 2017. 44 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná. 2017.
- [7] Rossignolo EAA, Braga D, Barbosa JCT, Barbosa FB, Assis-Sales TS, Silveira MV, Reis FA e Costa e Silva EV. Estudo da morfologia espermática de ovinos pantaneiros em diferentes estações sob sistema extensivo. In Reunião Anual da ABRAA 2018, Ribeirão Preto, Brasil. Ribeirão Preto 2018; 210-212. **Anais...**
- [8] Rege JEO, Toe F, Mukasa-Mugerwa. Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep. II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs. **Small Ruminant Research** 2000; 37; 173-187.
- [9] Louvandini H, McManus C, Martins RD, Lucci CM, Corrêa SP. Características biométricas testiculares em carneiros Santa Inês submetidos a diferentes regimes de suplementação proteica e tratamentos anti-helmínticos. **Ciência Animal Brasileira** 2008; 9; 638-647.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À ASMACO – Associação dos Criadores de Ovinos de Mato Grosso do Sul pelo apoio.

Efeitos da temperatura superficial da pele sobre as características de qualidade seminal de touros Nelore

Luana Gomes Fernandes¹

luanagfernandes95@gmail.com

Naiara Nantes Rodrigues¹

Thais Fernanda Ribeiro¹

Rogério Ribeiro Vicentini²

Marcelo Sant' Ana Borges³

Marina de Oliveira Silva³

Karoline Maria Gil Bras⁴

André Maciel Crespilho⁴

Maria Eugênia Zerlotti Mercadante³

Fabio Morato Monteiro³

monteiro@iz.sp.gov.br

Abstract: The objective of this study was to measure the body temperature by infrared thermography (TIV) of Nelore bulls and to relate with seminal quality. Three evaluations were performed on 17 animals. Temperature of the scrotal and ocular region was collected by TIV, and rectal temperature by clinical thermometer. Semen samples were collected and analyzed for kinetics and morphology. The statistical analysis was performed by SAS[®]. The surface temperatures of the scrotum were not related to the spermatic kinetics, however, there was a correlation between the temperature of the distal pole of the scrotum and the minor defects. There were correlations between the temperatures measured by TIV and the rectal temperature. In conclusion, the temperatures evaluated by TIV aren't correlated with the seminal quality of Nelore bulls.

Keywords: thermography; semen; reproduction.

Palavras-chave: termografia; sêmen; reprodução.

Introdução - A utilização de touros a campo em regime extensivo é o mais empregado na pecuária nacional, tornando a avaliação andrológica de extrema importância para melhor eficiência reprodutiva. Dentre as etapas do andrológico, a avaliação seminal é uma das mais importantes, sendo a motilidade e morfologia espermática parâmetros relevantes para melhor prever o potencial reprodutivo dos touros¹. Os mecanismos de termorregulação são essenciais para uma espermatogênese normal, visto que as altas temperaturas podem ser po-

¹ UNESP-FCAV.

² Universidade Federal de Juiz de Fora.

³ Centro APTA Bovinos de Corte, IZ.

⁴ UNISA- Universidade Santo Amaro.

tencialmente prejudiciais a qualidade do sêmen². A técnica de termografia infravermelha (TIV) tem sido usada para auxiliar estudos sobre a termorregulação dos animais, pois fornece informações relevantes sobre a circulação sanguínea e o metabolismo dos tecidos³. Portanto, o objetivo do presente estudo foi mensurar temperatura corporal de touros Nelore por meio de TIV e relaciona-las com qualidade seminal.

Material e Métodos - O trabalho foi realizado no Instituto de Zootecnia (Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Bovinos de Corte) situado no município de Sertãozinho/SP/Brasil, no período de setembro a novembro de 2018. Foram realizadas 51 colheitas de sêmen em 17 touros da raça Nelore (*Bos indicus*), com idade entre 24 e 36 meses. As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de eletroejaculador (Autojac[®], Neovet[®], Uberaba, MG, Brasil). Após a colheita, a avaliação da cinética espermática do sêmen fresco foi determinada por meio do sistema de Análise Computadorizada do Movimento Espermático (CASA; Hamilton Thorne Research, IVOS-14, EUA) e os seguintes parâmetros analisados: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %) e células rápidas (RAP, %)⁴ among them are the cooling and freezing rates which significantly influence the quality of thawed sperm. Different systems with variable freezing rates are used for freezing bull semen in the field, with a consequence of variable success rates. The objective of this study was to compare different systems for freezing bull semen in the field. Five cooling methods of semen and two methods for the subsequent freezing phase (5 × 2 factorial scheme. Para análise da morfologia espermática cada alíquota de sêmen foi diluída em solução de formol salina 4% e avaliada sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) com imersão de 100x (Nikon, NiU, Japan). Foi realizada contagem de 200 células por amostra e as anormalidades classificadas em defeitos maiores (DefM, %), menores (Defm, %) e totais (DefT, %) conforme recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal⁵.

As temperaturas da região do testículo e olho foram mensuradas por meio termografia infravermelha (TIV), utilizando uma câmera termográfica comercial (FLIR TR420, FLIR Systems Inc., EUA). O valor de emissividade (0,98) foi ajustado, assim como a configuração da câmera calibrada, de acordo com a recomendação do fabricante. Na captura das imagens, foi considerada a distância padronizada para os testículos (1m) e olho (50cm), ambas orientadas perpendicularmente ao alvo. O software Researcher IR 4 (FLIR Systems Inc., EUA) foi utilizado para calcular os valores máximos e mínimos de cada campo de medição. Para as medições dos testículos, foram traçadas quatro linhas (TPP: temperatura do polo proximal; TPI1: Temperatura do polo intermediários 1; TPI2: Temperatura do polo intermediários 2; TPD: Temperatura do polo distal) de um lado a outro do testículo segundo metodologia adaptada de Menegassi et al.⁶. Para as medições da região do olho, foram consideradas as regiões do globo ocular (GOB) e da carúncula lacrimal (CAR). A Figura 1 apresenta o esquema de análise da região escrotal e ocular. A temperatura retal também foi mensurada por meio de termômetro clínico digital. As variáveis foram analisadas pelo PROC CORR (correlação de Pearson) do programa SAS[®] e o nível de significância adotado pelo teste de Tukey foi de 5%.

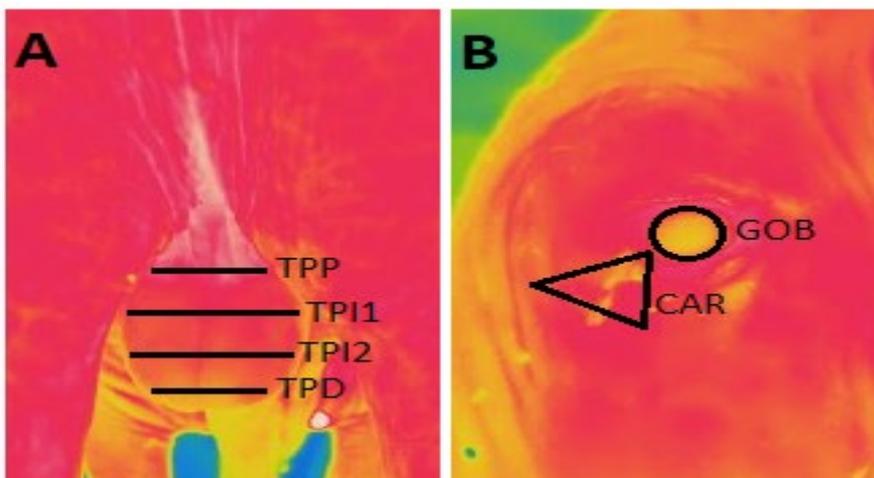


Figura 1. Análises termográficas. A: termograma da região escrotal; B: termograma da região ocular; TPP: temperatura do polo proximal; TPI1: Temperatura do polo intermediários 1; TPI2: Temperatura do polo intermediários 2; TPD: Temperatura do polo distal; GOB: globo ocular; CAR: carúncula lacrimal.

Resultados e Discussão - No primeiro momento, foram calculadas as correlações entre as linhas traçadas nos testículos. As linhas TPP e TPI1 apresentaram correlações de 0,94 ($P \leq 0,05$) e as linhas TPI2 e TPD de correlação de 0,93 ($P \leq 0,05$). Uma vez identificada a correlação entre as linhas, para as análises posteriores, foi considerada apenas as linhas TPP e TPD. Na Tabela 1, são apresentados os valores de correlação entre as temperaturas corporais e características espermáticas.

Não foi observada correlação entre as TPP e da TPD com os parâmetros de cinética obtidos pelo CASA (MT, MP e RAP), entretanto, TPD e Defm apresentaram correlação significativa de 0,31. Apesar de significativo, a correlação é considerada de moderada a baixa, sendo que mais estudos e novas análises são necessários para esclarecer os resultados do presente estudo. Kastelic et al.² relataram resultados semelhantes ao presente estudo, entretanto Menegassi et al.⁶ observaram influência da variação da temperatura escrotal na qualidade seminal de touros Braford. Segundo Kastelic et al.² a relação entre a temperatura testicular e a qualidade seminal é bastante complexa e ainda não está totalmente elucidada.

A temperatura retal foi correlacionada com todas as demais medidas de temperatura corporal. Foi observado correlação entre a temperatura da região ocular e a temperatura retal, corroborando com Schaefer et al.⁷ que relataram que a região ocular é a melhor preditora do estado térmico do animal, por possuir vasos sanguíneos calibrosos que respondem as mudanças na temperatura interna do animal⁷.

Tabela 1. Correlação entre as características de temperatura medidas por termografia infravermelha (região do escroto e região do olho), temperatura retal e características da qualidade de sêmen.

	MT(%)	MP(%)	RAP(%)	Def M(%)	Def m(%)	Def T(%)	T retal(° C)
Região Escroto							
TPP(max)(° C)	0.04	0.05	0.09	-0.03	0.14	0.07	0.65**
TPP(min)(° C)	0.06	0.03	0.17	-0.09	0.12	0.03	0.66**
TPD(max)(° C)	-0.08	-0.01	-0.01	-0.14	0.23	0.07	0.70**
TPD(min)(° C)	0.00	-0.05	0.10	-0.0	0.31*	0.17	0.68**
Região do olho							
GB(max)(° C)	0.05	-0.08	0.15	-0.06	0.17	0.06	0.53**
GB(min)(° C)	0.05	-0.11	0.08	-0.14	0.31*	0.11	0.52**
CAR(max)(° C)	0.04	-0.07	0.16	-0.08	0.14	0.05	0.72**
CAR(min)(° C)	0.26*	-0.01	0.27*	0.08	0.13	0.14	0.61**

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$ MT(%): motilidade total; MP(%): motilidade progressiva; RAP(%): espermatozoides com movimento rápido; DefM(%): defeito maior; Defm(%): defeito menor; DefT(%): defeito total; Tretal(°C): temperatura retal; TPP: temperatura do polo proximal; TPD: temperatura do polo distal; GB: globo ocular; CAR: carúncula lacrimal; max: temperatura máxima; min: temperatura mínima; °C: graus celsius.

Considerações Finais – As temperaturas avaliadas por TIV não estão correlacionadas com a qualidade seminal de touros Nelore.

Referências bibliográficas

- [1] Varner DD. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*. 2008;70(3):448–62.
- [2] Kastelic JP, Cook RB, Pierson RA, Coulter GH. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. *Can J Vet Res*. 2001;65(2):111–5.
- [3] Calogero Stelletta, Matteo Giancesella, Juri Vencato EF and MM. Thermographic Applications in Veterinary Medicine. *Infrared Thermogr*. 2012;2:117–40.
- [4] Dias EAR, Campanholi SP, Rossi GF, Freitas Dell’Aqua C de P, Dell’Aqua JA, Papa FO, et al. Evaluation of cooling and freezing systems of bovine semen. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2018;195:102–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.012>.
- [5] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. p.91.
- [6] Menegassi SRO, Barcellos JOJ, Dias EA, Koetz C, Pereira GR, Peripolli V, et al. Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in Braford bulls. *Int J Biometeorol*. 2015;59(3):357–64.
- [7] Schaefer AL, Cook N, Tessaro S V., Deregt D, Desroches G, Dubeski PL, et al. Early detection and prediction of infection using infrared thermography. *Can J Anim Sci*. 2004;84(1):73–80.

Agradecimentos: A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida a primeira autora e a Botupharma®.

Influência do grupo genotípico bovino sobre características dos testículos, epidídimos, fluxos das artérias testiculares e sêmen

Naiara Nantes Rodrigues¹
naiara_nantes@hotmail.com

Guilherme Fazan Rossi¹

Dayane Priscila Vrisman¹

Anielly de Paula Freitas²

Fabio Morato Monteiro³

Maria Emilia Franco Oliveira¹
m_emiliafraoli@yahoo.com.br

Abstract: The aim was to characterize and compare biometrics testicular, ultrasonographic attributes of the testes and epididymis, velocimetric indices of the testicular arteries and seminal parameters in Nelore and Caracu bulls. Data were analyzed by PROC MIXED ($p < 0.05$). Testicular biometrics, pixel intensity and pixel heterogeneity differed between breeds ($p < 0.0001$). The pulsatility ($p = 0,0001$) and resistance indices ($p = 0,001$) of the testicular arteries were higher in Nelore than Caracu bulls. The percentages of fast spermatozoa and minor defects were not different between breeds. Mass movement, vigor, sperm concentration and total sperm motility were higher in Nelore compared to Caracu animals. The major and total defects were higher in Caracu than in Nelore bulls. In conclusion, dopplervelocimetric characteristics of the testicular arteries, echogenicity and ecotexture of the testicular parenchyma are influenced by the genetic group. Furthermore, Nelore animals appear to have superior seminal quality when compared to Caracu animals.

Keywords: andrological; ultrasonographic; Espectral Doppler, breed, bovine.

Palavras-chave: andrológico; ultrassonografia; Doppler Espectral, raça, bovinos.

Introdução – Os bovinos são pertencentes a família *Bovidae* e divididos em dois gêneros: *Bos taurus taurus* (animais de origem europeia) e *Bos taurus indicus* (animais originalmente encontrados na Índia, Ásia e África) [1]. A raça Nelore é a raça *Bos taurus indicus* mais difundida no Brasil e bem adaptada as condições tropicais brasileiras. Já os animais Caracu, uma raça crioula brasileira, é pertencente ao gênero *Bos taurus taurus* e ao longo dos séculos têm se adaptado as condições climáticas em território brasileiro e formado animais nativos. Estes animais são classificados como taurinos adaptados, reconhecidos por serem rústicos [2]. A unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, no estado de São Paulo

¹ FCAV-UNESP.

² Faculdade de Medicina de Ribeirão – USP.

³ Centro APTA Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia.

é o mais importante centro de melhoramento genético da raça Caracu [3]. Com relação as características reprodutivas são descritas diferenças entre os genótipos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Exemplos disto é o formato testicular mais alongado em *Bos taurus indicus* e a idade a puberdade mais precoce e maior volume de ejaculado em *Bos taurus taurus* [4]. Outras diferenças podem existir e devem ser consideradas quando realizada a avaliação reprodutiva de touros. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar os atributos ultrassonográficos dos testículos e epidídimos, os índices dopplervelocimétricos das artérias testiculares e os parâmetros seminais em touros Nelore e Caracu.

Material e Métodos - O trabalho foi realizado no Instituto de Zootecnia, no município de Sertãozinho, SP, entre outubro de 2016 e janeiro de 2017. Os touros foram agrupados de acordo com a raça: (1) animais da raça Caracu (n= 80, 20,7 ± 13,3 meses e 473,9 ± 133,1 Kg); e (2) animais da raça Nelore (n= 212, 20,5 ± 14,3 meses e 431,8 ± 169,6 Kg). O perímetro escrotal (PE) foi obtido com uma fita milimétrica no maior diâmetro do escroto, os comprimentos (dorsoventral) e diâmetros (medio-lateral) dos testículos foram medidos com uma régua, e o volume testicular calculado usando a fórmula: $V = 2 \{(R2) \times \pi \times TL\}$, onde R = raio (diâmetro / 2), TL = comprimento testicular e $\pi = 3,14$. Avaliações ultrassonográficas (US) modo-B e Doppler espectral foram realizadas com equipamento ultrassonográfico portátil (Mindray Z5[®], Shenzhen, China) acoplado a um transdutor transretal linear na frequência de 7,5 MHz. Os exames de US iniciaram pelos testículos, epidídimos e índices vasculares das artérias testiculares, sendo eles, o índice de pulsatilidade (IP), índice de resistência (IR), pico de velocidade sistólica (PVS) e velocidade diastólica final (VDF), por via transcutânea na bolsa escrotal e região dos cordões espermáticos. As imagens US foram analisadas pelo *software* Image Pro Plus 7.0TM (MediaCybernetics Inc., San Diego, CA, USA) para determinação da ecogenicidade (valores numéricos de pixels) e ecotextura (desvio padrão dos valores médios de pixel). Os touros tiveram sêmen colhido com auxílio de eletroejaculador (Autojac[®], Neovet[®], Uberaba, Brasil).

As amostras seminais foram avaliadas quanto as características físicas (turbilhonamento, vigor e concentração espermática) e morfológicas (percentual de defeitos maiores, menores e totais), segundo normas do CBRA [5]. Por meio do sistema de Análise Computadorizada do Movimento Espermático (CASA) foi avaliado motilidade total (%MT), motilidade progressiva (%MP) e *espermatozoides* com movimento *rápido* (%RAP). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o PROC MIXED do programa SAS e nível de significância de 5% (P<0,05).

Resultados e Discussão – Foram observadas diferenças entre raças para as características de biometria testiculares (PE, comprimento, diâmetro e volume testicular), assim como para as características de ecogenicidade e ecotextura do parênquima testicular. Os índices vasculares das artérias testiculares (IP, IR e VDF) também diferiram entre as raças. Além disso, as características seminais apresentaram diferenças entre Nelore e Caracu, demonstrando melhor qualidade seminal em animais da raça Nelore (Tabela 1). A análise computadorizada

de imagens US para determinação da ecogenicidade e ecotextura de parênquima de órgãos reprodutivos tem mostrado alta precisão no acompanhamento do desenvolvimento sexual de touros [6]. No presente estudo, os parâmetros de pixels avaliados nos testículos foram menores nos touros da raça Caracu em relação aos da raça Nelore. Estes achados parecem ter relação com particularidades genóticas. A menor ecogenicidade registrada para os animais da raça Caracu provavelmente está relacionada a maior precocidade sexual destes indivíduos. Adicionalmente, as características de ecotextura do parênquima testicular tem alta correlação com a área dos túbulos seminíferos [7], indicando ter também bom potencial na avaliação da função testicular. Apesar das importantes funções do epidídimo na determinação da capacidade reprodutiva dos touros, não foram encontradas relações entre grupos genóticos e características ultrassonográfica deste órgão.

Os índices de pulsatilidade e resistência foram menores em touros da raça Caracu em relação aos da raça Nelore, provavelmente devido a diferença de formato testicular e conseqüentemente, necessidade de perfusão sanguínea entre os grupos genéticos. A velocidade diastólica final foi maior nos touros da raça Caracu, o que pode ter também relação com a necessidade de um aporte sanguíneo com maior velocidade para atingir todo o tecido testicular, uma vez que animais *Bos taurus taurus* apresentam maior PE, o qual está intimamente relacionado a área testicular maior, a ser vascularizada.

A avaliação seminal evidenciou melhores índices para animais da raça Nelore, como turbilhonamento, vigor, concentração espermática e %MT, enquanto que os percentuais de defeitos maiores e totais, foram maiores em animais da raça Caracu, sendo que os defeitos de cauda (cauda fortemente dobrada) e gota protoplasmática proximal foram os mais observados, em 86% e 82,8% dos animais avaliados, respectivamente. Os motivos pelos quais a avaliação seminal foi melhor na raça Nelore, provavelmente são devidos animais *Bos taurus indicus* serem mais resistentes e adaptados aos trópicos e estresse térmico, enquanto animais *Bos taurus taurus* possuem termogênese menos eficiente [8].

Tabela 1. Média e erro padrão da média da ecogenicidade (valor numérico de pixel) e ecotextura (desvio padrão de pixels) dos parênquimas testiculares e epididimários, dos índices de fluxo sanguíneo das artérias testiculares e das características seminais apresentados para os efeitos de raças (Nelore e Caracu).

Variáveis	Nelore	Caracu	P
Biometria Testicular			
Perímetro Escrotal	29,59 ± 0,18	34,99 ± 0,31	0,0001
Comprimento Testicular	10,03 ± 0,07	12,17 ± 0,12	0,0001
Diâmetro Testicular	5,87 ± 0,05	6,28 ± 0,08	0,0001
Volume Testicular	188,58 ± 2,62	242,96 ± 4,29	0,0001
Parênquima Testicular			
Ecogenicidade	84,03 ± 1,08	74,57 ± 1,61	0,0001
Ecotextura	14,39 ± 0,11	13,24 ± 0,17	0,0001
Parênquima Epididimário			
Ecogenicidade	68,31 ± 0,72	70,49 ± 1,07	0,0829
Ecotextura	18,85 ± 0,25	18,25 ± 0,38	0,1798

>continua

Variáveis	Nelore	Caracu	P
Fluxo das artérias testiculares			
Índice de Pulsatilidade	0,76 ± 0,02	0,52 ± 0,03	0,0001
Índice de Resistência	0,50 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,001
Pico de Velocidade Sistólica (cm/s)	17,38 ± 3,09	16,35 ± 4,70	0,85
Velocidade Diastólica Final (cm/s)	7,67 ± 0,50	10,75 ± 0,77	0,0007
Características seminais			
Turbilhonamento	2,52 ± 0,20	1,69 ± 0,25	0,0055
Vigor	2,74 ± 0,08	2,43 ± 0,11	0,0334
Concentração (x10 ⁶ /mL)	652,42 ± 61,45	447,62 ± 75,31	0,020
Motilidade Progressiva (%)	60,55 ± 1,81	62,98 ± 2,20	0,3521
Motilidade Total (%)	80,59 ± 2,16	80,53 ± 2,63	0,0011
Espermatozoides rápidos (%)	78,21 ± 2,27	76,20 ± 2,76	0,5409
Defeitos Maiores (%)	3,47 ± 0,54	6,86 ± 0,82	0,0005
Defeitos Menores (%)	2,54 ± 0,24	3,25 ± 0,37	0,1036
Defeitos Totais (%)	11,47 ± 1,92	19,52 ± 2,34	0,0044

Considerações Finais - As características dopplervelocimétricas das artérias testiculares e a ecogenicidade e ecotextura dos testículos e epidídimos foram caracterizados como referência de normalidade para bovinos e sofrem influência do grupo genético. A avaliação seminal demonstrou qualidade seminal superior em touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) quando comparado a qualidade seminal de touros Caracu (*Bos taurus taurus*).

Referências bibliográficas

- [1] Santiago, AA. **O Zebu na Índia, Brasil e no mundo**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, p. 706, 1985.
- [2] Lima, MLP; Neto, LMB.; Razook, AG. O gado Caracu. **Revista dos Criadores**. Brasil, outubro, 1990; p. 28 – 30.
- [3] Mercadante, MEZ. Caracu, o *Bos taurus* brasileiro adaptado aos trópicos: experiências de um programa de seleção para peso ao sobreano. **Agrociência**, v.9, n.1, p.485-494, 2005.
- [4] Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues LH, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP (2002) Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science** 70:181–190.
- [5] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** (CBRA). 3rd ed. Belo Horizonte; 2013.
- [6] Chandolia RK, Honaramooz A, Omeke BC, Pierson R, Beard AP & Rawlings NC. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. **Theriogenology**, 1997; 48, 119–132.
- [7] Gábor, G.; Sasser, R. G.; Kastelic, J. P.; Mézes, M.; Falkay, G.; Bozó, S.; Volgyi Csík, J.; Bárányi, I.; Hidas, A.; Szász, E.; Boros, G. Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. **Theriogenology**, 1998; 50, 223–228.
- [8] Turner, J. Genetic and biological aspects of zebu adaptability. **Journal. Animal Science**, 1980; 50, 1201–1205.

Agradecimentos: A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Perfil andrológico de ovinos de diversos grupamentos genéticos no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil

Marcos Vargas da Silveira¹

E-mail: marcos.vetufms@gmail.com

Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo²

Ana Cristina Andrade Bezerra³

Joana Carolina Trindade Barbosa⁴

Fernanda Battistotti Barbosa⁵

Breno Fernandes Barreto Sampaio⁶

Eliane Vianna da Costa e Silva⁶

eliane.silva@ufms.br

GERA-MS – Grupo de Estudos em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul

Abstract: The clinical andrological evaluation is fundamental to characterize the reproductive potential of the males. The objective of this study was to find clinical parameters for the andrological evaluation of rams of different breeds from the state of Mato Grosso do Sul. The breeding soundness evaluation of the rams followed the methodology suggested by the Brazilian College of Animal Reproduction. The scrotal circumference was lower than that recorded in the national literature. Seminal characteristics (vigour, major and total defects) varied significantly according to breed and age category but didn't compromise reproductive fitness. The breeds established in this study show lower andrological developmental / age characteristics than expected for rams in other regions, indicating environmental interference in sexual development.

Keywords: breeding soundness evaluation; rams, semen.

Palavras-chave: exame andrológico; ovinos; sêmen.

Introdução - O exame clínico andrológico é fundamental pois tem como princípio caracterizar a potencialidade reprodutiva dos machos, que é composta por um exame clínico geral, avaliação do locomotor, exame da genitália externa, avaliação dos aspectos físicos do ejaculado e das características morfológicas dos espermatozoides. O número de técnicos veterinários com experiência em ovinocultura no Mato Grosso do Sul ainda é pequeno e faltam subsídios quanto aos parâmetros clínicos de normalidade que compõem o exame andrológico, bem como os efeitos das condições ambientais regionais sobre o desenvolvimento reprodutivo desta espécie.

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS.

² Programa de Residência em Reprodução de Grande Animais, HV/UEL.

³ Médica Veterinária.

⁴ Acadêmica de graduação em Medicina Veterinária/UFMS.

⁵ Pós-graduação em Ciência Animal, FAMEZ/UFMS.

⁶ Docente da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

O objetivo desse trabalho é caracterizar o perfil andrológico de carneiros de diferentes raças, de modo a subsidiar médicos veterinários quanto aos parâmetros clínicos em exames andrológicos, considerando as variações entre estações, mantidos em sistema extensivo no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

Material e Métodos - Neste trabalho foi utilizado o banco de dados de exames andrológicos de prestação de serviço do LRA-UFMS/FAMEZ com 207 animais de nove raças distintas (Bergamacia, Dorper, Hampshire, Ile de France, Pantaneira, Santa Inês, Suffolk, Texel e White Dorper), avaliados nos meses de abril, setembro, outubro e novembro. Os animais são oriundos de 16 criatórios do estado de Mato Grosso do Sul. O sistema de criação das propriedades caracteriza-se por sistema extensivo e suplementação com sal mineral.

O exame clínico foi realizado de acordo com a metodologia proposta por [1] incluindo-se exame clínico da genitália externa, biometria testicular, coleta do ejaculado por eletroejaculação, aspectos físicos do ejaculado e morfológicos.

Para efeito de análise, os animais foram categorizados por idade em faixas etárias: 6 meses (≤ 10 meses); 10 (≥ 10 a < 12 meses); 12 (≥ 12 a < 18 meses); 18 (≥ 18 a < 24 meses); 24 (≥ 24 a < 30 meses); 30 (≥ 30 a < 36 meses); 36 (≥ 36 a < 48 meses) e 48 (≥ 48 meses).

Analisou-se os dados por meio de análise de variância considerando os efeitos fixos de estação, faixa etária e raça sobre as características de perímetro escrotal (PE), motilidade (MOT), vigor (VIG), concentração/ml (CONC), defeitos maiores (DMA), defeitos menores (DME) e defeitos totais (DTT) todos transformados em raiz quadrada de $x + 1$. As médias foram comparadas por meio de teste de Duncan entre faixas etárias e teste de t de Student entre estação seca e chuvosa, considerando o nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão - O crescimento testicular apresentou uma curva linear de regressão com interação entre a categoria de idade e raça ($P < 0.0001$), no entanto o PE médio por faixa etária é menor que o sugerido por [1]. O PE médio foi 30.97 ± 0.23 cm, observou-se variação em função de raça ($P = 0.0038$) e idade ($P < 0.001$). Como esperado houve interação entre idade e raça ($P = 0.0002$), Figura 1. Em média eles atingem o PE maior em torno dos 30-35 meses apresentando a partir daí uma curva mais lenta. Considerando as raças observou-se PE médio de $32,23 \pm 1,09$; $31,88 \pm 0,66$; $30,00 \pm 0,0$; $33,03 \pm 0,47$; $30,17 \pm 0,42$; $31,43 \pm 0,54$; $28,87 \pm 0,49$; $30,32 \pm 0,92$; $31,82 \pm 1,09$ para Bergamacia (n=4); Dorper (n=28); Hampshire (n=2); Ile de France (n=37); Pantaneira (n=44); Sta. Inês (n=22); Suffolk (n=38); Texel (n=18); White Dorper (n=14), respectivamente.

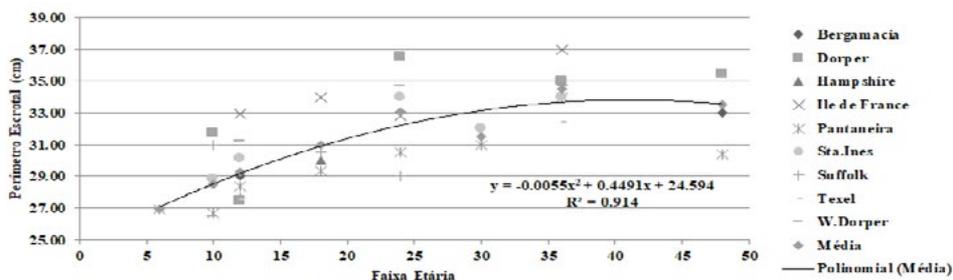


Figura 1. Distribuição média do perímetro escrotal de carneiros de diversas raças de ovinos em função da faixa etária criados a pasto no Estado de Mato Grosso do Sul.

Em carneiros, alguns autores sugerem que o perímetro escrotal dos animais adultos atinjam o valor mínimo de 32 cm na idade adulta e que a maturidade parece ser alcançada aos 14 meses de idade [2] ou quando comparado aos dados brasileiros [1] apresentam 32cm de PE aos 11.2 meses. Observa-se que a curva de crescimento testicular alcança estabilidade em torno dos 35 meses, período em que os defeitos morfológicos das células espermáticas também estabilizam. Este perfil de estabilização das características seminais é tido por [3] como característico da maturidade sexual. As condições climáticas regionais associadas a criação extensiva podem explicar o atraso na maturidade sexual comparados aos registros da literatura [4].

Quanto aos aspectos físicos do sêmen, a motilidade e o vigor variaram significativamente em função da interação idade e raça ($P=0,0007$ e $P<0,001$, respectivamente), com pico máximo de qualidade aos 30 meses de idade. Quanto à morfologia espermática observou-se que o modelo adotado foi significativo para DMA ($P=0,0001$, $R^2=0,6019$, $CV=31,90\%$) e DTT ($P=0,0001$, $R^2=0,5371$, $CV=28,94\%$). DMA variaram significativamente ($P<0,05$) em função da raça e idade e estação, tendo sido observada interação entre idade e raça. DME não apresentaram nenhuma diferença significativa ($P>0,05$). Para DTT, a estação, raça e a interação entre idade e raça (Figura 2) foram significativas ($P<0,05$).

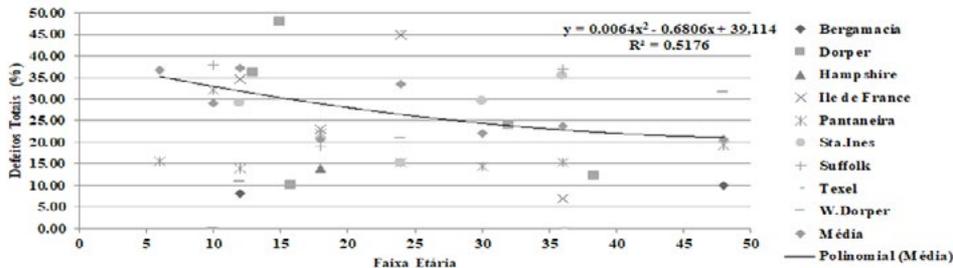


Figura 2. Distribuição média dos defeitos totais observados no ejaculado de carneiros de diversas raças de ovinos em função da faixa etária criados a pasto no Estado de Mato Grosso do Sul.

Os valores médios de aspectos físicos do sêmen por faixa etária apresentam-se abaixo ao sugerido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [1], que sugere motilidade > 75%, e

10% de defeitos totais. No entanto, encontra-se na literatura sugestões de critérios mais tolerantes para motilidade e alterações morfológicas espermáticas como os Padrões sugeridos pela Universidade de Purdue [2] ou pela Universidade de Ohio [5] que considera satisfatório o ejaculado com 30 a 80% de células normais e 30 a 70% de motilidade. Essas instituições utilizam um critério clínico diferente do adotado no Brasil. É preciso avaliar o impacto dessa flexibilidade clínica sobre a fertilidade do rebanho ovino nas nossas condições.

Considerações Finais – As raças estabelecidas nessa região apresentam características andrológicas de desenvolvimento por faixa etária menores do que o esperado para ovinos em outras regiões, indicando interferência ambiental no desenvolvimento sexual. Os parâmetros clínicos andrológicos de carneiros no estado de Mato Grosso do Sul precisam ser definidos.

Referências bibliográficas

- [1] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** (CBRA). 3rd ed. Belo Horizonte; 2013.
- [2] Pezzanite L, Bridges A, Neary M, Hutchens T. Breeding Soundness Examinations of Rams and Bucks. **Purdue Extension Animal Sciences** 2010; 1-4.
- [3] Vale Filho VR. Padrões de sêmen bovino para o Brasil: análise e sugestões. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Brasil. Belo Horizonte: CBRA 1989; 94 – 118.
- [4] Rocha DR, Martins JA, Tilburg MF, Oliveira RV, Moreno FB, Monteiro-Moreira AC. Efeito do aumento da temperatura testicular no proteoma do plasma seminal do carneiro. **Theriogenology** 2015; 84; 1291 - 1305.
- [5] Breeding Soundness evaluation form [homepage on the Internet]. Ohio University 2010. Available from: <https://www.pdfFiller.com/20345662-RamBreedingSoundnessEvalpdf>. Accessed in: Dez 2nd 2018.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À ASMAGO – Associação dos criadores de ovinos de Mato Grosso do Sul pelo apoio.

Perfil andrológico de touros F1 ½ Angus+ ½ Nelore e respostas termográficas em silvipastoril

Ariadne Pegoraro Mastelaro¹

Fabiana Villa Alves²

Alessandra Corallo Nicacio²

Eliane Vianna da Costa-e-Silva³

eliane.silva@ufms.br

Maity Zopollatto¹

Abstract: The objective was to verify the correlation between reproductive responses and thermal regulation of the scrotum under two systems of silvipastoral production and no-tree pasture of ½ Angus + ½ Nelore males. The experiment was conducted at Fazenda Boa Aguada, Ribas do Rio Pardo, MS, from October 2018 to March 2019. Ten animals ½ Angus + ½ Nelore were used, four in the silvipastoral system and six in the no-tree pasture. To evaluate the reproductive responses, they were submitted to seminal collection attempts to analyze the andrological profile. At the same time, a scrotal temperature was measured using an infrared imager. The images obtained were analyzed by the software IRSoft software. The data set was submitted to an analysis of variance ($p < 0.05$), t test, by the SAS package. In the silvipastoral system, the scrotum temperatures (1, 2, 3 and Max) were higher and the morphological aspects of the ejaculate were worse showing that the highest temperature in the testicles may have compromised the qualitative evolution of spermatogenesis expected at this age.

Keywords: ILPF, infrared thermography, testicular thermoregulation.

Palavras-chave: ILPF, termografia, termorregulação testicular.

Introdução – O estresse por calor pode ter maior influência nos bovinos criados em regime de pastejo nas regiões tropicais [1], causando alterações em respostas, fisiológicas, produtivas e reprodutivas. Nesta condição, o fornecimento de sombra natural é uma das formas mais econômicas e de melhor resultado na mitigação do estresse térmico [2], fazendo-se necessário para preservação de bons parâmetros zootécnicos reprodutivos. Dessa forma, foi realizado um estudo com o objetivo de verificar correlações entre as respostas reprodutivas e regulação térmica do escroto sob dois sistemas de produção (silvipastoril e pastagem sem árvores) de machos ½ Angus+ ½ Nelore, no Centro-Oeste brasileiro.

Material e Métodos - O experimento foi conduzido na Unidade de Referência Tecnológica (URT) da Embrapa Gado de Corte, instalada na fazenda Boa Aguada, no município de Ribas

¹ Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, PR.

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa, Campo Grande, MS.

³ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, MS.

do Rio Pardo - MS, (20°26'34"S, 53°45'32"W, elevação média 312m, faixa tropical úmido - Aw, com precipitação de 1.500 mm e temperatura anual média de 26°C), implantada em 2016. As duas áreas avaliadas (silvipastoril e pastagem pura) possuem 4,01 ha cada, e são formadas com capim-piatã (*Brachiaria brizantha* cv. BRS Piatã). O arranjo com árvores é do tipo 28x2m (linha simples), sendo que o componente arbóreo é formado por híbridos de eucalipto (*Citriodora*, *Urograndis* (I 144), *Urocam* (VM 01) e *Toleriodora*). O período experimental foi de outubro de 2018 a março de 2019. Foram utilizados um total dez machos bovinos ½ Angus + ½ Nelore, sendo que seis desses estavam na pastagem convencional e quatro no silvipastoril. No início experimental, os animais tinham em média 13,5 meses de idade e 358,5 kg, e estavam clinicamente saudáveis. Para a avaliação do perfil andrológico, os animais foram submetidos a três tentativas de coleta seminal nos meses de dezembro, janeiro e março. O método utilizado foi eletroejaculação com análise quantitativa e qualitativa do ejaculado de acordo com a metodologia de [3]. Além do perfil andrológico, foi determinada a temperatura do escroto, com auxílio de um termovisor de infravermelho, Testo modelo 875i (*Testo thermal imager*), e analisador de imagens Testo, do programa IRSoft software. Determinado assim as seguintes temperaturas: máxima do escroto (TE máx, °C.), mínima do escroto (TE mín, °C), cranial (TE1, °C), medial (TE2, °C) e caudal (TE3, °C), nos meses de outubro, dezembro, janeiro e março. As variáveis dependentes foram submetidas a análise de variância considerando o efeito fixo de sistemas, período avaliado e peso como covariável. Médias foram comparadas por teste t de student (p<0,05) utilizando-se o pacote estatístico SAS.

Resultados e Discussão - Embora sistemas de produção do tipo silvipastoris estejam sempre associados a maior grau de bem-estar animal, características como arranjo, densidade, espécie e altura das árvores influenciam na quantidade e qualidade da sombra ofertada, e, por consequência, na capacidade de mitigação do estresse térmico da área e melhorias nos aspectos reprodutivos. O ITGU médio observado no período experimental foi maior na pastagem 77,91 ± 0,27 vs 77,25 ± 0,38 no sistema silvipastoril. Nas condições deste estudo, as variáveis como de temperatura escrotal diferiram significativamente sendo superiores no sistema silvipastoril (Tabela 1), embora o sombreamento tenha favorecido o ITGU.

Tabela 1. Respostas termográficas e reprodutivas sob dois sistemas de produção (silvipastoril e pastagem sem árvores).

Variáveis	Sistemas	
	Silvipastoril	Pastagem
Idade	16,25 ± 0,59 a	16,56 ± 0,48 a
Peso	421,13 ± 13,11 a	420,56 ± 12,52 a
TE1 (°C)	37,19 ± 0,59 a	35,80 ± 0,26 b
TE2 (°C)	35,09 ± 0,26 a	34,40 ± 0,21 b
TE3 (°C)	33,74 ± 0,18 a	33,35 ± 0,20 b
TE máx (°C)	37,47 ± 0,25 a	35,91 ± 0,40 b
TE mín (°C)	31,76 ± 0,20 a	31,80 ± -,29 a
PE (cm)	33,72 ± 0,72 a	32,42 ± 0,49 a
Motilidade (%)	66,36 ± 4,91 a	71,76 ± 3,56 a

>continua

Variáveis	Sistemas	
	Silvipastoril	Pastagem
Vigor (1-5)	2,29 ± 0,15 a	2,66 ± 0,17 a
Volume (ml)	3,14 ± 0,61 a	2,95 ± 0,33 a
Concentração (x 10 ⁶ /mL)	134,31 ± 60,38 a	136,01 ± 34,14 a
Defeito maior (n)	35,18 ± 0,74 a	21,95 ± 5,86 b
Defeito menor (n)	8,95 ± 1,87 a	8,80 ± 2,05 a
Defeito total (n)	44,14 ± 7,97 a	30,71 ± 5,98 b

No sistema silvipastoril, as temperaturas de escroto (1,2,3 e máx) foram maiores (37,1°C; 35°C; 33,7°C e 37,5°C), respectivamente. Se faz importante a ressalva que, os testículos possuem um gradiente de temperatura, opostos e complementares, que mantêm a temperatura testicular entre 2 °C e 6 °C mais baixa que a temperatura corporal central, para que ocorra uma produção de esperma fértil, ultrapassando esses valores, é possível reduzir a qualidade do sêmen [4]. A temperatura escrotal observada por termografia neste experimento foi superior ao observado na literatura. A maior temperatura escrotal registrada no sistema silvipastoril poderia ser explicada por outros fatores que favoreceriam a termorregulação não considerados no índice adotado, como velocidade e direção do ventos, que em sistemas integrados com maior densidade de árvores eventualmente pode haver uma restrição de circulação de ventos, desfavorecendo a termólise [5].

Os aspectos morfológicos do espermatozoide foram piores no sistema silvipastoril mostrando que a temperatura mais elevada nos testículos pode ter comprometido a evolução qualitativa da espermatogênese esperada nesta idade.

Considerações Finais – A presença de árvores, em arranjos ordenados na densidade de 28x 2 m, não proporcionou melhoria na termorregulação testicular e no desenvolvimento sexual de touros cruzados

Referências bibliográficas

- [1] Alves, FV, Nicodemo, MLF, Porfírio-da-Silva, V. Bem-estar animal em Sistema de Integração Lavoura-Pecuária-Floresta. In: Cordeiro LAM, Vilela L, Kluthcouski J, Marchão RL (eds) **Integração Lavoura-Pecuária-Floresta: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, Embrapa, p. 274–287, 2015.
- [2] Romanello, N, Junior, JDBL, Junior, WB, Brandão, FZ, Marcondes, CR, Pezzopane, JRM, do Nascimento Barreto, A. Thermoregulatory responses and reproductive traits in composite beef bulls raised in a tropical climate. **International journal of biometeorology**, v.6, n.29, p.1575-1586, 2018.
- [3] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** (CBRA). 3rd ed. Belo Horizonte; 2013.
- [4] Kastelic, JP. Understanding and evaluating bovine testes. **Theriogenology**, v.81, p. 18–23, 2014.
- [5] OLIVEIRA, CC. **Sistema agrossilvipastoril no cerrado brasileiro: ambiência e fisiologia de bovinos Nelore**. 2017. 86 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

Agradecimentos: À Embrapa e seus funcionários; e à UFMS, pelo apoio concedido. Ao grupo Mutum, pela condução da área experimental. À FUNDECT, pela concessão de recursos financeiros.

Associações da biometria corporal, biometria testicular e características seminais de felinos (*Felis catus*) em um ambiente tropical

Isabella de Matos Brandão Carneiro¹

Rodrigo Freitas Bittencourt¹
rfb@ufba.br

Mónica Madrigal Valverde¹

Elton Amorim Romão¹

Gleice Mendes Xavier¹

Karita da Mata Fuchs¹

Catharina Albuquerque Vieira¹

Renata Oliveira Barreto¹

Lara Lôbo Dantas¹

Abstract: Body and testicular biometrics and their potential associations to seminal parameters can be used to select males for assisted reproduction programs. The aim of this study was to evaluate the correlation between the body and testicular biometrics to the seminal characteristics of felines. Thirteen adult domestic cats were measured at body measurements of head length and circumference, chest diameter, head length plus body length, tail length and total length. Testicular measurements of length, width and thickness were measured by three different methods. Through the testicular measurements the parameters of area, volume, testicular weight and gonadosomatic index (GI) were estimated. Seminal parameters evaluated in the fresh sample were: volume, sperm vigor, total motility, progressive motility, sperm concentration, structural and functional integrity of the plasma membrane and sperm morphology. High positive and significant correlations within the parameters of biometry, between the testicular parameters and within the seminal parameters were found.

Keywords: cats, andrological, testicular morphometry.

Palavras-chave: gatos, andrológico, morfometria testicular.

Introdução - O gato doméstico é modelo para a pesquisa em espécies silvestres de carnívoros, a pesquisa básica de aspectos físicos e fisiológicos é de essencial importância para a compreensão da reprodução da espécie felina e a aplicação da reprodução assistida em espécies de felinos em cativeiro [5]. Conhecer a biometria e sua potencial associação com os parâmetros seminais é informação inovadora que pode ser empregada na escolha de machos para programas de reprodução assistida. O objetivo desse estudo foi estabelecer os parâmetros biométricos corporais e testiculares de felídeos domésticos e suas correlações com parâmetros espermáticos [3].

¹ Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, CEP 40170-110 Salvador, Bahia, Brasil.

Material e Métodos - No presente estudo foram utilizados treze gatos machos, sem raça definida, sexualmente maduros, com idade entre 1 e 4 anos e peso médio de 4.50 ± 0.44 kg. Os animais foram anestesiados com agonista alfa-2 adrenérgico e posicionados em decúbito lateral para avaliação reprodutiva e corporal. A biometria corporal foi realizada com uma fita métrica plástica para mensurar comprimento e circunferência da cabeça, comprimento da cabeça mais corpo, comprimento da cauda, comprimento total e diâmetro torácico. Foram aferidas as medidas testiculares de comprimento, largura e espessura por meio de ultrassonografia (método 1) e paquímetro digital (método 2). Com as mensurações testiculares foram estimados os parâmetros de área, volume e peso testicular assim como índice gonadossomático (IG).

Para a colheita do sêmen foi utilizada uma sonda sem janela lateral (1mm de diâmetro x 13cm de comprimento), estéril e lubrificada. Avaliou-se vigor espermático, motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), concentração espermática, teste supravital (EOS), teste hiposmótico (HOST) e morfologia espermática. Foi realizada orquiectomia bilateral, com retirada dos epidídimos e túnicas do testículo para que fossem mensurados com o paquímetro digital (método 3): a largura, o comprimento e a espessura de cada testículo. Com essas medidas foram estimadas a área, o volume, o peso e o IG. Além disso, os testículos foram pesados em uma balança analítica.

Tabela 1. Mensurações da biometria corporal e testicular (segundo o método de mensuração) de gatos domésticos.

Mensuração (cm)		Média±DP	Mínimo	Q25	Mediana	Q75	Máxima
Comp.cabeça		12.58±1.17	11.00	11.75	12.00	13.50	15.00
Circ.cabeça		23.04±1.75	20.00	21.75	23.00	24.00	27.00
Diam.Torácico		32.54±1.51	30.00	32.00	32.50	33.00	35.50
Cab + corpo		55.77±1.52	53.00	54.75	56.00	57.00	58.00
Comp. Cauda		27.38±4.58	14.50	25.75	28.00	30.25	33.00
Comp. Total		83.15±4.72	70.50	81.50	83.00	86.75	89.50
Área Testicular (cm²)	1	-	1.61	2.33	2.71 ^a	3.41	3.68
	2	-	1.50	2.30	2.65 ^b	3.04	3.39
	3	-	1.60	2.09	3.18 ^b	3.93	4.40
Volume testicular	1	-	1.53	2,00	2.55 ^a	4.11	8.95
	2	-	1.48	1.81	2.06 ^a	2.66	7.25
	3	-	1.04	2.23	2.84 ^a	3.40	6.57
Peso Testicular	1	-	1.67	2.20	2.80 ^a	4.51	9.81
	2	-	1.62	1.99	2.26 ^a	2.92	7.95
	3	-	1.14	2.44	3.12 ^a	3.73	7.20
IG	1	-	0.04	0.05	0.07 ^a	0.11	0.23
	2	-	0.03	0.04	0.05 ^a	0.06	0.17
	3	-	0.02	0.05	0.06 ^a	0.09	0.14

DP: desvio padrão; Q25: quartil 25; Q75: quartil 75. - Dado não avaliado. Letras diferentes na linha entre grupos de variáveis indicam diferenças significativas entre os grupos. IG: índice gonadossomático

co; 1: mensuração realizada com ultrassom; 2-mensuração utilizando um paquímetro digital antes da orquiectomia; 3: mensuração realizada ao testículo depois da cirurgia com paquímetro digital. Comp: comprimento. Circ: circunferência. Diam: diâmetro. Cab: cabeça.

Tabela 2. Parâmetros seminais de amostras colhidas por cateterização uretral no gato doméstico.

Variável	Média±DP	Mínimo	Q25	Mediana	Q75	Máxima
Volume (µl)*	37.50±28.41	20.00	20.00	30.00	37.50	115.00
Vigor*	3.85±0.41	3.00	3.50	4.00	4.00	4.50
MT (%)	81.50±8.51	70.00	73.75	80.00	90.00	95.00
MP (%)	75.00±10.27	60.00	67.50	75.00	85.00	90.00
CN/ml*	473.31±491.61	10.00	41.52	323.90	881.25	1333.33
EOS (%)	78.60±11.16	64.00	68.75	77.50	88.50	95.00
CH (%)	80.70±9.01	66.00	70.00	84.50	88.25	90.00
EMN (%)	67.00±20.74	31.00	50.75	68.50	83.50	96.00

*Variáveis não normais MT (%): Motilidade Total; MP (%): Motilidade Progressiva; CN: Concentração/mL; EOS (%): Integridade estrutural membrana; CH (%): Integridade funcional membrana; EMN (%): Espermatozoides morfonormais.

Resultados e Discussão - Não houve diferença ($P > 0.05$) na comparação entre o peso testicular e IG estimado pelo paquímetro e pela balança e entre os parâmetros testiculares: volume, peso e IG segundo os métodos de mensuração do testículo. Porém encontrou-se diferença ($P < 0.05$) na área testicular pelo método de mensuração, sugerindo que a depender da fórmula matemática utilizada para estimar as medidas a partir de instrumentos manuais ou ultrassonográficos, os resultados podem variar [3].

Os dados relatados neste estudo em relação ao comprimento de cabeça mais corpo (40-60cm), comprimento de cauda (25-35cm) e volume e peso testicular ($2,73-2,93\text{cm}^3$) é coincidente com o intervalo reportado para a espécie [6].

Para os parâmetros seminais não existiu diferença estatística ($P > 0.05$) o que demonstrou que o sêmen colhido via uretral apresentou características que encaixam nos intervalos de pesquisas similares, indicando a efetividade do processo realizado neste estudo [1,7].

Foram realizadas correlações de Spearman que testaram as associações entre biometria corporal, testiculares e seminais de acordo com o método de mensuração realizados. Entre a biometria corporal e a biometria testicular, no método 2 e 3, não foram encontradas correlações significativas ($P < 0.05$). No método 1 foram encontradas correlações positivas entre o comprimento total e os parâmetros testiculares de área ($r=0,76$), volume ($r=0,76$), peso ($r=0,76$) e IG ($r = 0.71$) ($P < 0.05$). Segundo [2], animais de pequeno porte tendem a apresentar maior massa testicular quando comparados a animais de maior massa corporal, sofrendo também importante influência do sistema de acasalamento no IG. Encontrou-se correlações ($P < 0.05$) entre a concentração espermática por mililitro e os parâmetros testiculares no método 2 e motilidade total e progressiva com área e peso testicular pelo método 3 ($P < 0.05$).

A existência da relação entre medidas testiculares e níveis séricos de testosterona estão envolvidas na produção e características seminais, esperando assim que animais com maiores testículos apresentem maiores parâmetros seminais [6].

Considerações Finais - Dado o exposto, o método de mensuração com o paquímetro demonstrou-se positivo porque foram encontrados parâmetros testiculares que se correlacionam com parâmetros seminais. Contudo, o presente estudo não obteve um parâmetro comum as biometrias corporais e testiculares associadas aos parâmetros seminais.

Referências bibliográficas

- [1] Jelinkova, K., Vitasek, R., Novotny, R., & Bartoskova, A. (2018). A comparison of quality parameters of fresh feline ejaculates collected by three different collection techniques. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(5), 1068–1074. <https://doi.org/10.1111/rda.13205>.
- [2] Kenagy, G.J & Trombulak, S.C (1986) Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalian*, 67: 1-22.
- [3] Lin, C. C., Huang, W. J. S., & Chen, K. K. (2009). Measurement of testicular volume in smaller testes: How accurate is the conventional orchidometer *Journal of Andrology*, 30(6), 685–689. <https://doi.org/10.2164/jandrol.108.006460>.
- [4] Peixoto, G. C. X., Silva, M. A., Lima, G. L., Campos, L. B., Paiva, A. L. C., Paula, V. V., ... Silva, A. R. (2016). Use of Non-invasive Methods for Evaluating the Testicular Biometry in Collared Peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 45(1), 60–66. <https://doi.org/10.1111/ahc.12171>.
- [5] Swanson, W. F., Bateman, H. L., & Vansandt, L. M. (2017). Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 255–260. <https://doi.org/10.1111/rda.12863>.
- [6] Villaverde, A. I. S. B., Fioratti, E. G., Ramos, R. S., Neves, R. C. F., Ferreira, J. C. P., Cardoso, G. S., ... Lopes, M. D. (2014). Blood and seminal plasma concentrations of selenium, zinc and testosterone and their relationship to sperm quality and testicular biometry in domestic cats. *Animal Reproduction Science*, 150(1–2), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.004>.
- [7] Zambelli, D., Prati, F., Cunto, M., Iacono, E., & Merlo, B. (2008). Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, 69(4), 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.019>.

Agradecimentos: Os autores agradecem a Fundação de Amparo a pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB).

Características biométricas testiculares e a relação com a qualidade espermática em felinos domésticos

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹

myrian.hid@gmail.com

Josiana de Fatima Schnitzer¹

Ana Beatriz Marques de Almeida¹

Luiz Guilherme Corsi Trautwein¹

Cristiane Sella Paranzini¹

Maria Isabel Mello Martins¹

imartins@uel.br

Abstract: The study aimed to determine the testicular biometry and correlating with the sperm characteristics. Were used 40 male cats, divided into three groups: Group 1 - sperm recovery from the epididymis' tail, Group 2 - collection of semen by electroejaculation and Group 3 - recovery from the tail of the epididymis after electroejaculation. Sperm samples were evaluated in CASA system. It was used the Pearson correlation coefficient test (r), considering ($P < 0.05$). In G1, it was observed a positive correlation between testicular volume and the spermatocidal straightness ($r = 0.746$ and $P = 0.00837$), testicular weight and straightness ($r = 0.693$, $P = 0.0181$). In the G3, it was identified a negative correlation between testicular volume and progressive movement ($r = -0.566$, $P = 0.0224$), also between the testicular volume and the spermatocidal straightness ($r = -0.567$, $P = 0.0219$). In the study conditions it was not possible to conclude that there is a correlation between testicular biometry and sperm kinetics in domestic cats.

Keywords: Testicular Measurement; Cats; Spermogram.

Palavras-chave: Mensuração Testicular; Gatos; Espermograma.

Introdução - A análise testicular e seminal de felinos tem grande importância na seleção dos melhores reprodutores, assim como preservação das espécies selvagens em extinção. Para possibilitar a realização de maiores estudos, utiliza-se o gato doméstico como modelo experimental de felídeos selvagens [1]. As pesquisas tem estudado as diversas características genéticas e ambientais que possam conduzir à uma melhor eficiência na reprodução e na produção de novos indivíduos, visto que a seleção direta de características ligadas à reprodução é, muitas vezes, difícil de ser aplicada. Por isso, torna-se necessário identificar características que sejam facilmente mensuradas, que apresentem repetibilidade e que possam ser correlacionadas aos eventos reprodutivos [2]. As medidas do perímetro escrotal constituem um eficiente indicativo do potencial reprodutivo e de predição da produção espermática de ruminantes [3], sendo utilizado como critério de seleção de reprodutores pelas correlações genéticas favoráveis com características do sêmen e fenotípicas desejáveis [4]. Sabe-se que

¹ Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR.

em humanos, o tamanho testicular tem correlação positiva com a qualidade espermática, e se torna uma ferramenta útil e rápida na avaliação da fertilidade durante o exame físico [5]. Estudos anteriores descreveram uma relação positiva do peso testicular com a produção de espermatozoides, e evidenciaram que quanto maior o tamanho do testículo, maior a produção espermática em cães, leões, capivaras e gatos [6][7][8][9]. Acredita-se que seja uma ferramenta importante para seleção de reprodutores em gatis comerciais, assim como a utilização como biotécnica para espécies de felinos selvagens, principalmente aos ameaçados de extinção. O objetivo desse trabalho foi determinar a biometria testicular por meio da mensuração dos testículos de gatos domésticos e correlacionar com as características espermáticas *in vitro*.

Material e Métodos - Foram utilizados 40 gatos machos, adultos, sem raça definida, com idade entre 2 a 6 anos, provenientes de organização não governamental (ONG) de proteção animal. Esses animais foram separados em três grupos distintos: Grupo 1 (G1- 11 gatos): os testículos foram pesados, mensurados e recuperação espermática da cauda do epidídimo (EPD) após orquiectomia, Grupo 2 (G2- 13 gatos): mensuração testicular e colheita de sêmen por eletroejaculação e Grupo 3 (G3- 16 gatos): mensuração testicular e recuperação espermática da cauda do epidídimo após eletroejaculação e orquiectomia. A biometria testicular foi realizada pela mensuração do comprimento (C), largura (L) e espessura (E) de cada testículo, e posteriormente, realizado o cálculo da média dos testículos de cada animal e o volume testicular aplicando a fórmula: Volume Testicular (VT) = $\frac{3}{4} \times \pi \times C/2 \times L/2 \times E/2$ [10], onde $\pi = 3,1416$. O resultado foi expresso em mm³. No G2 foi avaliado o volume do ejaculado, e nos três grupos (G1,G2 e G3), foram avaliados os parâmetros cinéticos e concentração espermática pelo sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer, Hamilton-Thorne IVOS, Beverly, MA, USA), de acordo com o *setup* para felinos no HTR-IVOS 14.0. Os resultados foram analisados no programa Sigma Plot para Windows versão 11.0. Para estimar a correlação entre as variáveis, foi utilizado coeficiente de correlação de Pearson (r). O nível de significância considerado foi de 5% (p<0,05).

Resultados e Discussão - As médias do volume testicular nos grupos foram: G1 = 435,81(±188),11 mm³; G2 = 692,59(±237,3) mm³; G3 = 871,23(±377) mm³. Os resultados das avaliações espermáticas nos G1, G2 e G3 foram: Concentração espermática (x10³sptz/mL) 16,42(±16,2), 64,60(±87,3) e 45,66(±23,7); Motilidade Total (%) 44,09(±28,2), 36,23(±28) e 70,69(±11,5); Motilidade Progressiva(%) 30,27(±22,6), 19,15(±16,5) e 40,56(±9,2); VAP (µm/s) 136,78(±40,4), 97,65(±42,4) e 143,98(±20,5); VSL (µm/s) 116,43(±36,6), 85,72(±37,8) e 119,38(±19,6); VCL (µm/s) 201,49(±40,8), 146,86(±53,4) e 214,35(±24,7); ALH (µm) 5,12(±1,9), 4,42(±2,6) e 6,64(±0,6); BCF (µm) 40,37(±6,9), 35,15(±9,4) e 31,93(±5,3); STR (%) 85,18(±4,9), 86,23(±7,1) e 80,94(±3,4); LIN (%) 58,27(±9,6), 58,85(±12,2) e 55,13(±6,9), respectivamente. Embora não tenha sido observada correlação entre concentração espermática e volume testicular (r=0,483, p=0,058), houve uma tendência nos gatos que apresentavam maiores volumes testiculares, concentrações maiores de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo, corroborando com os resultados prévios em gatos domésticos [9]. Não

houve diferença entre a média de peso dos gatos nos três grupos estudados e diferente do que foi observado em touros Nelore [11], o peso dos animais não apresentou correlação com nenhuma variável da análise espermática. Os resultados médios de peso testicular obtidos nesse estudo ($1,76 \pm 0,5g$) foram semelhantes aos encontrados em outros estudos, $1,2g$ no Brasil [12] e $1,6g$ na Nigéria [13]. No G1 foi observada correlação positiva entre as variáveis: biometria testicular e a cinética espermática, sendo que quanto maior o volume testicular, maior a retilinearidade espermática ($r=0,746$ e $p=0,00837$) e também entre o peso testicular e retilinearidade espermática ($r=0,693$, $p=0,0181$). Numericamente, não houve diferença no peso médio do testículo direito ($1,74 \pm 0,5g$) e esquerdo ($1,78 \pm 0,6g$), corroborando com os resultados descritos em gatos domésticos [12] e jaguatiricas [14]. No G2, não foi identificada nenhuma correlação entre os parâmetros espermáticos e biometria testicular. Estes resultados podem estar associados ao intervalo de tempo entre o finalizar as três séries da eletroejaculação e o início das análises das amostras, podendo ter causado um efeito deletério às células espermáticas. No G3, foi identificada uma correlação negativa entre o volume testicular e o movimento progressivo, ou seja, quanto maior o volume testicular, menor foi o movimento espermático progressivo ($r=-0,566$, $p=0,0224$) e também entre volume testicular e retilinearidade espermática ($r=-0,567$, $p=0,0219$). Os gatos do G3 48 horas antes haviam sido submetidos a eletroejaculação, e os do G1 após serem resgatados pela ONG, foram mantidos em repouso por dois dias, acredita-se que essa diferença de manejo seja a explicação para esses resultados divergentes, entretanto estudos complementares devem ser realizados para comprovar essa hipótese.

Considerações Finais – Embora tenha sido identificada correlação positiva entre a retilinearidade do movimento dos espermatozoides epididimários e o volume e peso testicular, nas condições do presente estudo não foi possível concluir que existe correlação entre cinética espermática e biometria testicular em gatos domésticos.

Referências bibliográficas

- [1] Vieira, DK.; Suzano, SM.; Silveira, AM.; Pires, MV.; Libonati, J.; Ferreira, AMR. Avaliação Clínica, Citológica e seminal de gatos domésticos (*Felis Catus*) para seleção de reprodutores. Revista Eletrônica Novo Enfoque, v.09, n. 09, p 07-09, 2010.
- [2] Bergmann, JAG.; Zamborlini, LC.; Procópio, CSO.; Andrade, VJ.; Vale Filho, VR. Estimativas de parâmetros genéticos do perímetro escrotal e do peso corporal em animais da raça Nelore. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.48, p.69-78, 1996.
- [3] Johnson, WH.; Thompson, JA.; Kumi-Diaka, J. The determination and correlation of reproductive parameters of performance-tested Hereford and Simmental Bulls. Theriogenology, v.55, p.973-982, 1994.
- [4] Bourdon, RM.; Brinks, JS. Scrotal Circumference in yearling Hereford bulls: adjustment factors, heritabilities and genetic, environmental and phenotypic relationships with growth traits. Journal Animal Science, v. 62, p. 958-967, 1986.
- [5] Arai, T.; Kitahara, S.; Horiuchi, S.; Sumi, S.; Yoshida, K. Relationship of testicular volume to semen profiles and serum hormone concentrations in infertile Japanese males. Int J Fertil Womens Med., v.43, p.40-47, 1998.
- [6] Amann, RP. Sperm production rates. In: Johnson A.D., Gomes W.R., Vandemark N.L. (Eds.) The testis. New York, Academic Press, p. 433- 482, 1970.

- [7] França, LR.; Rusell, RD. The testis of domestic mammals. In Regadera, J.; Martinez-Garcia, F. (Eds.) Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid, Churchill Livingstone, p. 197-219, 1998.
- [8] Barros, JBG.; Paula, TAR.; Matta, SLP.; Fonseca, CC.; Melo, FR.; Benjamim, LA. Morfometria testicular e dos túbulos seminíferos de leões-africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos, em cativeiro. Revista Ceres, vol. 53, núm. 310, p. 523-530, 2006.
- [9] Trautwein, LGC.; Souza, AK.; Bordo, CS.; Aguiar, JB.; Paranzini, CVS., Martins, MIM. Volume and testicular weight correlation with sperm quality of domestic cats. abstracts. VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction, November 6-9, 2016, Campos do Jordão, SP, Brazil. Animal Reproduction, v.14, n.1, p.322, Jan./Mar. 2017.
- [10] Tebet, JM. Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* – Schreber, 1775), a jaguatirica (*Leopardus pardalis* – Linnaeus, 1758) e o gato doméstico (*Felis catus*). 2004. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu, 2004.
- [11] Silva, AEDE.; Unanian, MM.; Cordeiro, CMT.; Freitas, A.R. Relação da Circunferência Escrotal e Parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. R. Bras. Zootec., v.31, n.3, p. 1157-1165, 2002.
- [12] França L.R.; Godinho C.L. 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). Biol. Reprod. 68:1554-1561.
- [13] Bello, A.; Umaru, MA.; Musa, D.; Dare, RS. A biometric study of some reproductive components of the male domestic mongrel cat's (*Felis catus domestica*) in northwest Nigeria. Global Animal Science Journal, vol.: 3(1), p. 101-104, 2015. Epidemiologia e controle de qualidade de prod. de) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- [14] Sarti, Priscilla. Morphometric evaluation of the testis and spermatogenesis in adult oncelot (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758). 2006. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, diagnóstico e controle de doenças; Epidemiologia e controle de qualidade de prod. de) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

Agradecimentos: A CAPES pela bolsa de estudos no mestrado.

Características testiculares e seminais de cães da raça *Australian Cattle Dog*

Teresinha Inês Assumpção¹

teassumpcao@ufu.br

Arthur Peixoto Medeiros¹

Gustavo Pires de Oliveira Sussmann Nogueira¹

Gustavo Guerino Macedo²

Abstract: The aim of this study was to evaluate testicular and seminal characteristics of the canine breed Australian Cattle Dog. There were used a total of 15 male dogs with age ranging from 1.6 to 6 years old, their semen was collected via manual stimulation. The testes were evaluated for consistency and testicular biometry. Physical and morphological evaluates were performed through routine techniques. The average age was 37.85 ± 5.79 months, average weight was 23.08 ± 0.78 kilograms, all the testicles were elastic and testicular volume of the animals ranged from 10.4 cm^3 to 35.9 cm^3 with a mean of $18.2 \pm 4.70 \text{ cm}^3$, average sperm motility was $82.81 \pm 4.4 \%$, average vigor 3.09 ± 0.34 , average concentration was 499.31 ± 208.93 million/mL and average total defects was $25.41 \pm 4.34\%$. Dogs from the Australian Cattle Dog breed demonstrated a good potential of spermatozoa production and quality.

Keywords: canides, reproduction, semen.

Palavras-chave: canídeos, reprodução, sêmen.

Introdução - O Brasil possui 52,2 milhões de cães em domicílio dentro do território nacional, o que corresponde aproximadamente a 14,5% do número total de cães abrigados no mundo. Os cães são usados para inúmeras atividades, seja companhia, na segurança e também para o trabalho com gado, como é o caso da raça *Australian Cattle Dog* [1]. A avaliação da aptidão reprodutiva de um macho é feita através de sua avaliação andrológica, fundamentada na observação da saúde geral, genética, do sistema genital e espermograma [2]. Nos cães, a avaliação do tamanho, forma e consistência dos testículos é utilizada para predizer sua produção espermática, sendo o volume testicular muito representativo nesta espécie [3].

Diante das poucas informações sobre a biometria testicular e os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen da raça canina *Australian Cattle Dog*, este estudo teve como objetivo avaliar as características testiculares e seminais, para um maior conhecimento reprodutivo da raça.

Material e Métodos - Foram utilizados quinze cães adultos, da raça *Australian Cattle Dog*, com idades entre 1,6 e 6 anos, provenientes da região de Uberlândia-MG. Os testículos foram

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/ MG.

² Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS.

avaliados quanto à consistência como rígido, flácido ou elástico. A biometria testicular foi realizada com auxílio de paquímetro para determinação do volume testicular medindo-se o comprimento (c) e a largura (l), a fim de calcular o volume (v) do mesmo, utilizando-se a fórmula: $v = c \times l^2 \times 0,524$, em que o volume total é igual à somatória do testículo esquerdo com o direito [4]. A coleta do sêmen foi feita por meio da técnica de estimulação manual, sendo coletado todo o ejaculado do animal, desprezando a primeira fração de líquido prostático. As análises seminais, tanto físicas quanto morfológicas, seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [2]. Foram avaliadas a motilidade progressiva e o vigor do sêmen em microscopia óptica imediatamente após a coleta. A concentração de espermatozoides/ml foi mensurada com o auxílio da câmara de Neubauer e a avaliação de morfologia em câmara úmida sob microscopia de contraste de fase [2]. Os dados foram processados pelo pacote estatístico SAS. Foram calculadas as médias de todas as variáveis analisadas que foram expressas em média e erro padrão (média \pm EP). Foi considerada como diferença significativa entre as variáveis testadas o $P < 0,05$ e tendência $P < 0,10$.

Resultados e Discussão - A idade dos animais variou de 18 a 72 meses com média de $37,85 \pm 5,79$ meses. O peso corporal avaliado se manteve em uma faixa de 17 a 26 kg sendo a média igual a $23,08 \pm 0,78$. Todos os animais apresentaram testículos elásticos. Na tabela 1 podemos notar que o volume testicular total (VTT) dos animais oscilou de $10,4 \text{ cm}^3$ até $35,9 \text{ cm}^3$ com média de $18,2 \pm 4,70 \text{ cm}^3$. Cinco animais apresentaram testículos assimétricos, em dois o volume testicular direito (VTD) foi maior que o volume testicular esquerdo (VTE) e nos outros três, foi observado o contrário, semelhante aos achados semelhantes aos de Galinkin [5] em cães da mesma raça. Ao comparar a idade e o VTT de cada animal, notou-se que os cães acima de 60 meses de idade apresentaram uma média de VTT significativamente maior ($24,57 \text{ cm}^3$) do que os de faixa etária entre 18 e 48 meses ($15,89 \text{ cm}^3$), semelhante ao encontrado por Mascarenhas et al. [6] que afirmam que animais mais velhos possuem maior índice túbulo-somático (percentual de massa corporal alocada em túbulos seminíferos).

Tabela 1 – Características testiculares dos cães da raça *Australian Cattle Dog* de acordo com a idade e peso corporal.

Animal	Idade (meses)	Peso corporal (kg)	VTD (cm ³)	VTE (cm ³)	VTT (cm ³)	Testículos
1	20	21	5,2	5,2	10,4	Simétricos
2	44	21	6,3	6,3	12,6	Simétricos
3	40	24	7,1	7,1	14,2	Simétricos
4	21	26	11,1	11,1	22,2	Simétricos
5	28	23	8,2	8,2	16,2	Simétricos
6	30	21	7,3	7,3	14,6	Simétricos
7	36	23	7,3	7,3	14,6	Simétricos
8	18	18	6,7	6,7	13,4	Simétricos

>continua

Animal	Idade (meses)	Peso corporal (kg)	VTD (cm ³)	VTE (cm ³)	VTT (cm ³)	Testículos
9	61	19	11,6	11,6	23,2	Simétricos
10	48	17	11,5	11,5	23,0	Simétricos
11	61	23	19,8	16,1	35,9	Assimétricos
12	72	20	8,1	9,2	17,3	Assimétricos
13	42	23	5,6	6,7	12,3	Assimétricos
14	60	22	12,2	9,8	22,0	Assimétricos
15	30	20	9,8	11,5	21,3	Assimétricos

VTD – volume do testículo direito, VTE - volume do testículo esquerdo, VTT – volume testicular total

Os resultados de motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática obtidos no espermiograma de cães da raça *Australian Cattle Dog* se encontram dentro do recomendado pelo CBRA para a espécie [2]. A motilidade progressiva dos espermatozoides teve média final de $82,81 \pm 4,40\%$, enquanto o vigor atingiu a média de $3,09 \pm 0,34$, valores estes semelhantes aos obtidos por Luppi [7] e Galinkin [5]. As concentrações espermáticas avaliadas variaram de $0,25 \times 10^6$ a 2160×10^6 , atingindo uma média de $499,315 \pm 208,93$ milhões de células/ml de sêmen. Esta grande variação pode ser devido ao fato que os animais apresentaram volumes diferentes de seus ejaculados e nem todos tiveram uma ejaculação completa. As concentrações verificadas são semelhantes as verificadas por Silva et al. [8] e Galinkin [5]. As alterações da morfologia espermática mostraram média de $25,41 \pm 4,34\%$ com uma variação de 9,5 a 58% de espermatozoides anormais, valores estes próximos ao verificado por Silva [9]. O total de defeitos maiores foi de $5,54 \pm 0,95$ e de menores $17,29 \pm 4,05$. A maior incidência foi de espermatozoides com cauda dobrada ($10,29 \pm 2,43\%$), cauda enrolada ($5,04 \pm 2,50$), cauda fortemente dobrada/enrolada ($3,87 \pm 0,92$) e gota citoplasmática distal ($3,54 \pm 2,34$), os demais defeitos ficaram abaixo de 1% cada.

Conclusões - As características testiculares e seminais (físicas e morfológicas) de cães *Australian Cattle Dog* mostraram-se dentro dos padrões recomendados para a espécie, sendo as patologias espermáticas de maior incidência foram as de cauda dos espermatozoides. Podemos inferir que, os cães *Australian Cattle Dog* demonstram um bom potencial de produção e qualidade de espermatozoides e possivelmente uma boa fertilidade.

Referências bibliográficas

- [1] Cruz CMO. **As Raças Portuguesas de Cães de Gado e Cão de Pastoreiro** - Aspectos Morfológicos e Comportamentais. 2007. 189p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal. 2007.
- [2] CBRA - Colégio Brasileiro de reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- [3] Souza MB. **Ultrassonografia bidimensional e doppler como ferramenta para avaliação de testículos de cães sadios**. 2011. 76p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará. 2011.

- [4] Johnston SD, Ward D, Lemon J, Gunn I, Maccallum CA, Keeley T, Blyde D. Studies of male reproduction in captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). **Animal Reproduction Science** 2007, 100: 338–355.
- [5] Galinkin J. Avaliação de sêmen e medidas testiculares de cães de raça pura. 2014, 31p. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. Disponível em: <http://bdm.unb.br/bitstream/10483/8737/>. Acessado em 02 de abril de 2019.
- [6] Mascarenhas RM, Paula TAR, Matta SLP, Leonardo LL, Fonseca CC, Neves MTD. Morfometria macro e microscópica e índices somáticos dos componentes testiculares de cães sem raça definida, da puberdade à senilidade. **Revista Ceres** 2006, 53 (305):113-119.
- [7] Luppi MMCP. **Avaliação andrológica de cães da raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular**. 2006. 109p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.
- [8] Silva LDM, Silva AR, Cardoso RCS. Inseminação artificial em cães. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Editora Varela, 2002, p.69-95.
- [9] Silva ASF. **Caracterização Genética, Andrológica e Congelabilidade do Sêmen em Cães da Raça Fila Brasileiro**. 2012. 84p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2012.

Cinética computadorizada de espermatozoides felinos (*Felis catus*) colhidos por cateterização uretral e criopreservados com diferentes crioprotetores

Elton Amorim Romão¹

Rodrigo Freitas Bittencourt
rfb@ufba.br

Mônica Madrigal Valverde

Catharina Albuquerque Vieira

Adrielle da Silva Lima

Maicon Pereira Lents

Renata Oliveira Barreto

Isabella de Matos Brandão Carneiro

Gleice Mendes Xavier

Kárita da Mata Fuchs

Abstract: Sperm cryopreservation is a tool for genetic material conservation of valuable animals. In the case of domestic felines, generating information on harvesting, evaluation and preservation is of particular importance for its application in wild felids. This study describes the analysis of seminal samples by urethral catheterization of thirteen adult domestic cats. The samples were cryopreserved in egg Tris-egg yolk extender and the experimental groups were adjusted by the penetrating cryoprotectant used, 6% glycerol (GC1), 3% dimethylacetamide (GC2) and 3% dimethylformamide (GC3). The samples were thawed and evaluated by a seminal computer analysis system (CASA). The results indicated that there were no differences ($P > 0.05$) between the different treatments according to the cryoprotectant used. In conclusion, the cryoprotectant did not have an effect on semen quality post-thawing.

Keywords: Felines; Freezing; Spermatozoa.

Palavras-chave: Felinos; Congelação; Espermatozoides.

Introdução - Diversas espécies de felídeos fazem parte da lista de animais ameaçados de extinção. Neste sentido, estudos são realizados para o aprimoramento de biotécnicas reprodutivas utilizando os felinos domésticos como modelos experimentais dos silvestres, em número reduzido em criatórios *ex situ* ou *in situ* [1]. Dentre estas biotecnologias, a criopreservação espermática possibilita armazenar células por tempo indeterminado [2], garantindo reserva genética para uso futuro [3]. Técnicas para análise espermática pós-descongelamento têm sido empregadas para avaliar a eficiência do processo [4]. O sistema computadorizado de análise seminal (CASA) fornece informações detalhadas sobre a cinética celular, que para os felinos, são escassas. Este trabalho objetivou, estudar os parâmetros espermáticos das células colhidas através de cateterização uretral e criopreservados com diferentes crioprotetores penetrantes.

¹ Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia.

Material e Métodos -Foram utilizados treze gatos machos, com idade de 1 a 4 anos, peso médio de 3,5 kg e sem raça definida. Animais hígidos e aptos à orquiectomia após verificada a condição reprodutiva, exame clínico e laboratorial (hemograma). Os animais foram submetidos a protocolo anestésico: o primeiro grupo, de sete animais, foi anestesiado utilizando-se hidrocloreto de medetomidina por via intramuscular (IM) (100µgkg⁻¹, Domitor®, Vetoquinol 1,0mg/mL, Orion Pharma, PC, Italia) e cetamina IM (5mgkg⁻¹, 10% Syntec, Tecnologia Farmacêutica Aplicada a Medicina Veterinária, SP, Brasil). O segundo grupo, seis animais, anestesiados utilizando cloridrato de dexmedetomidina IM (0,025µm kg⁻¹, Dexdomitor® 0,5 mg/mL, Zoetis, Orion Pharma, SP, Brasil) associado à cetamina IM (5mg kg⁻¹, 10% Syntec, Tecnologia Farmacêutica Aplicada a Medicina Veterinária, SP, Brasil). Após alcançado o plano anestésico, os animais foram submetidos a estímulo digital prostático via reto e sondagem com um cateter uretral sem janela lateral (1mm de diâmetro), tendo o sêmen colhido e transportado ao laboratório para análise e processamento. O sêmen foi avaliado quantitativamente e qualitativamente e as amostras diluídas nos diferentes crioprotetores: GC1 6% de glicerol (GLI), GC2 3% de dimetilcetamida (DMA) e GC3 3% de dimetilformamida (DMF). Em seguida, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e criopreservadas. A descongelção das amostras foi realizada a uma temperatura de 37°C durante 30 segundos em um banho-maria automatizado (Solidsteel®). A cinética espermática foi avaliada a partir da análise computadorizada de sêmen (CASA, Microptics, S.L. Versão 5.1, Barcelona, Espanha), com *set-up* para felinos. Uma alíquota do sêmen diluída em tampão fosfato-salino – PBS (Buffer salino fosfato), até se obter uma diluição final de aproximadamente 48x10⁶sptz/mL. Após dez minutos de incubação (37°C), 5 µL do sêmen diluído foram analisados no microscópio entre lâmina e lamínula (aumento de 100x). Foram avaliados os parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e progressiva (MP), velocidades curvilínea (VCL) e do percurso médio (VAP) e em linha reta (VSL), deslocamento lateral de cabeça (ALH), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e hiperatividade (HYPERACT). Foram utilizadas duas sondas fluorescentes: o diacetato de carboxifluoresceína (DIC), fluorescendo em verde e iodeto de propídeo (IP), fluorescendo em vermelho, presentes em uma solução que continha PBS, DIC na concentração final de 20,0µM e IP na concentração final de 15µM. A cada amostra foi adicionado 20µL de sêmen diluído em 150µL de PBS a uma concentração mínima de 0,25x10⁶ espermatozoides/mL em cada tubo criogênico: 5µL de IP e 5µL de DIC. Seguindo de análises em Citômetro de Fluxo (BD LDRFortessa, BD Bioscience, EUA), com espectro entre 250-850nm. As imagens foram analisadas com software FlowJo® (FlowJo LLC, EUA). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, onde os ejaculados foram considerados repetições e os protocolos de processamento do sêmen foram considerados tratamentos. A média e desvio padrão das variáveis obtidas por análise descritiva. Os dados foram processados pelo Pacote estatístico SAS, Versão 9.0 (2002). Foi feita análise de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo Kruskal-Wallis e as normais pelo teste SNK. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados e Discussão - Os resultados obtidos para cinética espermática pós-descongelção, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Médias \pm desvio padrão e mediana estatística de parâmetros espermáticos avaliados por um sistema automático de análise seminal (SCA*) de ejaculados de gatos domésticos processados com diferentes crioprotetores.

Diluyente	GL 6%		DMA 3%		DMF 3%		Valor de P
	Média	Md	Média	Md	Média	Md	
MT (%)	37.13 \pm 23.43	25.88	42.62 \pm 11.89	41.18	37.17 \pm 24.11	28.00	0.93
MP (%)	3.13 \pm 1.2	3.06	8.66 \pm 10.90	4.41	2.90 \pm 4.71	1.04	0.53
RAP (%)	0.93 \pm 0.93	1.08	4.60 \pm 4.60	0.00	1.01 \pm 1.01	0.52	0.97
MED (%)	4.01 \pm 1.09	4.17	6.00 \pm 4.27	5.88	3.05 \pm 3	2.00	0.45
LEN (%)	32.20 \pm 22.73	20.71	32.00 \pm 2.91	31.03	23.95 \pm 13.64	18.33	0.64
IMOV(%)	62.85 \pm 23.44	74.12	57.37 \pm 11.89	58.82	71.99 \pm 14.47	80.33	0.36
VCL(μ m/seg)	35.40 \pm 8.99	32.37	41.85 \pm 18.3	31.85	34.52 \pm 12.34	32.45	0.70
VAP(μ m/seg)	21.19 \pm 5.97	18.17	29.52 \pm 15.41	23.82	20.55 \pm 9.04	18.93	0.40
VSL (μ m/seg)	14.82 \pm 5.34	12.18	22.06 \pm 14.98	18.58	12.17 \pm 5.80	11.33	0.24
STR (%)	59.19 \pm 3.06	60.66	66.18 \pm 12.07	69.70	58.23 \pm 11.79	59.65	0.50
LIN (%)	33.07 \pm 2.63	32.50	45.58 \pm 12.80	48.40	34.27 \pm 10.90	35.06	0.20
WOB (%)	52.30 \pm 3.66	51.57	64.27 \pm 8.45	63.41	55.28 \pm 11.06	56.38	0.21
ALH (μ m)	1.64 \pm 0.28	1.62	1.60 \pm 0.40	1.56	1.64 \pm 0.59	1.60	0.99
BCF (Hz)	5.54 \pm 1.80	5.27	6.83 \pm 1.90	7.04	4.72 \pm 1.82	4.96	0.28

Estatística; MT (%), motilidade total; MP (%), motilidade progressiva (%), IMOV (%) quantidade de espermatozoides imóveis; porcentagem de espermatozoides com velocidade rápida (RAP), média (MED) e lenta (LEN) (%); VSL, velocidade progressiva. VCL, velocidade curvilínea, VAP, velocidade de trajeto; STR, retilinearidade; LIN, linearidade; WOB:VAP/VCL; ALH, deslocamento lateral da cabeça; BCF, frequência de batimento flagelar. Verificou-se a similaridade ($P > 0,05$) para todos os parâmetros de cinética espermática, independente dos grupos de crioprotetores utilizados. Abreviações: GL, glicerol; DMA, dimetilacetamina; DMF, dimetilformamida; Med, mediana

O percentual de motilidade total dos ejaculados pós-descongelamento apresentou um intervalo de 5 até 40%. Estudo de [5] utilizando diluidor a base de gema de ovo e trisfrutose-ácido cítrico 20% (EY-TFC) verificou resultados próximos aos deste estudo, com percentuais de motilidade total inferiores a 50% (21,2% a 45,7%). [1] utilizando o diluidor comercial CaniPlus Freeze encontraram motilidade progressiva média de 7,3% em amostras seminais de felinos pós- congelamento, assim como neste trabalho, cujos 80% das amostras apresentaram motilidade abaixo de 10%. Na avaliação dos coeficientes de correlação entre as variáveis de motilidade, morfologia e integridade de membranas, é possível encontrar uma correlação positiva moderada ($r=0,54$, $P \leq 0,05$) entre a motilidade total e o %EOS (corante eosina), estimada por microscopia convencional, o que é perfeitamente justificável já que as células com movimento potencialmente tem sua integridade de membrana plasmática preservada, este fato voltou a se confirmar ao identificar a existência de correlação positiva moderada, obtida através do coeficiente de correlação de Spearman, ($r=0,63$, $P \leq 0,05$) entre a motilidade

total estimada pelo CASA e percentual de espermatozoides com integridade de membrana plasmática estimada pela citometria de fluxo. Devido o cumprimento de critérios para a estimativa das subpopulações espermáticas, esta foi realizada apenas nos diluentes com glicerol 6% e DMA 3%. No grupo glicerol 6%, as variáveis VCL e VSL exibiram 72,80% da variância acumulada. O grupo apresentou dois componentes principais e foram identificadas quatro subpopulações. No grupo do crioprotetor DMA 3% as variáveis VCL, VSL e VAP explicam um total de 85,02% da variância acumulada. O grupo apresenta três componentes principais, sendo que neste grupo a variável BCF foi incluída no terceiro componente e ainda foram encontradas quatro subpopulações. Não houve diferenças entre os grupos para as variáveis de cinéticas avaliadas pelo CASA. As variáveis de movimento avaliadas no sistema automatizado de análise seminal comparadas com outras pesquisas em sêmen felino, indicam que o processo de congelamento-descongelamento influenciou nos parâmetros seminais.

Considerações Finais – O estudo da cinética espermática computadorizada possibilitou confirmar que os crioprotetores a base de amidas não proporcionaram elevação dos índices de manutenção dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento e pôde-se afirmar a presença de subpopulações espermáticas nas amostras dos felinos domésticos.

Referências bibliográficas

- [1] Brusentsev, E., Kizilova, E., Mokrousova, V., Kozhevnikova, V., Rozhkova, I., Amstislavsky, S. 2018. Characteristics and Fertility of Domestic Cat Epididymal Spermatozoa Cryopreserved with Two Different Freezing Media. *Theriogenology* 110: 148–52. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.038>.
- [2] Prochowska, S., Nizański, W., Partyka, A. 2016. Comparison and Analysis of in Vitro Characteristics of Fresh and Frozen-Thawed Urethral and Epididymal Spermatozoa from Cats (*Felis Domesticus*). *Theriogenology* 86 (8), 2063–72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.002>.
- [3] Azevedo, M.H.F.P., Matta, T.A.R., Fonseca, S.L.P., Costa, C.C., Costa, E.P.D., Peixoto, D.S., Vogas, V. 2010. Cell Population Indexes of Spermatogenic Yield and Testicular Sperm Reserves in Adult Jaguars (*Panthera Onca*). *Anim. Reprod. Sci.* 118 (1), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.018>.
- [4] Tebet, J. M., Martins, M. I.M., Chirinea, V. H., Souza, F. F., Campagnol, D., Lopes, M. D. 2006. Cryopreservation Effects on Domestic Cat Epididymal versus Electroejaculated Spermatozoa. *Theriogenology* 66 (6–7), 1629–32. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.013>.
- [5] Baran, A, Tek, C., Demir, K., Sabuncu, A., Ozdas, O.B. 2011. Intrauterine Insemination with Cat Semen Frozen with Various Extenders. *Turk J Vet Anim Sci.* 35 (5), 311–18. <https://doi.org/10.3906/vet-1012-649>.

Agradecimentos: Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia FAPESB, Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), Organização dos Estados Americanos (OEA), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Citometria de fluxo para avaliação da integridade de espermatozoides felinos (*Felis catus*) criopreservados com uso de diferentes crioprotetores

Elton Amorim Romão¹

Rodrigo Freitas Bittencourt¹
rfb@ufba.br

Mônica Madrigal Valverde¹

Catharina Albuquerque Vieira¹

Adrielle da Silva Lima¹

Macon Pereira Lents¹

Renata Oliveira Barreto¹

Isabella de Matos Brandão Carneiro¹

Gleice Mendes Xavier¹

Kárita da Mata Fuchs¹

Abstract: Sperm cryopreservation is a tool for genetic material conservation of valuable animals. In the case of domestic felines, generating in formation on harvesting, evaluation and preservation of sperms and its application in the field. This study describes the analysis of seminal samples by urethral catheterization of thirteen adult domestic cats. The samples were cryopreserved in egg Tris-egg yolk extender and the experimental groups were adjusted by the penetrating cryoprotectant used, 6% glycerol (GC1), 3% dimethylacetamide (GC2) and 3% dimethylformamide (GC3). Samples were thawed and evaluated for membrane integrity through flow cytometry. The results indicated that there were no differences ($P > 0.05$) between the different categories according to the cryoprotectant used. In conclusion, the cryoprotectant did not have an effect on semen quality post-thawing.

Keywords: Cryopreservation; Feline; Spermatozoa.

Palavras-chave: Criopreservação, Felino, Espermas.

Introdução- A criopreservação espermática é uma importante ferramenta para a conservação do material genético de animais valiosos [1]. Os felinos domésticos, gerando informação sobre colheita, avaliação e preservação, fato importante devido à sua aplicabilidade em felídeos silvestres apresentando um enorme potencial para o manejo genético de felídeos em extinção [1]. O estudo da eficiência de crioprotetores para a congelamento espermática tem sido realizado para carnívoros domésticos [2], e para aumentar a acurácia da avaliação da eficácia do processo de criopreservação celular requer um sistema de avaliação rápida, capaz de aumentar o número de células avaliadas, como a citometria de fluxo [3]. Trabalhos com felinos utilizando a análise de citometria de fluxo produzem importantes informações sobre

¹ Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia.

a condição da membrana espermática, porém, são escassos, especialmente quando se avalia a qualidade dos espermatozoides felinos colhidos por cateterização uretral e criopreservados em diferentes crioprotetores [4][5]. Assim, este trabalho objetivou estudar o uso da citometria de fluxo para avaliar os índices de manutenção da integridade da membrana plasmática de espermatozoides e comparar os resultados com outras análises: teste hiposmótico (HOST) e sistema automatizado de análise seminal (CASA), colhidos da uretra e congelado com diferentes crioprotetores.

Material e Métodos- Foram utilizados treze gatos machos, sexualmente maduros, entre 1 a 4 anos e com peso médio de 3,5 kg. Os animais foram considerados hígidos e aptos à orquiectomia após verificada a condição reprodutiva, exame clínico e laboratorial (hemograma). Cada animal foi submetido a protocolo anestésico: o primeiro grupo, de sete animais, anestesiados utilizando hidrocloreto de medetomidina, intramuscular (IM) (100µgkg⁻¹, Domitor®, Vetquinol 1,0mg/mL, Orion Pharma, PC, Italia) e cetamina IM (5mgkg⁻¹, 10% Syntec, Tecnologia Farmacêutica Aplicada a Medicina Veterinária, SP, Brasil). O segundo grupo, seis animais, anestesiados utilizando cloridrato de dexmedetomidina IM (0,025µg kg⁻¹, Dexdomitor® 0,5 mg/mL, Zoetis, Orion Pharma, SP, Brasil) associado à cetamina IM (5mg kg⁻¹, 10% Syntec, Tecnologia Farmacêutica Aplicada a Medicina Veterinária, SP, Brasil) favorecendo a coleta via uretral. Alcançado o plano anestésico, os animais foram submetidos a estimulação digital da próstata via reto e sondagem com um cateter uretral (Provar®, Provar Ltda, SP, Brasil) tendo o semen colhido e transportado ao laboratório para análise e processamento. O semen foi avaliado quantitativamente e qualitativamente e as amostras diluídas nos diferentes crioprotetores experimentais, descritos a seguir: GC1 com 6% de glicerol (GLI), GC2 com 3% de dimetilcetamida (DMA) e GC3 com 3% de dimetilformamida (DMF). Em seguida, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25mL e colocadas horizontalmente em uma plataforma de isopor de cinco cm de altura e submetidas ao resfriamento (0,47 °C/min.) em um refrigerador de 240L (Esmaltec®, BA, Brasil) sob temperatura de 5°C, por duas horas. Posteriormente, a plataforma com as palhetas foi colocada para início da curva de congelamento, sob o vapor de nitrogênio líquido a cinco cm da lâmina líquida, por 20 minutos. Após este período, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio a -196°C e colocadas em raques devidamente identificadas, armazenadas em botijão criogênico. A descongelamento das amostras foi realizada a uma temperatura de 37°C durante 30 segundos em um banho-maria automatizado (Solidsteel®, SP, Brasil). As amostras foram avaliadas quanto a sua integridade de membrana por Citometria de Fluxo (BD LDRFortessa, BD Bioscience, EUA), com espectro entre 250-850nm. As imagens foram analisadas com software FlowJo® (FlowJo LLC, EUA). Também foi realizada avaliação de integridade estrutural de membrana plasmática, através do citômetro de fluxo, sendo utilizadas duas sondas fluorescentes: o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) 21879, Sigma Aldrich) e iodeto de propídeo (IP, P4170, Sigma Aldrich), em uma solução de trabalho composta por PBS (200µL de sêmen diluído na concentração de 2x10⁶sptz/mL), CFDA na concentração final de 20,0µM e IP na concentração final de 15µM. Foram adicionados, 5µL de IP e 5µL de CFDA. Os espermatozoides DIC+/IP-, DIC-/IP+ e DIC-/IP- foram classificados como não lesados e os DIC+/IP+, DIC-/IP+ e DIC-/IP- como não lesados. A integridade

de funcional da membrana plasmática foi estimada por meio do teste hiposmótico (HOST) (Menezes et al., 2013). As amostras foram preparadas para análise no sistema automatizado de análise seminal SCA® (Sperm Class Analyser®, Microptic, Espanha). Recolheu-se uma alíquota de 5 µl da amostra descongelada a qual for colocada sobre uma lamina pré-aquecida a 37°C, coberta por lamínula de 20x20 mm e seguidamente colocada em um microscópio de luz trinocular (Eclipse E200, Nikon, China). As imagens foram capturadas por uma câmara de vídeo (Basler AG, Alemanha) a 25 frames durante 2 segundos, em configuração para espermatozoides felinos. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, onde os ejaculados foram considerados repetições e os protocolos de processamento do semen foram considerados tratamentos. A média e desvio padrão das variáveis foram obtidas por análise descritiva. Os dados foram processados pelo Pacote estatístico SAS, Versão 9.0 (2002). Foi feita análise de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo Kruskal-Wallis e as normais pelo teste SNK. O índice de significância utilizado foi de 5%.

Resultados e Discussão- Os resultados obtidos para integridade da membrana plasmática dos espermatozoides pós-descongelção, nos diferentes grupos, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Medianas estatísticas dos parâmetros avaliados pelo método de citometria de fluxo, nos grupos segundo crioprotetor.

Parâmetros Examinados	Crioprotetor			Valor de P
	GL 6%	DMA 3%	DMF 3%	
CFDA-IP+	8.88	0.04	0.67	0.20
CFDA+IP+	20.00	0.53	72.95	0.55
CFDA-IP-	47.30	34.40	3.41	0.31
CFDA+IP-	28.70	61.00	23.00	0.48
Membranas lesadas	56.18	38.44	4.08	0.38
Membranas íntegras	21.80	61.00	23.00	0.48

Abreviações: GL, glicerol; DMA, dimetilacetamina; DMF, dimetilformamida; CFDA-|IP+, espermatozoides com membranaslesada; CFDA-|IP-, espermatozoides com membranaslesadas; CFDA+|IP+, populações de espermatozoides com membranaslesadas e íntegras; CFDA+|IP-, espermatozoides com membranaíntegra.

Obteve-se neste estudo intervalo percentual para integridade de membrana (18,9-61%) abaixo do reportado em estudo anterior para os espermatozoides de felinos (74,7-96,1%) [4], porém, em amostras seminais de felinos, criopreservados com glicerol, cita-se intervalos entre 36,8±9,5% e 44,4±11,1% [3], similares ao encontrado no presente estudo (21,8-43,8%). Segundo os autores supracitados, as comparações de integridade da membrana avaliada por citometria de fluxo, devem ser realizadas entre amostras que usaram as mesmas sondas fluorescentes, devido às diferenças que podem apresentar-se com uso de diferentes técnicas e sondas. Quando

comparou-se os resultados, de acordo com o crioprotetor, não revelaram-se diferenças ($P>0,05$) nos parâmetros examinados. Foi evidenciada uma correlação negativa moderada ($r=-0,62$, $P\leq 0,05$) entre a %HOST (teste hiposmótico), estimada por microscopia convencional, e a porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas lesadas, estimadas por citometria de fluxo, relacionando simultaneamente os critérios, dessa correlação negativa moderada e significativa entre a porcentagem de células com integridade funcional da membrana plasmática e a porcentagem de células com membrana plasmática lesada, avaliada por citometria de fluxo, era esperada já que ambas técnicas avaliam integridade da membrana celular. De forma semelhante, verificou-se uma correlação positiva moderada ($r=0,63$, $P\leq 0,05$) entre a motilidade total estimada pelo equipamento SCA® (Sperm Class Analyser) e o percentual de espermatozoides com integridade de membrana plasmática estimada pela citometria de fluxo, o que é facilmente justificado, já que as células com manutenção da cinética espermática pós-descongelamento apresentam menores injúrias na membrana plasmática.

Considerações Finais - Os resultados obtidos demonstram que a citometria de fluxo é uma técnica importante para avaliação de espermatozoides felinos pós-descongelamento, por aumentar de forma importante o número de células avaliadas (concentração mínima de $0,25 \times 10^6$ espermatozoides/mL por tubo criogênico), quando comparada a técnica de fluorescência convencional, por microscopia. Ao mesmo tempo conclui-se que as amidas podem ser alternativas seguras ao uso do glicerol, já que promoveram índices semelhantes de viabilidade celular.

Referências bibliográficas

- [1] Araujo, G.R.D., Paula, T.A.R.D., Deco-Souza, T.D., Morato, R.G., Bergo, L. C.F. Bergo, Silva, L.C.D., Costa, D.S., Braud, C. 2018. Comparison of Semen Samples Collected from Wild and Captive Jaguars (*Panthera Onca*) by Urethral Catheterization after Pharmacological Induction. *Anim. Reprod. Sci.* 195 (December 2017), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.019>.
- [2] Jiménez, E., Pérez-Marín, C. C., Vizuete, G., Millán, Y., Agüera, E. 2013. Effect of Different Extenders on in Vitro Characteristics of Feline Epididymal Sperm during Cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 48 (4), 665–72. <https://doi.org/10.1111/rda.12142>.
- [3] Villaverde, A.I.S.B., Fioratti, E.G., Ikoma, M.P., M. R.V. Tsunemi, M.H., Papa, F.O., Lopes, M.D. 2013. Cryoprotective Effect of Different Glycerol Concentrations on Domestic Cat Spermatozoa. *Theriogenology.* 80 (7), 730–37. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.010>.
- [4] Prochowska, S., Nizański, W., Partyka, A. 2016. Comparison and Analysis of in Vitro Characteristics of Fresh and Frozen-Thawed Urethral and Epididymal Spermatozoa from Cats (*Felis Domesticus*). *Theriogenology.* 86 (8), 2063–72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.002>.
- [5] Núñez-Martínez, J., Moran, J. M., Peña, F. J. 2007. Identification of Sperm Morphometric Subpopulations in the Canine Ejaculate: Do They Reflect Different Subpopulations in Sperm Chromatin Integrity?. *Zygote.* 15 (3), 257–66. <https://doi.org/10.1017/S0967199407004248>

Agradecimentos: Fundação de Amparo à pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) e Organização dos Estados Americanos (OEA).

Colheita farmacológica de sêmen em felinos domésticos: Medetomidina *versus* Dexmedetomidina

Gleice Mendes Xavier¹

Rodrigo Freitas Bittencourt¹

Email: rfb@ufba.br

Mônica Madrigal Valverde¹

Vivian Fernanda Barbosa¹

Renata Oliveira Barreto¹

Catharina Vieira Albuquerque¹

Isabella de Matos Brandão Carneiro¹

Maicon Pereira Lents¹

Elton Amorim Romão¹

Pamela Santiago Campos¹

Abstract: The pharmacological collection with the use of alpha-2-adrenergic agonists is a recent technique in the feline species. Thirteen adult domestic cats were submitted to seminal collection through urethral catheterization, divided into two groups, the first group (GD1): received medetomidine and ketamine drugs; and the second group (GD2): dexmedetomidine hydrochloride and ketamine, both intramuscularly. The seminal variables were evaluated. Among the animals used in the study 85.71% of the GD1 and 66.67% GD2 responded positively to the seminal harvest. There was no difference ($P > 0.05$) between the percentage of response to treatment or seminal variables between the groups. There was a difference between the procedures completion times between groups ($P = 0.05$), with the GD2 group having a shorter time. Therefore, both medetomidine and dexmedetomidine are effective inducers of chemical ejaculation for seminal collection through urethral catheterization, presenting similar seminal quality, time of reach of the anesthetic state and time of recovery.

Keywords: cat sperm, *felis catus*; alfa-2 adrenergic agonist; feline males.

Palavras-chave: sêmen felino; *felis catus*; agonistas alfa-2 – adrenérgicos; gato.

Introdução – A partir da década de 90 a comunidade científica começou a apresentar interesse pela preservação de espécies ameaçadas de extinção. Esse foi considerado o marco para o desenvolvimento de biotecnologias da reprodução de carnívoros. Desde então os carnívoros domésticos são utilizados como modelos experimentais. Os felinos são animais que são considerados poliéstricos estacionais de fotoperíodo positivo. A fisiologia reprodutiva desses animais é complexa e apresenta uma variedade de desafios únicos na biologia da conservação [1].

O método mais utilizado para colheita de sêmen de felinos domésticos é a eletroejaculação, onde o animal é anestesiado e condicionado a estímulos elétricos no qual promove a

¹ Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, CEP 40170-110 Salvador, Bahia, Brasil.

ejaculação. Outro método que vem sendo estudado é a colheita farmacológica, que utiliza fármacos que promovem a contração dos ductos deferentes ocorrendo a liberação de sêmen, com o auxílio de um cateter introduzido na uretra peniana. Os agonistas alfa-2 – adrenérgicos, são exemplos de fármacos que têm sido utilizados para induzir a ejaculação em animais domésticos. A cateterização uretral é uma técnica recentemente desenvolvida por Zambelli et al., [3] para a colheita de sêmen em felinos, porém requer a sedação do animal [2–3].

Dentre os agonistas alfa-2 – adrenérgicos, temos a medetomidina que é um potente agonista alfa-2 adrenérgico, que age promovendo sedação, analgesia e relaxamento muscular [4] e a dexmedetomidina que é um agonista alfa-2 – adrenérgico mais seletivo que a medetomidina e entre seus efeitos encontra-se a sedação, analgesia e ansiólise [5]. Sendo assim, objetivou-se estudar os efeitos na colheita do sêmen e a qualidade seminal comparativos dos agonistas alfa-2 – adrenérgico (medetomidina e dexmedetomidina) utilizados na obtenção de sêmen por cateterização uretral em gato doméstico.

Material e Métodos - Para esse estudo foram utilizados 13 gatos machos, sem raça definida, adultos e sadios, com idade entre 1 e 4 anos e peso médio de 4.50 ± 0.44 kg, atendidos no Hospital Veterinário Renato Rodenburg de Medeiros Neto da Universidade Federal da Bahia (Hospmev/UFBA). O protocolo do estudo foi aprovado seguindo as normas preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (Protocolo CEUA EMEVZ-UFBA nº 10/2016).

Os animais foram divididos em grupos procurando-se homogeneidade de peso e idade. O primeiro grupo de 7 animais (GD1) foram anestesiados utilizando-se cloridrato de medetomidina ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$ im; Domitor®, 1.0mg/mL, Orion Pharma, Group Orion, Italia) e cetamina ($5 \text{mg}/\text{kg}$ im; Syntec® 10%, Tecnologia Farmacêutica Aplicada a Medicina Veterinária, São Paulo, Brasil). O estado anestésico adequado, com visível relaxamento muscular e ausência de resposta a estímulo álgico foi obtido aos 3.58 ± 1.70 minutos. O segundo grupo de 6 animais (GD2) foi anestesiado utilizando Cloridrato de dexmedetomidina ($0.025 \text{mg}/\text{kg}$ im; Dexdomitor®, 0.5 mg/mL, Zoetis, Orion Pharma, Brasil) e cetamina ($5 \text{mg}/\text{kg}$ im; Syntec® 10%, Tecnologia Farmacêutica Aplicada a Medicina Veterinária, São Paulo, Brasil). O estado anestésico adequado do grupo GD2 foi alcançado em 4.29 ± 1.67 minutos.

Entre 15 e 20 minutos após a administração dos fármacos, realizou-se a colheita do sêmen com o auxílio de uma sonda (sem janela lateral, 1 mm diâmetro e 13 cm de comprimento) estéril e lubrificada (Provar®, Provar Ltda, São Paulo, Brasil), inserida na uretra peniana até uma profundidade de 7-9 cm. Logo após, foi acoplada a sonda uma seringa de 1 mL, com objetivo de realizar uma pressão negativa para aumentar efeito de sucção. Após obtenção da amostra, a sonda foi retirada e a amostra foi colocada em um tubo de polipropileno previamente preaquecido de 1.5 mL com $50 \mu\text{L}$ de diluente Tris-gema. Imediatamente depois da colheita de sêmen os animais foram submetidos à orquiectomia eletiva.

As variáveis seminais das amostras avaliadas foram: o volume, o vigor espermático, a motilidade total, a motilidade progressiva, a concentração espermática, a integridade estrutural e a funcional da membrana plasmática e morfologia espermática e os parâmetros foram

estabelecidos de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [7]. O programa empregado para análise estatística foi o Statistical Package for Social Science (SPSS, versão 13.0) e o estudo das médias e correlações feito com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão - Foi verificada a homogeneidade dos grupos, pois não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao peso e a idade ($P>0.05$). Dentre os animais utilizados no estudo 85.71% do GD1 e 66.67% GD2 responderam positivamente a colheita seminal. Não houve diferença ($P>0.05$) entre a porcentagem de resposta ao tratamento, tempos de alcance do estado anestésico adequado e tempo de recuperação (posição quadrupedal) entre os grupos. Encontrou-se uma diferença entre os tempos do término dos procedimentos (aplicação do reversor, após orquiectomia) entre os grupos ($P=0.05$), tendo o grupo GD2 um tempo menor (49.17 ± 7.03 min) do que o tempo do GD1 (57.11 ± 5.16 min). Não houve diferença significativa ($P>0.05$) para as variáveis: volume, vigor, motilidade total e progressiva, integridade estrutural e funcional da membrana, concentração espermática e porcentagem de espermatozoides morfonormais para as amostras dos grupos segundo o fármaco utilizado.

Como na literatura consultada não foram encontrados relatos, acredita-se que este estudo possa ser o primeiro estudo que compara a eficácia da medetomidina e dexmedetomidina para a colheita farmacológica de felinos domésticos, que pode ser amplificada para felinos silvestres. Entre os fármacos testados, ambos apresentaram resultados semelhantes, diferindo apenas no tempo de término do procedimento, no qual o GD2 apresentou tempo menor ($P<0,05$), o que pode ser justificado pelo fato da equipe estar mais sincronizada, já que os animais do GD2 foram submetidos ao procedimento posteriormente ao GD1, o que pode ter influenciado na diminuição do tempo em 8,34 minutos, após recuperação pós-cirúrgica. Os valores obtidos para as variáveis seminais avaliadas nesse estudo foram semelhantes às apresentadas por outros autores [8, 9, 10, 11, 12].

Considerações Finais – Sendo assim, conclui-se que tanto a medetomidina quanto a dexmedetomidina são eficazes para a colheita uretral de sêmen felino e com tempos de alcance do estado anestésico e recuperação semelhante. Como diversos países como o Brasil, não apresentam a medetomidina comercial, a dexmedetomidina torna-se uma alternativa viável para colheita farmacológica do sêmen em felinos domésticos.

Referências bibliográficas

- [1] Luvoni, C.G. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vivo* embryo production. **Reproduction Nutrition Development**, 2000; v.40, p.505-512.
- [2] Martins, M.I.M., Justino, R.C. Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.136-140. 2015.
- [3] Zambelli, D., Prati, F., Cunto, M., Iacono, E., Merlo, B. Quality and *in vitro* fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. **Theriogenology**, v.9, v.1, p. 485-490, 2008.

- [4] Zambelli, D., Raccagni, R., Cunto, M., Andreania, G., Isania, G. Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 1396-1402. 2010.
- [5] Nasrallah, F.A, Lew, S.K, Low, A.S.M, Chuang, K.H. Neural correlate of resting-state functional connectivity under $\alpha 2$ adrenergic receptor agonist, medetomidine. **Neuroimage** [Internet]. 2014;84:27–34.
- [6] Bhana N, Goa KL, McClellan K.J.M. Dexmedetomidine. **Drugs**. 2000; 59(2):263–8.
- [7] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** (CBRA). 3rd ed. Belo Horizonte; 2013.
- [8] Jelinkova K, Vitasek R, Novotny R, Bartoskova A. A comparison of quality parameters of fresh feline ejaculates collected by three different collection techniques. **Reprod Domest Anim**. 2018;53(5):1068–74.
- [9] Jiménez E, Pérez-Marín C.C, Millán Y, Agüera E. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. **Anim Reprod Sci**. 2011;123(3–4):265–9.
- [10] Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, Zambelli D, Anastasi P, Hoogewijs M, et al., In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: A comparison of two collection techniques. **Theriogenology** [Internet]. 2010;74(1):31–9.
- [11] Scrollavezza P, Tambella A.M, Vullo C, Palumbo Piccionello A. Evaluation of the muscular relaxant effect of dexmedetomidine or medetomidine in cats. **Vet Res Commun**. 2009;33(SUPPL. 1):213–5.
- [12] Swanson WF, Bateman HL, Vansandt LM. Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. **Reprod Domest Anim**. 2017;52:255–60.

Comparação entre dois fármacos alfa dois agonistas para a colheita farmacológica de sêmen de gatos domésticos

Maitê Cardoso Coelho da Silva¹

Karitha Marques Ullony¹

Gediendson Ribeiro de Araújo¹

gediendson@gmail.com

Pedro Nacib Jorge-Neto²

Thyara de Deco-Souza¹

Abstract: We aimed to evaluate the detomidine, comparing it with the medetomidine, for the collection of cat semen through urethral catheterization. Thirteen cats were used for semen collection using detomidine and medetomidine, through catheterization of the urethra using a tomcat catheter with front opening only. 19 collections were performed with medetomidine with a success rate of 94.4%; and using detomidine we obtained 56.3% of 16 collections. Mainly, the detomidine group was not succeeded due to azoospermic samples, lack of urethral relaxation, insufficient volume to carry out all the analyzes and urine contamination. Also, the sperm concentration was lower in detomidine group ($p < 0.05$). Although detomidine has underperformed for the semen collection in cats, it may be an alternative method where medetomidine is not accessible.

Keywords: detomidine; medetomidine; reproduction.

Palavras-chave: detomidina; medetomidina; reprodução.

Introdução – Nos últimos anos, o crescimento da demanda de gatos domésticos como animal de estimação despertou interesse pelos criadores por biotecnologias reprodutivas, visando não só a colheita do sêmen, mas a criopreservação para seguro genético. Paralelamente, o gato doméstico é a espécie de eleição para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas em felídeos silvestres. Dentre os métodos de colheita de sêmen em felinos, destacam-se a vagina artificial e a eletroejaculação (EJ). Apesar dos bons resultados com a vagina artificial em gatos, a dificuldade de sua execução (necessário o condicionamento do animal e da presença de uma fêmea em estro), acaba por não ser o método mais prático. Desta forma, a EJ é o método mais utilizado em felídeos, porém, as amostras são diluídas e com eventuais contaminações por urina [1,2].

Em felinos, os sedativos agonistas de receptor alfa-2 adrenérgicos ($\alpha 2A$), como a medetomidina, não induzem a ereção, contudo, liberam o ejaculado para a uretra, permitindo assim a colheita do sêmen através de uma sonda uretral. Esta técnica, além de ser mais prática,

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

² Universidade de São Paulo.

contorna vários efeitos indesejados da EJ, obtendo amostras com menor volume, menor pH, porém com maiores concentrações espermáticas [3,4,5].

Todavia, mesmo com notáveis resultados desta técnica, a medetomidina não é de fácil acesso e possui custo elevado, o que leva a necessidade de substituir esta droga por outro α 2A como a detomidina, comercializada no país a um preço mais acessível. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a efetividade da detomidina em comparação com a medetomidina na realização da colheita de sêmen por cateterização uretral em gatos domésticos.

Material e Métodos - Este trabalho foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (Protocolo 726/2015). Foram utilizados treze gatos machos inteiros sem raça definida, com a idade mínima de um ano, saudáveis e pesando entre 2,2kg e 5,6kg. Os animais foram mantidos por seus tutores em casa, alguns com acesso à rua, e todos alimentados com ração e água potável *ad libitum*. Os protocolos testados foram: 1) Controle: medetomidina (0,1mg/Kg; Precision Pharmacy, CA, USA) e cetamina (5mg/kg; Dopalen®, Vetbrands, SP), por via intramuscular (IM); 2) Tratamento: detomidina (0,25mg/Kg; Dormium V®, Agener, SP) e cetamina (5mg/kg; Dopalen®, Vetbrands, SP), IM. Caso o animal não alcançasse o plano anestésico ideal com 10 minutos, era aplicado metade da dose da associação anestésica para nova tentativa de colheita. Ao final de cada colheita, a anestesia era revertida com ioimbina (0,4mg/Kg) IM. Durante todo o procedimento os animais foram monitorados por médicos veterinários anestesistas. Aguardou-se um intervalo mínimo de uma semana entre os procedimentos, para reduzir os efeitos desfavoráveis da anestesia. Os animais foram submetidos a um prévio jejum alimentar de oito horas e hídrico de quatro horas.

Anteriormente à colheita de sêmen avaliou-se a consistência dos testículos e a presença de espículas penianas. Aguardou-se no mínimo dez minutos após a aplicação do sedativo para iniciar a colheita de sêmen. Para isso, após a exposição do pênis e lubrificação com soro fisiológico a 37°C, era introduzida entre 7 e 9 cm de uma sonda uretral tipo Tomcat sem janela lateral (Provar®, Provar LTDA, SP) estéril e descartável, com cuidado para não lesar a mucosa uretral. Nos animais que não se colheu sêmen na primeira sondagem, era realizada massagem transretal na próstata, por toque digital, para estimular a glândula e a liberação de mais espermatozoides na uretra [3,5].

O sêmen foi armazenado em um tubo de plástico graduado com 40 μ L de meio comercial CaniPro Chil® (Minitübe, Alemanha), aquecido e mantido a 37°C para aumento do volume de manipulação. Com uma micropipeta de volume ajustável, foi aferido o volume (descontando o volume acrescido de meio) e posteriormente retirado 2 μ L do sêmen para avaliar vigor (escala de zero a cinco) e a motilidade progressiva. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer espelhada na diluição de 1:100, em microscópio óptico (200x). Ejaculados com concentração inferior a 1x10⁶ espermatozoides (spz)/mL foram considerados como oligospermicos. Os critérios utilizados para considerar insucesso na colheita foram a falta de relaxamento uretral que impedisse a sondagem uretral, a contaminação por urina, azoospermia e o baixo volume colhido (<2 μ L).

O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. A normalidade foi verificada através do teste Kolmogorov-Smirnov. A diferença entre as amostras foi analisada pelo teste T de Student pareado para os testes que apresentaram distribuição normal, e para aqueles que não apresentaram normalidade, a eleição foi do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Resultados e Discussão – Por meio de ambos os protocolos foi possível colher sêmen dos gatos, porém obteve-se sucesso de 94,5% (18 das 19 tentativas) com a medetomidina e de 56,3% (nove das 16 tentativas) com a detomidina. Entre os insucessos no protocolo detomidina, a azoospermia foi a mais frequente (4), seguido de pouco relaxamento uretral, volume insuficiente e contaminação por urina (uma ocorrência para cada). Além disso, três animais no protocolo detomidina foram considerados oligospermicos (obtiveram menos de 1×10^6 spz totais). Além da menor eficiência nos procedimentos de colheita de sêmen, o uso da detomidina também resultou em amostras menos concentradas ($p < 0,05$) porém sem diferença no total de espermatozoides colhidos (Tabela 1). Estas diferenças podem estar relacionadas com a especificidade de ligação a receptores alfa-2 adrenérgicos (R- α_2) de cada um desses sedativos. A medetomidina e a detomidina estão entre os sedativos α_2A com maior especificidade de ligação aos R- α_2 , mas também se ligam a receptores alfa-1, sendo a medetomidina muito mais específica que a detomidina (com proporção de especificidade de ligação a receptores α_2 : α_1 de 1620:1 e 260:1, respectivamente) [8]. No aparelho urogenital, é a estimulação dos R- α_2 que promove o relaxamento do ducto deferente e da musculatura uretral [6,7], liberando os spz na uretra e permitindo sua colheita por meio de cateterização uretral [3,9]. Sendo assim, possivelmente a menor seletividade de ligação a R- α_2 pela detomidina resultou em menor capacidade de relaxamento dos ductos deferentes e da uretra, resultando na maior sensibilidade ao procedimento de sondagem uretral e menor liberação de sêmen.

Este é o primeiro trabalho que relata o uso da detomidina na colheita de sêmen em felinos. A medetomidina, no entanto, já é amplamente usada para esta finalidade [3,4,5,9]. Em gatos, ao se comparar diferentes doses de medetomidina na colheita farmacológica, Cunto et al. [10] observaram que sêmen coletado com a dose mais baixa (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) demonstrou menor qualidade em termos de concentração, volume, vigor e motilidade em relação à dosagem mais alta (130 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Além disso, a dosagem mais baixa demonstrou pior desempenho na sedação e no relaxamento da uretra, dificultando a sondagem. Esses resultados reforçam a teoria de que a menor estimulação dos R- α_2 interfere na eficiência de colheita e na qualidade do sêmen colhido pelo método farmacológico.

Tabela 1: Colheita de sêmen usando detomidina ou medetomidina em gatos

	Detomidina	Medetomidina
Volume (μL)	11,0 \pm 4,4 ^a	8,50 \pm 7,1 ^a
Concentração (spz $\times 10^6/\text{mL}$)	761,2 \pm 1205,3 ^a	3245,7 \pm 3383,5 ^b
Total ($\times 10^6$ spz)	9,5 \pm 17,1 ^a	21,7 \pm 17,9 ^a
Vigor	2,8 \pm 0,9 ^a	4,1 \pm 0,7 ^b
Motilidade (%)	32 \pm 31,1 ^a	71,7 \pm 14,3 ^a

*Dados apresentados em Média \pm desvio padrão. Valores com letras diferentes na mesma linha diferiram entre si ($p < 0,05$).

Conclusões – Foi possível concluir que a detomidina pode ser usada como substituto da medetomidina na colheita de sêmen pelo método farmacológico em gatos, porém devido ao desempenho superior no sucesso de coleta e na qualidade do sêmen colhido, a medetomidina deve ser a medicação de eleição. Quanto às características da sedação, ambos os protocolos foram considerados igualmente seguros pela equipe de anestesiistas.

Referências bibliográficas

- [1] Dooley MP, Pineda MH, Hopper JG, Hsu WH. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of cats during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. **Am J Vet Res** 1991; 52:687-691.
- [2] Zambelli D, Cunto M, Prati F Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. **Theriogenology** 2007; 68:796-803.
- [3] Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E, Merlo B. Quality and *in vitro* fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. **Theriogenology** 2008; 69:485-490.
- [4] Lueders L, Luther L, Scheepers G, van der Horst G. Improved semen collection method for wild felids: urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). **Theriogenology** 2012; 78:696-701.
- [5] Araujo GR, Paula TAR, Deco-Souza T, Morato RG, Bergo LCF, Silva LCD, Costa DS, Braud C. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. **Anim Reprod Sci** 2018; 195:1-7.
- [6] Virtanen R, Savola JM, Saano V, Nyman L Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an α 2-adrenoceptor agonist. **Eur J Pharmacol** 1988; 50:9-14.
- [7] Muir WW, Hubbell J. **Handbook of Veterinary Anesthesia**. 3rd ed. St. Louis; 2000.
- [8] Pawson P. Sedatives. In: Maddison J, Page S, Church D (Eds.) **Small animal clinical pharmacology**. 2 ed. London, 2002, p.101-114.
- [9] Prochowska S, Niżański W, Ochota M, Partyka A. Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats - A retrospective study of 214 cases. **Theriogenology** 2015; 84: 1565-1571.
- [10] Cunto M, Küster DG, Bini C, Cartolano C, Pietra M, Zambelli D. Influence of Different Protocols of Urethral Catheterization after Pharmacological Induction (Ur.Ca.PI.) on Semen Quality in the Domestic Cat. **Reproduction Dom Anim** 2015; 50:999-1002.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Correlação do escore de degeneração testicular e cinética espermática de cães sem alterações clínicas

Luiz Guilherme Corsi Trautwein¹
Emilly Pittman de Castro¹
Jamile Haddad Neta¹
Anne Kemmer Souza¹
Guilherme Schiess Cardoso¹
Giovana Wingeter di Santis²
Maria Isabel Mello Martins¹
imartins@uel.br

Abstract: The present study aimed to evaluate the influence of testicular degeneration on the kinetics of movement, morphology and sperm integrity of healthy dogs. Testicles were evaluated from 41 dogs, 2 to 8 years old, submitted to elective orchietomy, and epididymal spermatozoa were collected. The testicular histopathology was performed, and the degeneration score (0 to 9) was compared with the sperm characteristics using the Pearson correlation, $p < 5\%$. Some degrees of degeneration (score > 0) were identified in 19 (46.3%) of the evaluated testicles. There were low to moderate correlation between motility, rapid and static spermatozoa with the degeneration score, however, they did not interfere with reproductive clinics of the animals. It was concluded that in healthy dogs there are no interference of histopathological score of testicular degeneration in the quality of epididymal spermatozoa was identified.

Keywords: CASA system, testicular degeneration, epididymal spermatozoa.

Palavras-chave: sistema CASA, degeneração testicular, espermatozoides epididimários.

Introdução – Para que animais participem de programas de reprodução assistida é necessário que passem pela avaliação espermática, que permite prever o potencial de machos como reprodutores [1]. Para realização do espermograma, a colheita de espermatozoides pode ser feita a partir de dois métodos: por manipulação digital, à qual se obtêm o sêmen [2] ou recuperação de espermatozoides do epidídimo [3]. Embora a técnica de manipulação digital seja a mais empregada, a colheita de espermatozoides epididimários pode ser utilizada a partir dos testículos de animais castrados ou reprodutores de alto valor genético que vieram a óbito. A análise de alterações espermáticas geralmente é realizada de forma subjetiva em microscópio óptico; porém, esses resultados podem apresentar variações de até 60% [4]. Portanto, foi desenvolvida a análise computadorizada com a utilização do sistema CASA que, por ser um método objetivo, fornece confiabilidade na obtenção dos resultados [5, 6]. Nessa

¹ Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

modalidade cada espermatozoide é avaliado individualmente em relação ao seu movimento e à sua trajetória [6]. Os testículos são formados pelos túbulos seminíferos e tecido conjuntivo, o epitélio seminífero é muito sensível a injúrias como inflamações e isquemias [7]. A degeneração do epitélio seminífero é a mais relevante afecção testicular, levando o tecido normal a um estado funcional menos ativo [8]. Na medicina humana existem estudos correlacionando o grau de degeneração testicular com a avaliação espermática, utilizando escores de avaliação histopatológica [9]. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo realizar a colheita de espermatozoides epididimários de cães saudáveis, avaliar as características de cinética e morfologia espermática, determinar a classificação histopatológica e correlacionar com o escore de degeneração testicular, a fim de avaliar a influência da degeneração testicular na qualidade espermática de cães.

Material e Métodos - Este estudo foi aprovado pela CEUA institucional sob o número 9402.2016.99. Foram avaliados 41 testículos de cães saudáveis, com idade entre 2 e 8 anos, peso médio de $11,6 \pm 5,5$ kg. Os animais foram submetidos à orquiectomia eletiva e, imediatamente após, foi realizada a recuperação de espermatozoides epididimários em 200 μ L de solução fisiológica, pela ordenha da cauda do epidídimo e ducto deferente. As amostras foram avaliadas em sistema automatizado (CASA, Ivos II, Beverly, USA), com o *setup* para cães. Para o cálculo dos índices de motilidade (SMI) e velocidade (SVI) foi utilizada a equação descrita por Nunez-Martinez et al. [10]. A morfologia e integridade espermáticas foram avaliadas em esfregaços corados com eosina/nigrosina, com a contagem de 100 células. Os testículos foram seccionados e processados em dois ou três fragmentos para cada um dos testículos (cranial, medial e caudal), dependendo do seu tamanho. Foram submetidos à desidratação com álcool (80% a absoluto) e, depois, lavados em xilol e embebidas em parafina histológica (Reatec, Colombo, Brasil). As lâminas foram montadas com cortes histológicos de 5 nm em micrótomo automático (LEICA RM2255, Londrina, Brasil) e coradas com hematoxilina e eosina. Para a classificação histológica de degeneração testicular foram utilizados como base os critérios de Thomé et al. [8]. A partir dessa classificação foi proposto um escore baseado no grau de intensidade da lesão, descrito no Quadro 01. Foi realizada a média do escore entre os dois ou três cortes histológicos dos testículos. Para a análise estatística os testículos classificados com escore 0 (normais) foram excluídos e mantidos apenas aqueles que possuíam algum grau de degeneração. O escore foi comparado com as variáveis espermáticas pelo teste de correlação de Pearson, nível de significância $< 5\%$ e software SigmaPlot 11.0.

Quadro 01. Classificação histopatológica da degeneração testicular e escore.

Classificação	Quantificação	Score	Característica histopatológica
Normal	---	0	---
Degeneração discreta	focal	1	Túbulos seminíferos com atividade espermatogênica reduzida, espermatogônias com vacuolização citoplasmática e núcleos picnóticos.
	multifocal	4	
	difusa	7	
Degeneração moderada	focal	2	Atividade espermatogênica reduzida em maior intensidade e presença do epitélio germinativo em lúmen tubular
	multifocal	5	
	difusa	8	
Degeneração grave	focal	3	Ausência de atividade espermatogênica, presença de células do epitélio germinativo, assim como células multinucleadas no lúmen tubular
	multifocal	6	
	difusa	9	

Resultados e Discussão – Os resultados obtidos no sistema CASA foram descritos em média e desvio padrão, a saber: motilidade = $77,7 \pm 8,3\%$; motilidade progressiva = $51,9 \pm 9,2\%$; espermatozoides rápidos = $72,7 \pm 9,9\%$; espermatozoides estáticos = $12,9 \pm 6,7\%$; velocidade média de trajetória (VAP) = $133,4 \pm 12,2 \mu\text{m/s}$; velocidade linear progressiva (VSL) = $105,3 \pm 13,2 \mu\text{m/s}$; velocidade curvilínea (VCL) = $224,4 \pm 16,9 \mu\text{m/s}$; amplitude de deslocamento lateral (ALH) = $8,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$; frequência de batimento flagelar (BCF) = $27,3 \pm 2,7 \text{ Hz}$; retilinearidade (STR) = $77,1 \pm 3,8\%$; linearidade (LIN) = $48,2 \pm 6,7\%$; índice de oscilação (WOB) = $60,2 \pm 6,0\%$; índice de movimento (SMI) = $275,9 \pm 25,1$; índice de velocidade (SVI) = $401,6 \pm 26,8$. Houve correlação entre o escore de degeneração histopatológico e a motilidade ($r = 0,47$), quantidade de espermatozoides rápidos ($r = 0,51$) e estáticos ($r = 0,51$). Não houve correlação entre o escore e a morfologia ou integridade de membrana espermática. A média de escore de degeneração foi $2,4 \pm 1,5$ (mínimo = 0,6; máximo = 4,7). A correlação estatística encontrada foi considerada baixa a moderada [11] e parece não ter influenciado na clínica reprodutiva destes animais, visto que a média de motilidade foi de 77,7%. Isso pode ter ocorrido por não ter sido identificado nenhum testículo com degeneração difusa ou extensa a ponto de comprometer a viabilidade espermática, sendo que o testículo com maior escore foi 4. Esses dados corroboram o estudo que mostrou que o processo degenerativo não acomete o órgão como um todo e túbulos não acometidos permanecem com produção normal de espermatozoides [8]. No presente estudo, os testículos eram provenientes de animais sem histórico de infertilidade. Portanto, novos estudos são necessários para comprovar a eficiência de escores de degeneração histopatológica relacionados à eficiência reprodutiva do paciente, especialmente em cães com histórico prévio de infertilidade, como idosos ou que foram submetidos a tratamento quimioterápico.

Considerações Finais - Conclui-se que em cães sem alterações clínicas não foi identificada interferência de escore histopatológico de degeneração testicular na qualidade de espermatozoides epididimários.

Referências bibliográficas

- [1] Johnson CA. Distúrbios do sistema reprodutivo. In: NELSON RW, COUTO CG, editors. Medicina interna de pequenos animais. 4ª ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
- [2] Aquino-Cortez A, Pinheiro BQ, Lima DBC, Silva HVR, Mota-Filho AC, Martins JAM, et al. Proteomic characterization of canine seminal plasma. *Theriogenology*. 2017;95:178-86.
- [3] Silva LDM, Mota Filho AC. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. *Acta Veterinaria Brasilica*. 2012;6:1-8.
- [4] Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Tonioli R. Análise Computarizada De Espermatozóides: Revisão De Literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2008;32:225-32.
- [5] Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 2014;81:5-17.e1-3.
- [6] Gallagher MT, Smith DJ, Kirkman-Brown JC. CASA: tracking the past and plotting the future. *Reprod Fertil Dev*. 2018.
- [7] Kokoua A, Tre Yavo M, Santos KA, Homsy Y, Mobiot ML, Gnanazan Bi N'Guessan G. [Importance of the testicular artery: histo-functional approach and comparison between juvenile and adult rats]. *Morphologie : bulletin de l'Association des anatomistes*. 2004;88:31-4.
- [8] Thomé HE, Di Santis GW, Moura VMBD, Amorim RL, Bandarra EP. Avaliação histopatológica testicular e epididimária em cães adultos sem raça definida (SRD) na região de São João do Boa Vista. *Ciência Animal Brasileira*. 2007;8:745-55.
- [9] Puhse G, Hense J, Bergmann M, Kliesch S. Bilateral histological evaluation of exocrine testicular function in men with obstructive azoospermia: condition of spermatogenesis and andrological implications? *Hum Reprod*. 2011;26:2606-12.
- [10] Nunez-Martinez I, Moran JM, Pena FJ. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod Domest Anim*. 2006;41:408-15.
- [11] Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*. 2012;24:69-71.

Agradecimentos: Ao CNPq pela bolsa de estudos.

Influência do estresse e da estimulação tátil sobre o desempenho e comportamento da prole de coelhos Nova Zelândia

Ana Larissa Barbosa Monteiro¹
analari1996@hotmail.com

Luiza Marin Bernardes¹

Bruno Zomkowski de Azevedo¹

Kassy Gomes da Silva¹

Tâmara Duarte Borges¹
tamaratdb@hotmail.com

Leandro Batista Costa¹

Abstract: The objective of this work was to evaluate the effect of moderate stress (ES) and tactile stimulation (ET) of primiparous rabbits during pregnancy and their influence on the performance and sexual behavior of male offspring. Thirty New Zealand rabbits in reproductive age were distributed in three treatments: Control Group (C) - the animals did not undergo any type of stress/ human stimulation; Group ES - the animals were placed in a dark plastic box; Group ET - performed brushing on the dorsal line of the animal; For ES and ET, treatment took place daily until parturition and for a total period of 3 minutes. There was no statistical difference between treatments ($P>0.05$) to sexual behavior and spermiogenesis. It is concluded that the manipulation of primiparous rabbits during the gestational period does not changes sexual behavior and/or spermiogenesis of the male offspring, regardless of the stimulus applied.

Keywords: Primiparous female rabbits, sexual behavior, spermiogenesis.

Palavras-chave: Coelhas primíparas, comportamento sexual, espermiogênese.

Introdução - A cunicultura vem buscando a implementação de tecnologias que melhorem a produtividade, destacando aquelas relacionadas ao bem-estar animal. Neste contexto, o contato positivo (estimulação tátil) tem demonstrado bons resultados em animais, diminuindo o medo e o estresse. Porém, poucos estudos têm explorado tais benefícios para animais de produção, sendo que para coelhos somente dois trabalhos até o presente momento se destacam, mas nenhum utilizando a estimulação tátil em período gestacional (Verwer et al., 2009; Hecker, 2013).

Durante a fase gestacional, o comportamento maternal das coelhas pode ser influenciado por diversos fatores ambientais, com consequências diretas nos filhotes. Estudos com ratas prenhes verificaram que o estresse durante a gestação ocasionou a desmasculinização dos

¹ Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR – Escola de Ciências da Vida – Curso de Medicina Veterinária.

filhotes machos quando estes foram expostos à primeira tentativa de cópula (Ward, 1972). A justificativa biológica para tal ocorrência, é que o feto, durante a gestação, tem uma dependência direta do equilíbrio hormonal da mãe, e quando esta passa por situações consideradas estressantes, a homeostase não se mantém, afetando a diferenciação sexual (Money, 1971). Desta forma, a presente pesquisa tem por objetivo avaliar os efeitos do estresse moderado e da estimulação tátil em coelhas primíparas durante a fase gestacional sobre o desempenho e o comportamento sexual dos filhotes machos.

Material e Métodos - O estudo foi realizado no setor de cunicultura da Fazenda Experimental Galha Azul da Pontifícia Universidade do Paraná (PUCPR) com aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais sob protocolo número 01070B. Foram utilizadas 30 coelhas fêmeas primíparas da raça *Nova Zelândia*, com 5 meses de idade, distribuídas individualmente em gaiolas de arame galvanizado. As fêmeas foram acasaladas com machos reprodutores do setor, de mesma raça, e dez dias após a cobertura, se realizou o exame ultrassonográfico para confirmação da prenhez. Após a confirmação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três tratamentos: Grupo Controle (C) – os animais não sofreram nenhum tipo de estresse/estimulação humana, seguindo a rotina normal da granja; Grupo ES - consistiu em diariamente retirar a fêmea da gaiola, colocando-a em uma caixa plástica, por um período total de três minutos, e a cada minuto realizar uma movimentação lateral da caixa (Cook et al., 2000). Grupo ET - consistiu em escovar as fêmeas, utilizando uma escova de cerdas macias. O procedimento de escovação foi realizado na própria gaiola da coelha pelo período de três minutos, respeitando a movimentação de uma escovação por segundo na região dorsal do animal. Para que as coelhas não tivessem nenhuma interferência ambiental, sua visão foi tapada pela mão do manejador.

Após o parto os filhotes machos foram acompanhados em três momentos, aos 5, 6 e 7 meses de vida (caracterizando o período reprodutivo ativo dos coelhos). Para observação do comportamento sexual, introduziu-se uma fêmea em idade reprodutiva na gaiola do macho e os comportamentos de tentativa de cópula e ejaculação foram mensurados. Para as análises espermáticas, coletou-se o sêmen dos animais através de vagina artificial, e as seguintes mensurações foram feitas: volume (ml), coloração, motilidade espermática (%), vigor espermático (%) e concentração de espermatozoides (mm^3). Considerou-se um sêmen apto para a reprodução quando este apresentava coloração opalescente branca e homogenia, com motilidade dos espermatozoides igual ou superior a 80%, segundo metodologia de Boiti et al. (2005).

Para as análises estatísticas utilizou-se o método de comparação de Fisher avaliando o comportamento sexual (monta e ejaculação) e número de filhotes aptos à reprodução pelo teste de espermiogênese. Considerado uma significância de 95% ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão - Dentro da reprodução, a análise de sêmen se faz importante para garantir a qualidade da prole gerada, e para conferir ao macho seu potencial para se tornar reprodutor no plantel. No presente estudo os testes de comportamento sexual e testes esper-

máticos foram realizados aos 5, 6 e 7 meses de idade, período sexual ativo dos coelhos. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os filhotes provenientes de mães que receberam os tratamentos ET, ES e C, para as características reprodutivas e ao longo do tempo (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de machos aptos à reprodução (sêmen), que realizaram comportamento sexual de monta e de ejaculação entre as mensurações mensais (mês 5, 6 e 7) em função dos diferentes tratamentos aplicados nas coelhas-mães.

Variável	Mês	Tratamento		
		Controle (n=23)	Estimulação (n=12)	Estresse (n=11)
Sêmen (n)*	5	20 ^{aA}	8 ^{aA}	9 ^{aA}
	6	15 ^{aA}	10 ^{aA}	7 ^{aA}
	7	16 ^{aA}	9 ^{aA}	9 ^{aA}
Monta (n)	5	21 ^{aA}	10 ^{aA}	8 ^{aA}
	6	23 ^{aA}	10 ^{aA}	11 ^{aA}
	7	23 ^{aA}	10 ^{aA}	10 ^{aA}
Ejaculação (n)	5	21 ^{aA}	6 ^{aA}	8 ^{aA}
	6	23 ^{aA}	7 ^{aA}	9 ^{aA}
	7	22 ^{aA}	8 ^{aA}	9 ^{aA}

*Relativo à quantidade de animais considerados aptos para a reprodução, referindo-se aos que apresentassem comportamento de monta, ejaculação e um sêmen com coloração opalescente branca e com homogenia, com motilidade dos espermatozoides igual ou superior a 80% de acordo com metodologia descrita por Boiti et al. (2005). ^{a-b} representam diferenças significativas ($P < 0,05$) na linha entre a quantidade de animais pelo teste exato de Fisher. ^{A-B} representam diferenças significativas ($P < 0,05$) na coluna entre os meses pelo teste exato de Fisher.

Sobre os índices reprodutivos dos machos da prole, se considerou animais aptos à reprodução aqueles que apresentaram comportamento de monta, ejaculação e um sêmen com coloração opalescente branca e com homogenia, com motilidade dos espermatozoides igual ou superior a 80%, segundo metodologia de Boiti et al. (2005). Além disso, o intervalo de um mês entre as coletas é considerado coerente para que não influencie no seu desempenho sexual e nem na espermatogênese, uma vez que coelhos reprodutores podem estar aptos a realizarem a cópula com intervalos regulares de uma semana, ou duas cópulas a três dias contínuos em um plantel comercial (Ferreira et al., 2012). Segundo Campos et al. (2012) a repetição de coletas, temperatura climática, idade, condições sanitárias e nutricionais afetam a produção de sêmen. A realização de exames andrológicos e análises espermáticas nos critérios de motilidade, vigor, concentração espermática e anormalidades patológicas devem ser levadas em consideração para a escolha de um reprodutor (Campos et al., 2012).

Considerações Finais - A manipulação de coelhas primíparas durante a fase gestacional, seja pela aplicação de estímulo aversivo (ES) ou positivo (ET), não alterou o comportamento sexual e na espermiogênese dos filhotes machos, se mantendo semelhantes ao grupo controle.

Referências bibliográficas

- [1] BOITI, C., CASTELLINI, C., THEAU-CLÉMENT, M., BESENFELDER, U., LIGUORI, L., RENIERI, T., PIZZI, F. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. **World Rabbits Science**, 2005.
- [2] CAMPOS, A.C.N; GUERREIRO, M.E.F; GADELHA, C.R.F; CATUNDA, A.G.V; ESTEVAM, F.N.L; MENESES, H.M. Principais características do sêmen de coelho da raça nova zelândia branco criados em clima tropical. **Ciência Animal**, 22(1): 284-295, 2012 – Edição Especial
- [3] COOK, C.J., MELLOR, D.J., HARRIS, P.J., INGRAM, J.R., MATTHEWS, L.R. Hands-on and hands-off measurement of stress. In: MOBERG, G.P., MENCH, J.A. (eds). **The biology of Animal Stress**, pp.123-146. CABI Publishing: Oxon / New York, UK/USA.
- [4] FARIAS, M.N.L. Reprodução e Meio Ambiente. Universidade Federal do Ceará - Departamento de Zootecnia - Criação de Não Ruminantes – Cunicultura. 2006.
- [5] FERREIRA, W. M. et al. **Manual prático de cunicultura**. Bambuí: Ed. do Autor, 2012.
- [6] HECKER, M.M. **Estimulação tátil em coelhos do grupo genético Botucatu e seus efeitos no desempenho, temperamento e reprodução**. 2013. Dissertação (Mestrado) – UNESP, campus Jaboticabal, 2013.
- [7] MONEY, J., EHRHARDT, A. A. Fetal hormones and the brain: effect on sexual dimorphism of behavior - a review. **Arch. Sex. Behav.**, v.1, p.241-263, 1971.
- [8] VERWER, C. M., VAN AMERONGEN, G., VAN DEN BOS, R., HENDRIKSEN, C. F. M. Handling effects on body weight and behaviour of group-housed male rabbits in a laboratory setting. **Appl. Ani. Behav. Sci.**, v.117, p.93-102, 2009.
- [9] WARD, I.L. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. **Science**, v.175, p.82-84, 1972.

Biometria testicular e epididimária dos queixadas (*Tayassu pecari*)

Renan Luiz Albuquerque Vieira¹

renan.albuquerque@hotmail.com

Celso Henrique Souza Costa Barros¹

celso_barrosmv@hotmail.com

Paola Pereira das Neves Snoeck¹

paolasnoeck@gmail.com

Maíra Guimarães Kersul¹

marykersul@hotmail.com

Marcus Antônio Rossi Feliciano¹

marcusfeliciano@yahoo.com.br

Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho¹

slnogue@uesc.br

Abstract: The objective of this study was to obtain data on the testicular and epididymal biometric measures from *Tayassu pecari*. About 16 adult males maintained in captivity were anaesthetized in order to collect biometric data from testis and epididymis more securely. The animals presented testicles located in a perineal position, inclined cranio-ventrally with oval shape, flattened laterally and with tenso-elastic consistency. There wasn't great variance in the means of testis length (5.8 ± 0.8 cm right / 6.3 ± 0.8 cm left), width (4.4 ± 0.9 cm right / 4.4 ± 0.8 cm left), height (4.5 ± 0.8 cm right / 4.6 ± 0.7 left) and total scrotal width (7.7 ± 1.3 cm). The same was observed for data from the tail of the epididymis (L= 1.9 ± 0.2 cm right / 2.0 ± 0.2 cm left; W= 2.0 ± 0.2 cm right / 2.0 ± 0.2 cm left; H = 2.0 ± 0.2 cm right / 2.0 ± 0.2 cm left). Thus, the characteristics of testicular biometry should be considered for the selection of individuals more likely to reproduce in captivity.

Keywords: testicular volume; sperm production; wild pig.

Palavras-chave: volume testicular; produção de espermatozoides; porco do mato.

Introdução - Queixada (*Tayassu pecari*) é um mamífero popularmente denominado como porco do mato ou pecari [1], que pode chegar a 1,10 m de comprimento e pesar até 54 kg em cativeiro [2]. Sua distribuição vai desde o sul do México até o nordeste da Argentina [3]. Esse animal atua na dispersão e predação de sementes e plântulas [4] e, por isso, é considerado como “engenheiro ambiental” [5]. A caça e destruição de seu hábitat, contudo, ameaçam a espécie que atualmente está classificada como vulnerável pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) [6]. Devido à importância do queixada para a manutenção dos ecossistemas [7], é preciso estabelecer práticas que reduzam seu declínio populacional. Em geral, a espécie se reproduz facilmente em cativeiro. Contudo, quando são mantidos em

¹ Universidade Estadual de Santa Cruz.

grupos pequenos com um ou dois machos e duas ou três fêmeas nem sempre se consegue a reprodução de queixadas cativos [1]. Lasley [8] sugeriu que a baixa fertilidade de machos pode ser responsável pelos baixos índices reprodutivos da espécie em cativeiro. Neste contexto, é preciso obter mais dados sobre a biologia reprodutiva da espécie, que permitam a seleção de indivíduos mais aptos a reproduzir em cativeiro, ou seja, animais com maior massa corporal, maior volume testicular, boa libido e melhor qualidade seminal, visando favorecer a conservação da espécie. Sabe-se que a capacidade reprodutiva dos machos está diretamente relacionada à competência dos testículos em produzir um grande número de espermatozoides viáveis, além de concentrações adequadas de hormônios sexuais para promover libido e o correto desenvolvimento dos órgãos reprodutivos [9]. Portanto, objetivou-se obter medidas biométricas e características morfológicas dos testículos e epidídimos de queixadas mantidos em cativeiro visando obter dados para seleção de indivíduos mais aptos à reprodução.

Material e Métodos – O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (Protocolo n. 031/16). Foram usados 16 queixadas machos adultos com idades entre dois e sete anos e peso médio de 36 kg, mantidos no criadouro científico de animais silvestres da UESC, Ilhéus, BA, Brasil (legalmente registrado pelo IBAMA, com número de processo 02006.000485/99-57). O período de estudo foi entre janeiro e junho de 2017. Depois da contenção física, os animais foram pesados e submetidos ao protocolo de sedação e anestesia, com associação de acepromazina e cetamina. Foi administrada a acepromazina na dose de 0,2 mg/kg por via intramuscular (IM) e cetamina na dose de 5 mg/kg por via IM, conforme descrito por Kahwage et al. [10] para caititus (*Pecari tajacu*), espécie filogeneticamente mais próxima dos queixadas. Os testículos foram levemente tracionados e posicionados paralelamente dentro do escroto. A forma dos testículos foi avaliada visualmente na inspeção e, por palpação foi avaliada a mobilidade e consistência dos testículos e epidídimos. Essa consistência foi avaliada seguindo uma escala de 1,0 a 5,0 [11]. Com o auxílio de um paquímetro foi realizada a biometria testicular, com a mensuração do comprimento de cada testículo (medida craniocaudal), largura (medida lateromedial), altura (medida dorsoventral) e a largura escrotal total (LET) (medida laterolateral de ambos os testículos), além do comprimento, largura e altura de cada epidídimo, levando em consideração as descrições mencionadas para avaliação do tamanho dos testículos. Para o cálculo do volume testicular utilizou-se a fórmula para testículos elipsoides $V = L \times H \times W \times 0,52$ (individual de cada testículo), em que L representa o comprimento testicular, H = altura testicular e W = largura testicular e depois foi determinado o volume total pela soma dos volumes parciais de cada testículo. Essa fórmula foi escolhida, tendo em vista que foi a mais adequada para estimar o verdadeiro volume testicular na espécie *Pecari tajacu* quando o paquímetro foi usado na mensuração [12]. Os dados foram apresentados de forma descritiva.

Resultados e Discussão – Os testículos dos queixadas apresentaram formato ovalado e alongado cranioventralmente, achatados laterolateralmente, localizados na região perineal, um pouco mais ventral quando comparados com a posição dos testículos do suíno [13]. As estruturas apresentaram mobilidade dentro do escroto e consistência tensoelástica, semelhante

ao descrito para caaititus (*Pecari tajacu*) [14]. A consistência tensoelástica dos testículos dos queixadas do presente estudo foi considerada de valor intermediário ($2,5 \pm 0,1$), descrita como ideal para machos em reprodução [15]. Os testículos dos queixadas apresentaram comprimento de $5,8 \pm 0,8$ cm e $6,3 \pm 0,8$ cm; largura de $4,4 \pm 0,9$ cm e $4,4 \pm 0,8$ cm; altura de $4,5 \pm 0,8$ cm e $4,6 \pm 0,7$ cm, respectivamente para o direito e esquerdo. A largura escrotal total foi de $7,7 \pm 1,3$ cm. A biometria testicular foi fácil de ser avaliada utilizando paquímetro com os animais anestesiados. As medidas biométricas encontradas foram relativamente maiores do que as descritas por Sonner et al. [13], porém, é importante salientar que esses autores fizeram a avaliação dos testículos depois do abate dos queixadas. Além disso, os animais adultos eram mais leves, com peso médio de 30,92 kg. O volume testicular direito foi de $62,6 \pm 23,8$ cm³ e o esquerdo foi de $70,3 \pm 24,5$ cm³, com volume testicular total de $132,9 \pm 46,4$ cm³. A fórmula de cálculo de volume testicular empregada foi descrita como a mais adequada na prática clínica para avaliar o verdadeiro volume testicular dos caaititus [12] e, por isso, foi utilizada para calcular o volume testicular dos queixadas. Os epidídimos direito e esquerdo apresentaram comprimento de $1,9 \pm 0,2$ cm e $2,0 \pm 0,2$ cm; largura de $2,0 \pm 0,2$ cm e $2,0 \pm 0,2$ cm; altura de $2,0 \pm 0,2$ cm e $2,0 \pm 0,2$ cm respectivamente e, consistência epididimária intermediária ($2,4 \pm 0,1$). É sabido que o comprimento epididimário nos pecaris pode variar de 0,8 a 2,0 cm. Nesse contexto, os queixadas do presente estudo apresentaram o comprimento dos epidídimos dentro do esperado para a espécie. É importante ressaltar que o estudo da morfofisiologia testicular e biometria corporal em animais selvagens permite o estabelecimento de padrões fisiológicos que são importantes para entender aspectos da biologia reprodutiva, que tornam possível desenvolver protocolos de reprodução assistida de espécies ameaçadas visando a sua conservação [16].

Considerações Finais – A avaliação dos parâmetros biométricos testiculares é uma ferramenta de grande importância na seleção de machos com aptidão reprodutiva e com boa capacidade de produzir e liberar espermatozoides.

Referências bibliográficas

- [1] Sowls LK. **Javelins and other peccaries**: their biology, management, and use. 2 ed. Texas, USA: Texas A&M University Press; 1997; 418.
- [2] Nogueira-Filho SLG, Lavorenti A. O manejo de caaititu (*Tayassu tajacu*) e do queixada (*Tayassu pecari*) em cativeiro. In: **Manejo e conservação da vida silvestre no Brasil**. (Ed. CV Pádua e RE Bodmer). Organizador associado Laury Cullen Jr. – Brasília: CNPq/Belém: Sociedade Civil de Mamirauá; 1997; 106–115.
- [3] Altrichter M, Taber A; Beck H, Reyna-Hurtado R, Lizarraga L, Keuroghlian A., Sanderson W. Range-wide declines for a key Neotropical ecosystem architect, the near-threatened white-lipped peccary (*Tayassu pecari*). **Oryx** 2012; 46: 87-98.
- [4] Painter RLE. **Gardeners of the forest**: plant–animal interactions in a neotropical forest ungulate community. 1998. Tese (Doutorado) - University of Liverpool, Liverpool; 1998.
- [5] Keuroghlian A, Eaton DP. Removal of palm fruits and ecosystem engineering in palm stands by white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and other frugivores in an isolated Atlantic Forest fragment. **Biodiversity and Conservation** 2009; 18: 1733–1750.

- [6] Keuroghlian A, Desbiez A, Reyna-Hurtado R, Altrichter M, Beck H, Taber A, Fragoso JMV. *Tayassu pecari*. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.1 ed: IUCN. 2013. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T41778A44051115.en>.
- [7] Desbiez ALJ, Keuroghlian A. Can bite force be used as a basis for niche separation between native peccaries and introduced feral pigs in the Brazilian Pantanal? **Mammalia** 2009; 73: 369-372.
- [8] Lasley JF. Breeding by genetics polled charolais. **Charolais Bull- o- Gran** 1978; 39-42.
- [9] Gier HT, Marions GB. Development off mammalian testis. In: Johnson AD, Gomes W R, Van Der Mark NL (Editors). **The Testis**. Londres: Academic Press; 1970; 2-45.
- [10] Kahwage PR, Garcia AR, Bartha MMP, Guimarães DAA, Luz-Ramos R, Dias HLT, Albuquerque NI, Ohashi OM. Desenvolvimento de protocolo de sedação e analgesia em caititus (*Tayassu tajacu*) para coleta de sêmen por eletroejaculação. In: Congresso Nacional de Medicina Veterinária, 35, 2008, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2008. CD-ROM.
- [11] Unanian MM, Feliciano Silva AED, McManus C, Cardoso EP. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia** 2000; 29: 136-144.
- [12] Peixoto GCV, Silva MA, Lima GL, Campos LB, Paiva ALC, Paula W, Ricarte ARF, Silva AR. Use of non-invasive methods for evaluating the testicular biometry in collared peccaries (*Peccari tajacu Linnaeus, 1758*). **Anatomia Histologia Embryologia** 2016; 45:60-66. doi: 10.1111/ahe.12171
- [13] Sonner JB, Miglino MA, Santos TC, Carvalhal R, Neto ACA, Moura CEB, Oliveira MF. Aspectos macroscópicos e morfométricos dos testículos em catetos e queixadas. **Biota Neotropica** 2004;4:1-12.
- [14] Kahwage PR, Garcia AR, Guimarães DAA, Ohashi OM, Luz-Ramos RS, Dias HLT, Albuquerque NI, Bartha MMP. Biometria testicular, eletroejaculação e características seminais de caititus *Tayassu tajacu* Linnaeus 1758 (*Mammalia, Artiodactyla, Tayassuidae*) mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. **Acta Amazonica** 2010; 40: 771-778.
- [15] Althouse GC. Applied andrology in swine. In: Chenoweth PJ, Lorton SP. **Animal Andrology: Theories and Applications**. 1st ed. CAB Internacional. Londres; 2014; 404- 417.
- [16] Caldeira BC, Paula TAR, Matta SLP, Balarini MK, Campos PKA. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). **Revista Ceres** 2010; 57: 569-575.

Agradecimentos: Capes.

Morfologia dos espermatozoides no trato reprodutivo de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814

Teresinha Inês Assumpção¹
teassumpcao@ufu.br

André Luiz Quagliatto Santos¹
Graciele Freitas Cardoso¹

Abstract: The objective of the study was to characterize the morphological aspects of the spermatozoa from gray brocket deers (*Mazama gouazoubira*) obtained from the testes, epididymis (different portions) and vas deferens by different techniques of cellular obtainment. The used samples came from three animals after dead. The vas deferens were washed with formaldehyde solution saline and so did the head and tail of the epididymis after they were sliced. Sperm morphology was evaluated using phase contrast microscopy. The percentage of sperm with abnormalities was quite high in testicle (46%), the head of the epididymis (38%), tail of the epididymis (41%) and vas deferens (37%). The prevailing pathologies types were proximal cytoplasmic droplets and bent or coiled tail. The used techniques were effective in obtaining sperm from *Mazama gouazoubira*, and the spermatozoa presented an elevated number of morphological changes showing poor semen quality.

Keywords: cervids, reproduction, spermatid maturation.

Palavras-chave: cervídeos, maturação espermática, reprodução.

Introdução - O veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) é o cervídeo mais comum do Brasil, mas está na lista vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (UICN) devido ao rápido declínio da população de animais, sendo que em algumas regiões já praticamente extinto [1]. A reprodução dos cervídeos, tanto em condições naturais como em cativeiro, tem recebido considerável atenção, particularmente devido a suas aplicações no manejo conservacionista. A recuperação de espermatozoides de animais mortos é uma técnica importante para a conservação das espécies, pois estes gametas são capazes de resistir a diferentes processos de criopreservação, além de ser uma boa fonte de material para estudos morfológicos [2]. A coleta de espermatozoides *post mortem* pode ser realizada por fluxo retrógrado do epidídimo [3] ou fatiamento do órgão [4].

Antes de se estabelecer técnicas de reprodução assistida é necessário conhecer as características das células espermáticas. Assim, o objetivo do estudo foi caracterizar os aspectos morfológicos dos espermatozoides de veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*), obtidos

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/ MG.

dos testículos, epidídimos (diferentes porções) e ductos deferentes por diferentes técnicas de obtenção celular.

Material e Métodos - Foram utilizados três veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*) adultos que vieram a óbito devido atropelamento na região de Uberlândia/MG, sendo as amostras obtidas até 5 horas após sua morte.

Os testículos dos animais foram retirados junto com os ductos deferentes, dissecados e separados em porções: testículos, cabeça/corpo e cauda do epidídimo e ducto deferente. Os testículos receberam um corte transversal no terço médio e foram lavados internamente com solução salina formalizada (SSF). Separadamente, a cabeça/corpo e cauda do epidídimo receberam diversos cortes, os quais foram pressionados e lavados também com SSF. Os ductos deferentes foram lavados com SSF, injetando a solução com uma seringa de 1 ml, diretamente no lúmen do ducto e recolhido na extremidade oposta (figura 1).

A morfologia espermática foi avaliada por microscopia de contraste de fase, com contagem de 200 células, e os resultados apresentados de forma descritiva, com cálculo da média dos três animais, baseada nas anormalidades espermáticas encontradas. A classificação das anormalidades dos espermatozoides foi segundo o descrito por Assumpção et al. [5]

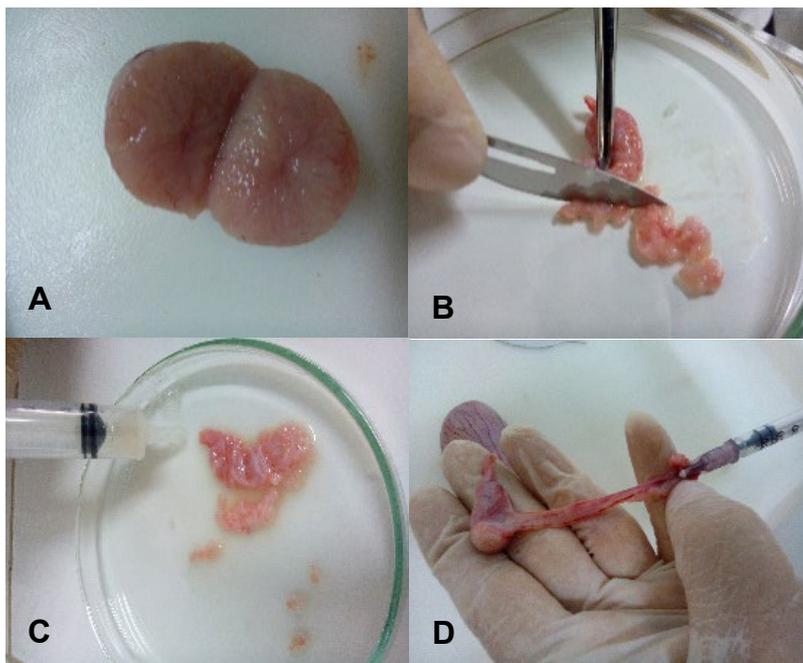


Figura 1. Coleta das células espermáticas de veados-catingueiros pelos métodos de corte do testículo (A), fatiamento de cabeça/corpo e cauda do epidídimo (B), lavagem do tecido epididimário (C) e lavagem do ducto deferente (D).

Resultados e Discussão - As técnicas utilizadas mostraram-se eficientes na recuperação das células espermáticas e resultaram em bom volume de material para análise morfológica. A concentração não foi avaliada, pois não seria representativa, já que as porções foram lavadas com volumes variáveis de SSF. Estudos tem confirmado a possibilidade de recuperação de células espermáticas de epidídimos com boa qualidade mesmo após decorrido várias horas da morte do animal [4, 2]. A técnica de fatiamento epididimário foi semelhante à realizada por Fernández-Santos et al. [4] em *Cervus elaphus hispanicus* que, como nesta pesquisa, também obtiveram elevada concentração de células espermáticas, assim como na técnica de lavagem de ducto deferente realizada por Assumpção et al. [6] em jacarés tinga (*Caiman crocodilus*).

Na tabela 1 podemos notar as médias de alterações morfológicas verificadas nas quatro porções do trato reprodutivo analisadas dos três animais.

Tabela 1. Alterações morfológicas dos espermatozoides de veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*) no interior do trato reprodutivo (porcentagem).

Tipo de anormalidade	Testículo	Cabeça/corpo epidídimo	Cauda epidídimo	Ducto deferente
Gota citoplasmática proximal	26	25	14	13
Gota citoplasmática distal	6	3	8	13
Cauda fort. dobrada ou enrolada	3	5	6	5
Cauda dobrada	3	1	3	3
Cauda enrolada	1	1	1	3
Cabeça isolada normal	4	2	5	3
Defeito de acrossoma	1	1	1	1
Delgado na base	0	1	1	1
Contorno anormal	1	1	2	1
Subdesenvolvido	1	1	0	0
Total	46	41	41	43

Como nesta pesquisa, Peroni et al. [7] encontraram em cervos de cativeiro 59,2% de espermatozoides anormais e Peroni [8] 49% em animais de vida livre, assim como Garde et al. [8] em *Cervus elaphus* (em torno de 50%). Houve uma predominância de gota citoplasmática nas porções epididimárias e baixa incidência de anormalidades da cabeça do espermatozóide. As alterações morfológicas de maior incidência foram gota citoplasmática proximal (GCP) e distal (GCD) e cauda fortemente dobrada ou enrolada. Não verificamos grande variação entre a quantidade e qualidade dos defeitos das células espermáticas no testículo, nas porções do epidídimo e ducto deferente, apenas alternância entre as quantidades das mesmas. Observou-se uma redução das gotas citoplasmáticas proximais de 26% no testículo para 13% no ducto deferente e aumento das gotas citoplasmáticas distais de 6% para 13%.

Esta elevada porcentagem de anormalidades observada no estudo (acima de 40%) em todas as porções, talvez seja devido ao fato dos animais estarem fora do período reprodutivo,

já que as coletas foram realizadas no outono, ou a pequena variabilidade genética que observamos nesta espécie o que leva a diminuição na qualidade do sêmen. Em animais silvestres com declínio populacional, há um aumento da endogamia com consequente perda da variabilidade genética e diminuição da capacidade reprodutiva, quadro que pode levar inclusive a inviabilidade das células espermáticas [9]. Mesmo não havendo valores de referência para a espécie, as taxas de anormalidades espermáticas que têm sido relatadas podem ser indícios de problemas de fertilidade comuns à populações reduzidas da espécie.

Conclusões - As técnicas de corte de testículos, fatiamento da cabeça/corpo e cauda do epidídimo e lavagem do ducto deferente mostraram-se eficientes na obtenção de amostras de sêmen para análise morfológica em veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*) onde os espermatozoides apresentaram uma taxa significativa de anormalidades morfológicas em todas as porções, mostrando uma pobre qualidade do sêmen.

Referências bibliográficas

- [1] Black, P.; Vogliotti, A. 2016. *Mazama gouazoubira*. In: IUCN 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: 02/04/2019.
- [2] Silva LDM, Mota-Filho A Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. Acta Veterinária Brasília 2012; 6:1-8.
- [3] Martínez-Pastor F, García-Macias V, Álvarez M, Chamorro C, Herraes P, Paz P, Anel, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. Theriogenology 2006; 65:471-485.
- [4] Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, Matias D, Domínguez-Rebolledo AE, Esteso MC, Montoro V, Garde JJ Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. Animal Reproduction Science 2009; 111:93-104.
- [5] Assumpção TI, Santos ALQ, Macedo GG, Peixoto LR, Zampini ACA Coleta e avaliação morfológica dos espermatozoides epididimários de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814. In: VIII ENANSE, 2014, Uberlândia/MG. LAPAS/FAMEV, 2014, 01:49-54. Disponível em: <http://www.pet.famev.ufu.br>. Acesso em: 02 de abril de 2019.
- [6] Assumpção TI, Santos ALQ, Canelo EA Semen collection techniques for spectacled caimans *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758). Herpetology Notes 2017; 10: 697-701.
- [7] Peroni EDFC, Zanetti ES, Rola LD, Cursino MS, Duarte JMB Morfologia espermática dos veados-cinza brasileiros (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*) mantidos em cativeiro: resultados preliminares. In: XV Congresso ABRAVES, Florianópolis, 2012. Anais..., 1:130-133.
- [8] Peroni EDFC Inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia em veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*) com sêmen congelado. 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- [9] Garde JJ, Ortiz N, Garcia AJ, Gallego L, Landete-Castillejos T, Lopez A. Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. Archives of Andrology 1998; 41:195-202.
- [10] Wildt DE, Schiewe MC, Schmidt PM, Goodrowe KL, Howard JG, Phillips LG, O'Brien SJ, Bush M. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife. Theriogenology 1986; 25:33-51.

Potencial de diferentes soluções hiposmótica para avaliar a integridade funcional dos espermatozoides do queixada (*Tayassu pecari*)

Celso Henrique Souza Costa Barros¹
William Morais Machado¹
Renan Luiz Albuquerque Vieira¹
Sérgio Luiz Gama Nogueira-Filho¹
Paola Pereira das Neves Snoeck¹
paolasnoeck@gmail.com

Abstract: White Lipped Peccary is a Neotropical mammal classified as vulnerable due to hunting and destruction of its habitat. Due to the difficulties in captive breeding, assisted reproduction techniques can be applied in species repopulation programs. The objective of this study was to identify the best hypotonic test protocol (HOST) to evaluate the functional integrity of spermatozoa. The semen of four males was collected with the aid of an electro-ejaculator. The semen was diluted in the following hypotonic solutions: distilled water (0 mOsmol / L), sucrose and fructose (50, 100, 150 mOsm / L). Two hundred spermatozoa were evaluated by sample and classified as reactive or not to HOST. All tested solutions were similar in identifying the percentage of reactive sperm ($P > 0.05$). Thus, distilled water can be used as HOST because it presents similar results and because it is a cheaper test.

Keywords: distilled water; plasma membrane; white lipped peccary

Palavras-chave: água destilada; membrana plasmática; queixada.

Introdução - Os aspectos da biologia e fisiologia reprodutiva do queixada (*Tayassu pecari*) são pouco descritos na literatura e existe grande preocupação sobre a conservação desta espécie, seriamente ameaçada de extinção [1]. É sabido que as características espermáticas normalmente avaliadas no exame andrológico: concentração, motilidade e morfologia são frequentemente insuficientes, por si só, para o diagnóstico de fertilidade/infertilidade do macho, a não ser que individualmente apresentem valores muito diferentes do esperado e descrito como dentro da normalidade para uma espécie [2]. Uma das características espermáticas que deve ser mantida para gerar bons resultados quando da utilização de técnicas de conservação de sêmen para reprodução assistida é a integridade da membrana plasmática [3]. Estudos vêm demonstrando que a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides avaliada pelo teste hiposmótico é uma importante ferramenta complementar para prever a capacidade de fertilização de uma amostra de sêmen [4]. Dessa forma,

¹ Universidade Estadual de Santa Cruz.

objetivou-se identificar o melhor protocolo de teste hiposmótico (HOST) para avaliar a integridade funcional dos espermatozoides de queixada.

Material e Métodos - Foram utilizados quatro queixadas machos, adultos, com peso médio de $37,8 \pm 4,8$ kg, do criadouro científico de animais silvestres da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brasil ($14^{\circ} 47' 47''$ S; $39^{\circ} 10' 20''$), legalmente registrado pelo IBA-MA, com número de processo 02006.000485/99-57. Os protocolos experimentais aplicados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UESC), Protocolo n. 031/16. Para a coleta de sêmen, os animais foram contidos com auxílio de puçá e submetidos ao protocolo anestésico, com associação de acepromazina e cetamina depois de jejum alimentar por 12 horas e hídrico por 6 horas. Foi administrada a acepromazina na dose de 0,2 mg/kg por via intramuscular (IM) e cetamina na dose de 5 mg/kg por via IM [5]. Depois de anestesiados, cinco minutos antes da coleta foi administrada 5 UI de ocitocina por via intravenosa (IV). Como método de coleta foi utilizado um eletroejaculador (modelo Eletrogen®), dotado de probe com dois eletrodos lineares conectados a uma fonte de 12 V [6]. Foi obtido um ejaculado por animal, totalizando quatro ejaculados para o estudo, os quais foram acondicionados em tubos plásticos previamente identificados. Transcorrida a coleta, as amostras foram colocadas em banho-maria à temperatura de 37°C. Para avaliação da morfologia espermática, uma amostra de sêmen fresco de todos os animais foi fixada em citrato de sódio formolizado a 4% antes do HOST e usadas para calcular o número real de células funcionalmente íntegras após o teste. As análises de alterações morfológicas dos espermatozoides foram realizadas em microscópio de contraste de fase (x1000), em preparação úmida entre lâmina e lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides e classificados de acordo com a região da alteração morfológica encontrada. Para estabelecer o melhor protocolo de HOST para o queixada, foram testadas as seguintes soluções e osmolaridades: água destilada (0 mOsmol/L), sacarose (50, 100, 150 mOsmol/L) e frutose (50, 100, 150 mOsmol/L). Em todos os grupos experimentais foram adicionados 10 μ L de sêmen em 90 μ L de solução hiposmótica, que foi incubada em banho seco a 37 °C por 40 minutos [7]. Após o período de incubação, a leitura do percentual de reativos ao HOST das amostras foi realizada em microscópio óptico comum (Microscópio Olympus® CX21) por três diferentes técnicos, na objetiva de imersão (x1000), em preparação úmida entre lâmina e lamínula, coradas com rosa bengala a 3%. Um total de 200 espermatozoides foram avaliados em pelo menos cinco campos e classificados em reativos ou não-reativos ao HOST, com base na presença ou ausência de caudas dobradas e/ou enroladas respectivamente [8]. Depois da leitura do percentual de reativos ao HOST foi aplicada a fórmula para cálculo do percentual de espermatozoides funcionalmente íntegros [Reativos ao HOST (%) = (% de alterações na região da cauda - defeitos de peça intermediária (PI), peça principal (PP) e peça terminal (PT) após o HOST) - (% de alterações na região da cauda – defeitos de PI, PP e PT antes do HOST)] descrita por Melo e Henry [9]. Para análise estatística foi usado o delineamento de blocos ao acaso, considerando cada indivíduo como um bloco. Foi aplicada ANOVA para comparar o percentual de espermatozoides funcionalmente íntegros entre as soluções testadas. Todos os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram testados e estavam adequados. Todas as análises foram feitas com o auxílio do R Core Team (2016).

Resultados e Discussão – Não foram observadas diferenças no percentual de espermatozoides reativos ao HOST entre as soluções hiposmóticas, com diferentes osmolaridades testadas, para avaliar a integridade funcional dos espermatozoides do queixada ($P>0,05$; Tabela 1). Sendo indicativo que os espermatozoides dessa espécie respondem a diferentes tipos de soluções hiposmóticas a base de açúcares ou uso de água destilada e também a diferentes osmolaridades. Os valores encontrados em nosso estudo de reativos ao HOST ficaram entre 24,2% e 38,40%, sendo superiores aos achados de outros trabalhos [10] que encontraram valores médios de 16,96% e similares aos achados Lechnick et al. [11] que relataram 34,68% de espermatozoides funcionalmente íntegros, ambos em pesquisas com suínos domésticos. No presente estudo, foi possível verificar que os espermatozoides de queixada apresentaram resposta ao HOST semelhante aos espermatozoides do cateto, até a osmolaridade testada que variou de 0 até 150 mOsmol/L. Percebe-se que os espermatozoides dos Tayassuidae (queixadas e catetos) podem ser submetidos a uma ampla faixa de osmolaridade quando comparados aos espermatozoides dos suínos domésticos, os quais respondem melhor quando incubados em soluções com osmolaridade de 100 mOsmol/L preparadas com frutose [12].

Tabela 1. Efeito da solução e da osmolaridade na integridade funcional dos espermatozoides de queixada avaliados pelo HOST.

HOST	Osmolaridade (mOsmol/L)	Funcionalmente íntegros ao HOST (%)	Intervalo de confiança de 95%
Água destilada	0	36,0	(25,93; 46,07)
	50	36,1	(26,06; 46,19)
Sacarose	100	24,2	(14,13; 34,27)
	150	28,6	(18,56; 38,69)
Frutose	50	35,0	(24,93; 45,07)
	100	30,0	(19,93; 40,07)
	150	38,4	(28,31; 48,44)

Considerações Finais - A avaliação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides de queixada pode ser realizada com teste hiposmótico utilizando soluções preparadas com sacarose ou frutose entre 50 e 150 mOsmol/L e a água destilada com 0 mOsmol/L. Os resultados obtidos no presente estudo, contudo, indicam a possibilidade do uso apenas de água destilada por apresentar resultados similares e ser um teste mais barato e não necessitar de avaliação da osmolaridade da solução.

Referências bibliográficas

- [1] Keuroghlian A, Desbiez A, Reyna-Hurtado R et al. Tayassu pecari. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013. www.iucnredlist.org. Acesso: 15 abril/2019.
- [2] Melo MIV, Henry M, Beker ARCL. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 2005; 57:757-763.

- [3] Perez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes A et al. A short hyposmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 2001; 56:387-398.
- [4] Padrik P, Hallap T, Kaart T et al. Relationships between the results of hypo-osmotic swelling tests, sperm motility, and fertility in Estonian Holstein dairy bulls. *Czech J. Anim. Sci* 2012; 57: 490–497.
- [5] Kahwage P, Garcia AR, Guimarães DAA et al. Biometria testicular, eletroejaculação e características seminais de caaititus, *Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758 (Mammalia, Artiodactyla, Tayassuidae) mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. *Acta Amaz* 2010; 40:771-778.
- [6] Castelo TS, Bezerra FSB, Lima GL et al. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Cryobiology* 2010; 61:275-279.
- [7] Santos EAA, Sousa PC, Peixoto GCX et al. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 2013; 65:1257- 1260.
- [8] Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M et al. Development of an assay to assess functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil* 1984; 70:219-228.
- [9] Melo MIV, Henry M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 1999; 51:273-276.
- [10] Samardzija M, Dobranic T, Kruslin S. et al. The use of the hypoosmotic swelling test and supravital staining in evaluation of sperm quality in boars. *Vet. Arh* 2008; 78: 279- 287.
- [11] Lechniak D, Kedzierski A, Stanislawski D. The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reprod. Dom. Anim* 2002; 37: 379-380.
- [12] Matson P, Kappelle W, Malecki I. The use of a hypo-osmotic swelling (HOS) test on sperm of the pig (*Sus scrofa domestica*), emu (*Dromaius novaehollandiae*), Asian elephant (*Elephas maximus*), hamadryas baboon (*Papio hamadryas hamadryas*), and central rock rat (*Zyzomys pedunculatus*). *Reprod. Biol* 2009; 9: 181-187.

Agradecimentos: CAPES, UESC.

Testículo ectópico em quati (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766): Relato de caso

Kárita da Mata Fuchs¹

karitafuchs@hotmail.com

Bruna Fabro dos Santos¹

Guilherme Rezende Ramos¹

Weslei Souza Chacon¹

Cezinande de Meira¹

Abstract: Cryptorchidism in domestic animals is relatively common, different from what occurs in wild animals. It is known that this is a hereditary alteration that may be linked to several factors. Thus, we reported the case of a unilateral cryptorchid attended by the Center for Medicine and Research in Wild Animals and Animal Reproduction and Obstetrics Sector, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Unesp / Botucatu. The animal was submitted to therapeutic orchiectomy as a treatment, which was the best option for the patient, even if braiding of a wild animal.

Keywords: coati; cryptorchid; orchiectomy.

Palavras-chave: Quati; criptorquida; orquiectomia.

Introdução – O quati é um procionídeo que tem ampla distribuição na América do Sul, principalmente entre Venezuela, Uruguai e Argentina. Em relação ao comportamento, estes animais tendem a ocupar áreas arborizadas, sendo 69,5% dos encontros realizadas sobre árvores [1]. São animais que vivem em famílias, 76,3% dos animais observados viviam em grupo de 5 a 10 animais e apenas 23,7% foram encontrados de forma solitária. Esses grupos são formados por fêmeas e machos jovens, sendo que machos adultos tendem a se isolar [2]. Os machos se aproximam dos grupos somente quando atingem maturidade sexual, por volta dos 3 anos, sendo expulsos após a cópula [1]. Fora isso, pouco se sabe sobre o hábito sexual do *Nasua nasua*.

O criptorquidismo é caracterizado pela ausência de um ou ambos testículos no escroto, devido à alguma interrupção na sua descida normal. Trata-se de uma alteração hereditária de diversas origens, como defeitos no gubernáculo, exposição à estrógeno na fase gestacional, dentre outros [3]. O testículo ectópico não é capaz de realizar a espermatogênese, sendo o animal criptorquida bilateral considerado infértil e o unilateral subfértil. Além disso, estes são susceptíveis ao desenvolvimento de neoplasias, chegando a apresentar risco 10 vezes maior que testículos em topografia normal [4].

Apesar de o criptorquidismo ser relativamente comum em animais domésticos, em ani-

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu.

mais selvagens é pouco relatado [4]. Desta forma, objetivou-se com este trabalho relatar o caso de um quati criptorquida unilateral.

Material e Métodos – Foi atendido pelo Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres juntamente com o Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp/Botucatu), um quati macho, 9,5kg, domiciliado e com alimentação não balanceada. O animal havia sido resgatado pelos tutores ainda pequeno com algumas lesões pelo corpo e relataram estar com o animal há cerca de dois anos. Sendo esta a idade estimada para o animal.

O paciente foi trazido para atendimento devido ao seu comportamento social alterado, os tutores queixaram-se da agressividade perante à outras pessoas que não eles. Durante a avaliação clínica, não foi observada qualquer alteração além da ausência de um dos testículos na bolsa escrotal. O testículo contralateral não foi identificado inicialmente à palpação, nem mesmo no subcutâneo da região inguinal. Foi então solicitado uma ultrassonografia da região abdominal e inguinal, a fim de se determinar a localização exata do testículo ectópico para posterior excisão.

Coletou-se amostra de sangue do animal para realização de hemograma, leucograma, perfil hepático e renal para exames pré-operatórios, sendo que apenas as enzimas hepáticas estavam discretamente alteradas.

Foi optado por realizar a ultrassonografia no mesmo dia da orquiectomia terapêutica, para a realização de apenas uma sedação e indução anestésica.

Para o exame, o animal foi sedado com cetamina 10 mg/kg (Catamin, Syntec®), metadona 0,4 mg/kg (Mytedon, Cristália®) e midazolam 0,3 mg/kg (Dormium, União Química®), todos aplicados via intra-muscular. O animal foi mantido em gaiola de contenção durante 15 minutos para que o efeito das medicações fosse atingido. Então, foi posicionado em decúbito dorsal e procedeu-se com o exame. O testículo que se encontrava na bolsa escrotal era o direito, este mediu 1,85 cm x 1,01 cm, tinha ecotextura homogênea e linha mediastinal visível. O testículo esquerdo foi localizado na região hipogástrica esquerda, caudal ao pênis, abaixo de uma grande camada de gordura, o que dificultava a palpação, medindo 1,32 cm x 0,56 cm, sua ecotextura era homogênea e também foi possível visualizar a linha mediastinal.

Após a devida localização do órgão, seguiu-se com indução anestésica, realizada com propofol 5 mg/kg, (Provine 1%, União Química®) e mantida com isoflurano (Isoforine, Cristália®). Foi necessária realização de analgesia com fentanil (Fentanest, Cristália®) no trans-operatório (5 mcg/kg) e analgesia intra-testicular com lidocaína 2% (Anestésico L, Pearson®), 1 mL em cada testículo.

Para retirada do testículo direito, realizou-se incisão pré-escrotal em pele, túnica vaginal e por último, túnica albugínea, permitindo a ideal visualização do testículo, plexo pampini-forme e ducto deferente, sendo estes últimos ligados com Nylon 0. A sutura de reaproximação de subcutâneo foi padrão Cushing com Nylon 0 e optou-se por não realizar sutura de pele. Para a excisão do testículo esquerdo, foi realizada incisão na região hipogástrica locali-

zada com o auxílio da ultrassonografia e divulsionamento do subcutâneo. O animal possuía uma grande camada de gordura, o que dificultou a visualização do órgão. Após encontrado, foi realizada dupla ligadura no cordão espermático e reaproximação de subcutâneo com sutura tipo Cushing e Nylon 0. Não houve qualquer tipo de intercorrência durante ou após o procedimento cirúrgico. O animal passou um dia na internação e foi liberado com prescrição de Tramadol (4 mg/kg) e Dipirona (25 mg/kg).

Resultados e Discussão – A presença de testículo ectópico está relacionada à ocorrência de diversas patologias, entre elas as neoplasias. Além disso, já foi relacionada com alteração de comportamento como irritabilidade e hipersexualidade [1,5]. É uma enfermidade frequentemente relatada em animais domésticos, como cães, mas não é muito reportada em animais silvestres [4]. Perante o exposto, a orquiectomia se mostrou a única opção de tratamento para o animal, já que este estava entrando na fase de maturidade sexual e vários problemas futuros poderiam ser evitados com a cirurgia. Vale ressaltar que a castração de animais selvagens não é permitida de forma eletiva.

Em 2016, foi relatado o primeiro caso de criptorquidismo em quati [1]. O animal vivia em cativeiro em um zoológico, tinha 10 anos no momento da cirurgia e o testículo encontrava-se na região inguinal no subcutâneo, assim como neste relato.

O testículo com localização normal deste estudo, tinha aferições menores que o descrito por [2], que avaliou a morfologia genital de 5 machos adultos. Provavelmente, devido ao fato de o animal do presente relato ter cerca de dois anos, sendo que a maturidade sexual esperada para a espécie é aos três anos de idade.

Conclusões – O presente relato traz um caso de criptorquidismo, uma patologia relevante, que geralmente evolui para neoplasia, porém pouco relatada em animais selvagens. Dessa forma, esta descrição contribui para a literatura pois descreve a orquiectomia como terapêutica de sucesso diante da alteração de comportamento do animal além de evitar complicações futuras como neoformações.

Referências bibliográficas

- [1] Lima DCV, Siqueira DB, Silva-Junior VA, Nery LTB, Rameh-de-Albuquerque LC, Melo CCS, Oliveira ECS. Ectopic testis in coati (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766). **Pesq. Vet. Bras.**, 2016, 36(10):999-1004. doi: 10.1590/S0100-736X2016001000013
- [2] Francioli ALR, Costa GM, Mançanares CAF, Martins DS, Ambrósio CE, Miglio MA, Carvalho AF. Morfologia dos órgãos masculinos de quati (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766). **Biotemas**, 2007, 20(1): 27-36. ISSN 0103-1643
- [3] Gunay Y, Bulut HE, Onarlioglu B, Basimoglu-Koca Y. **Okajimas Folia Anat.** Jpn, 1998. 75 (2-3): 61-70
- [4] Nascimento EF, Santos RL. **Patologias da reprodução dos animais domésticos**. Guanabara Koogan, 3ª edição, 2011.
- [5] Mattos MRF, Pereira BS, Domingues SFS, Costa MAL, Lima PRB. Criptorquidismo em um cão: relato de caso, 2000. **Ciência Animal** 10:61-70.