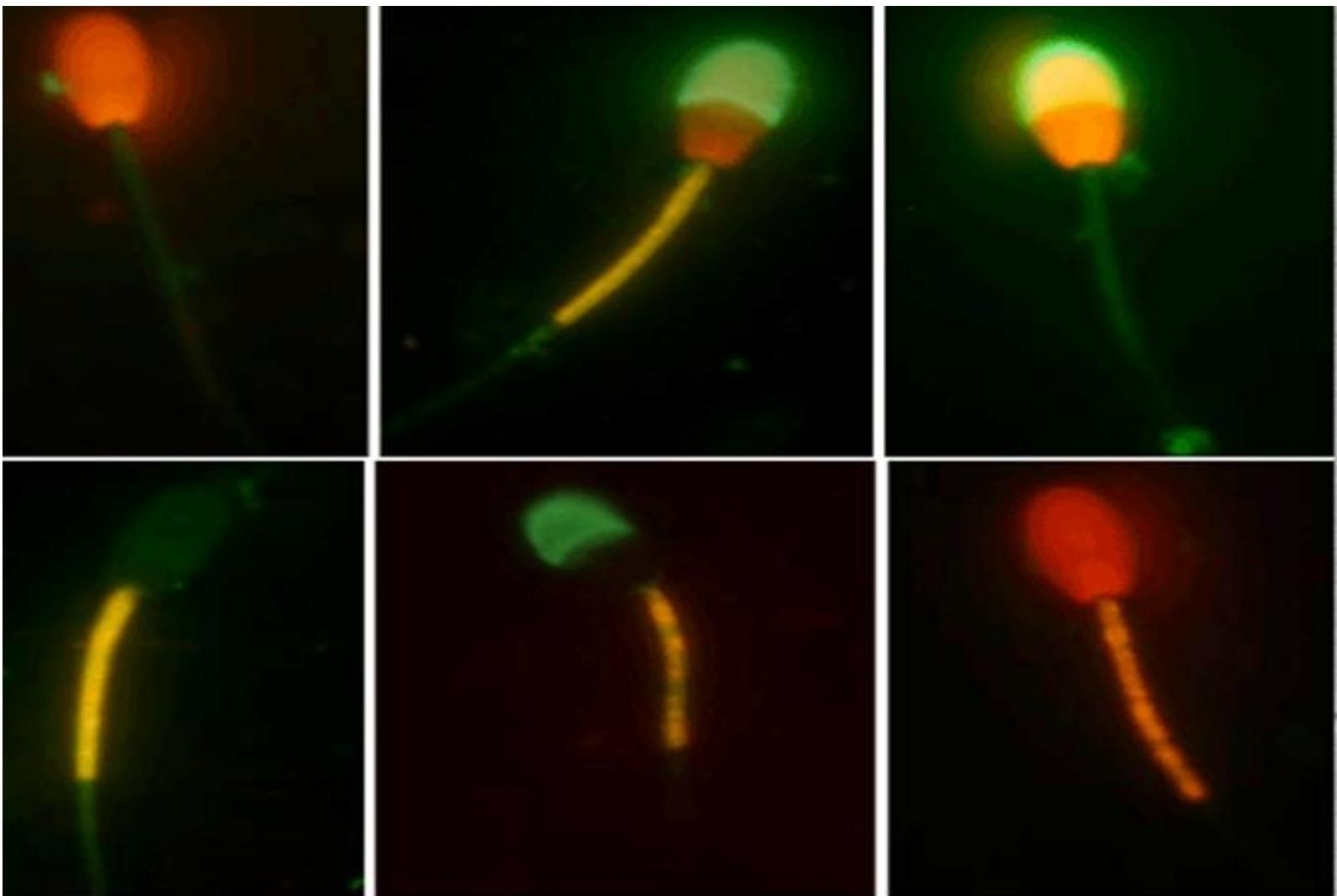


2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) ANAIS



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pantanal
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 146

2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) ANAIS

Juliana Corrêa Borges Silva
Luiz Alfredo Garcia Deragon
Marco Antônio Carstens Mendonça

Organizadores

Embrapa Pantanal
Corumbá, MS
2017

Exemplares dessa publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pantanal

Rua 21 de Setembro, 1880, CEP 79320-900, Corumbá, MS
Caixa Postal 109
Fone: (67) 3234-5800
Fax: (67) 3234-5815
Home page: www.embrapa.br/pantanal
Email: www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Unidade Responsável pelo conteúdo

Embrapa Pantanal

Comitê Local de Publicações da Embrapa Pantanal

Presidente: *Ana Maria Dantas de Maio*
Secretária: *Marilisi Jorge da Cunha*
Membros: *Ana Helena B. M. Fernandes*
Fernando Rodrigues Teixeira Dias
Juliana Corrêa Borges Silva
Márcia Furlan N. Tavares de Lima
Sandra Mara Araújo Crispim
Viviane de Oliveira Solano

Supervisora editorial: *Ana Maria Dantas de Maio*
Tratamento de ilustrações: *Marilisi Jorge da Cunha*
Editoração eletrônica: *Marilisi Jorge da Cunha*
Foto da capa: ABMVZ, v. 62, n.3, Belo Horizonte, June 2010.

1ª edição

Formato digital (2017)

Todos os direitos reservados.

**A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Pantanal**

Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) (2. : 2017 : Uberlândia, MG).

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).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: <www.embrapa.br/pantanal/publicacoes>

Título da página da Web (acesso em 26 de set. 2017)

1. Reprodução animal. 2. Andrologia animal. 3. Pesquisa. I. Silva, Juliana Borges da., org. II. Deragon, Luis Alfredo Garcia,
org. III. Mendonça, Marco Antônio Carstens, org. VI. Embrapa Pantanal. Série.

CDD 636.082 (21. ed.)

© Embrapa 2017

Organizadores

Juliana Corrêa Borges Silva

Médica-Veterinária, Doutora
Pesquisadora da Embrapa Pantanal
Corumbá, MS

Luiz Alfredo Garcia Deragon

Médico-Veterinário, Mestre
Alta Genetics do Brasil
Uberaba, MG

Marco Antônio Carstens Mendonça

Médico-Veterinário, Mestre
Reprotec Ltda.
Campo Grande, MS

Organizadores do evento

Rubens Paes de Arruda

Médico-Veterinário, Doutor
Professor da Universidade de São Paulo
Pirassununga, SP

Eliane Vianna da Costa e Silva

Médica-Veterinária, Doutora
Professora da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
Campo Grande, MS

Juliana Corrêa Borges Silva

Médica-Veterinária, Doutora
Pesquisadora da Embrapa Pantanal
Corumbá, MS

Marco Antônio Carstens Mendonça

Médico-Veterinário, Mestre
Reprotec Ltda.
Campo Grande, MS

Luiz Alfredo Garcia Deragon

Médico-Veterinário, Mestre
Alta Genetics do Brasil
Uberaba, MG

Teresinha Inês Assumpção

Médica-Veterinária, Doutora
Professora da Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia, MG

Athos de Assumpção Pastore

Médico-Veterinário, Doutor
Androvet Ltda.
Sertãozinho, SP

Alexandre Rossetto Garcia

Médico-Veterinário, Doutor
Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP

Gustavo Eduardo Freneau

Médico-Veterinário, Doutor
Professor da Universidade Federal de Goiás
Goiás, GO

Neimar Corrêa Severo

Médico-Veterinário, Especialista
Alta Genetics do Brasil
Uberaba, MG

Revisores

Eliane Vianna da Costa e Silva

Professora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Gustavo Eduardo Freneau

Professor da Universidade Federal de Goiás

Juliana Corrêa Borges Silva

Pesquisadora da Embrapa Pantanal

Luiz Alfredo Garcia Deragon

Médico-Veterinário, da Alta Genetics do Brasil

Marco Antônio Carstens Mendonça

Médico-Veterinário Reprotect Ltda.

Teresinha Inês de Assumpção

Professora da Universidade Federal de Uberlândia

Apresentação

A Embrapa, no exercício de suas funções, apoia a organização de eventos técnico-científicos, sendo assim, a Embrapa Pantanal, componente da diretoria científica, teve a iniciativa de compilar os resumos em uma única publicação, disponibilizando os temas abordados para um público maior.

O presente documento disponibiliza 8 palestras e os 40 resumos expandidos dos trabalhos apresentados na 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) durante o evento realizado nos dias 9 e 10 de junho de 2017, em Uberlândia, Minas Gerais.

A 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal contou com a participação de pesquisadores, professores e acadêmicos de diversas instituições de várias regiões do País, profissionais de centrais de processamento de sêmen e profissionais de campo, com o objetivo de contribuir com o avanço científico dessa importante área da produção animal.

Espera-se que esse evento, com abordagem participativa dos diferentes segmentos (pesquisa /universidade, centros de processamento de sêmen e profissionais de campo), possa contribuir para os avanços, tanto na área de andrologia, como efetivamente na reprodução e produção animal, não só para a região de atuação da Embrapa Pantanal, como para todo o país.

Jorge Antonio Ferreira de Lara
Chefe-Geral da Embrapa Pantanal

Sumário

Palestras apresentadas na 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)

Coleta de sêmen em animais selvagens – realidade e desafios13
Teresinha Inês Assumpção

Crêterios para exame andrológico em cões.....23
Fabiana Ferreira de Souza

Crêterios para exame andrológico em suínos25
Ana Luísa Neves Alvarenga Dias

Degeneração testicular: visão científica30
Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Maíra Bianchi Rodrigues Alves, Bruna Marcelle Martins de Oliveira, Leonardo Batissaco, Sâmara Cristine Costa Pinto, Vitor Hugo Guilger Gonzaga, Vinicius José Moreira Nogueira, Laura Nataly Garcia-Oliveros, Flávia dos Santos Almeida

Eletroejaculação e massagem dos genitais internos: impacto sobre o bem-estar animal.37
Neimar Correa Severo

Exame do potencial de fertilidade de touro: apto ou inapto à reprodução é suficiente?44
José Domingos Guimarães

Princípios da eletroejaculação..... 49
Gerson Duarte Metzker Filho

Variáveis metodológicas na avaliação do movimento espermático53
André Maciel Crespilho

Resumos apresentados na 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)

A eficácia dos testes *in vitro* de sêmen para prever o sucesso da prenhez após a inseminação artificial na cadela56
Marcelo Carvalho dos Santos, Amanda de Ascensão Rocha, Célia Raquel Quirino, Isabel Candia Nunes da Cunha

Análise computadorizada do sêmen de queixada (*Tayassu pecari*) com SCA®: dados preliminares60
Celso Henrique Souza Costa Barros, Renan Luiz Albuquerque Vieira, William Morais Machado, Thaise da Silva Oliveira Costa, Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho, Paola Pereira das Neves Snoeck

Análise do ejaculado de touros da raça Nelore (*Bos indicus*) de alta e baixa resistência espermática à criopreservação.....64
Mariana Furtado Zorzetto, Erika Aline Ribeiro Dias, Fabio Morato Monteiro, Camila de Paula Freitas Dell'Aqua, Claudia Cristina Paro de Paz, Edson Guimarães Lo Turco, Thaís Regiani Cataldi, Fabiana Ferreira de Souza, Frederico Ozanam Papa, Eunice Oba

Avaliação do hormônio Anti-Mülleriano à desmama e precocidade sexual de machos Nelore67
Alessandro Luiz Carlos Cesar da Costa Filho, Ellen Caroline Soligo, Alini Silva Peixoto, Fernanda Battistotti Barbosa, Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo, Tallita Silva de Assis, Vitor Miotto Oliveira, Maria Inês Lenz Souza, Eliane Vianna da Costa e Silva

Cacodilato como tampão na solução fixadora para análise ultraestrutural de espermatozoide de felinos71
José Luiz Blassioli Junior, Anne Kemmer Souza, Cristiane Sella Paranzini, Luiz Guilherme Corsi Trautwein, Maria Isabel Mello Martins

Características reprodutivas de machos jovens da raça Senepol	75
<i>Teresinha Inês Assumpção, Mateus Barra Bernardes, Gustavo Guerino Macedo</i>	
Características seminais de touros jovens da raça Nelore classificados para baixo e alto consumo alimentar residual	78
<i>Guilherme Fazan Rossi, Gisele Zoccal Mingoti, Erika Aline Ribeiro Dias, Natália Marins Bastos, Dayane Priscila Virsman, Naiara Nantes Rodrigues, Roberta Vantini, Joaquim Mansano Garcia, Flávia Fernanda Simili, Fabio Morato Monteiro</i>	
Caracterização da cinética espermática, antes e após Percoll®, no sêmen de touros de alto e baixo desempenho na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	82
<i>Luana de Cássia Bicudo, Adriano Felipe Perez Siqueira, Letícia Signori de Castro, Vivian da Silva Cardoso Pinto, Camilla Mota Mendes, Daniel de Souza Ramos Angrimani, Thais Rose dos Santos Hamilton, Tamie Guibu de Almeida, Marcílio Nichi, Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção</i>	
Categorização computadorizada da motilidade de espermatozoides criopreservados de touros compostos após desafio térmico <i>in vitro</i>.....	86
<i>Daniela Botta, Rubens Paes de Arruda, Carla Patrícia Teodoro de Carvalho, Narian Romanello, Messy Hannear de Andrade Pantoja, Andrea do Nascimento Barreto, Amanda Prudêncio Lemes, Alessandro Giro, Ana Beatriz Moura, Alexandre Rossetto Garcia</i>	
Centrifugação de sêmen em camada única de Percoll PLUS® antes do congelamento para seleção de espermatozoides bovinos	90
<i>Alicio Martins Júnior, Fernanda Nunes Marqui, Tatiana Issa Uherara Berton, Tairini Érica da Cruz, Diego Gouvêa de Souza</i>	
Coleta farmacológica de sêmen de onças-pardas (<i>Puma concolor</i>)	93
<i>Gediendson Ribeiro de Araujo, Tarcízio Antônio Rego de Paula, Thyara de Deco-Souza, Letícia Bergo Coelho Ferreira, Leanes Cruz da Silva, Pedro Nacib Jorge Neto</i>	
Comparação de perímetro escrotal, avaliação seminal e ecogenicidade testicular em touros Caracu e Nelore: dados preliminares	96
<i>Naiara Nantes Rodrigues, Guilherme Fazan Rossi, Dayane Priscila Virsman, Mariana Furtado Zorzetto, Anielly de Paula Freitas, Sergio Brasil Garcia Pimenta Neves Pereira Lima, Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, Fabio Morato Monteiro, Maria Emilia Franco Oliveira</i>	
Comparação dos efeitos da contaminação do ejaculado canino com urina e incubação sob 37°C e 5°C e posterior lavagem utilizando centrifugação e filtragem	100
<i>José Leonardo Gualberto Ramos, Gabriel José Silva Uzai, Eduardo Shimoda, Isabel Candia Nunes da Cunha</i>	
Comparação entre dois métodos de congelamento na qualidade seminal <i>in vitro</i>	104
<i>Fabio Morato Monteiro*, Guilherme Fazan Rossi, Érika Aline Dias Ribeiro, Suzane Peres Campanholi, Camila de Paula Freitas Dell'Aqua, José Antonio Dell'Aqua Junior, Frederico Ozanan Papa, Mariana Furtado Zorzetto, Letícia Zoccolaro Oliveira, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante</i>	
Comportamento copulatório de onça pintada (<i>Panthera onca</i>)	108
<i>Pedro Nacib Jorge Neto, Cristiane Schilbach Pizzutto, Gediendson Ribeiro de Araujo, Thyara de Deco-Souza</i>	
Correlação entre a viabilidade espermática <i>in vitro</i> e a fertilidade <i>in vivo</i> em ovinos submetidos à inseminação artificial com sêmen criopreservado.....	111
<i>Kárita da Mata Fuchs, Rodrigo Freitas Bittencourt, Carmo Emanuel Almeida Biscarde, Mariana Alves de Andrade Silva, Kauã Carvalho dos Santos Moura, Adrielle da Silva Lima</i>	
Criptorquidismo abdominal completo bilateral em equino: relato de caso	115
<i>Catharina de Albuquerque Vieira, Rodrigo Freitas Bittencourt, Marcus Vinícius Galvão Loiola, Larissa Rodrigues Santana, Morgana Duarte Felix, Alessandro Bittencourt Nascimento, Anderson Luiz de Araújo, Maristela de Cassia Seudo Lopes, Marcela Próspero Rodrigues Pinto</i>	

Descrição de coleta de sêmen em <i>Leopardus guttulus</i> pelo método de cateterismo uretral	119
<i>Regina Celia Rodrigues da Paz, Cristina Harumi Adania, Jéssica da Silva Paulino, Gabriella Accardi Iglesias, Lindsey Vansandt, Willian Frederick Swanson</i>	
Dietas ricas em grãos oleaginosos e qualidade seminal em bovinos confinados: dados parciais.....	122
<i>Eduardo Antonio de Almeida Rossignolo, Fernanda Battistotti Barbosa, Camile Sanches Silva, Heitor Valeriano, Bruno Milan, Raiza Rocha Pereira, Luiz Carlos Cesar da Costa Filho, Luis Carlos Vinhas Itavo, Breno Fernandes Barreto Sampaio, Eliane Vianna da Costa e Silva</i>	
Dimetilacetamida e trealose para criopreservação de sêmen de ovino	125
<i>Rodrigo Freitas Bittencourt, Carmo Emanuel Almeida Biscarde, Gabriel Felipe Oliveira de Menezes, Elisiane Sateles dos Santos, Mariana Alves de Andrade Silva, Luiz Di Paolo Maggitti Junior, Adrielle da Silva Lima, Marcus Vinicius Galvão Loiola, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho</i>	
Efeito da carnosina na criotolerância de espermatozoides de baixa congelabilidade provenientes de ganhões	129
<i>Giulia Kiyomi Vechiato Kawai, João Diego de Agostini Losano, Carolina Camargo Rocha, Andressa Dalmazzo, Bárbara do Carmo Simões da Silva, Keyvan Hunger Malek Zadeh, Maria Augusta Alonso, Camilla Motta Mendes, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, Marcilio Nichi</i>	
Efeito do ácido docosahexaenóico (DHA) e antioxidantes enzimáticos (SOD e GPx) na criopreservação dos espermatozoides epididimários de touros	133
<i>João Diego de Agostini Losano, Daniel de Souza Ramos Angrimani, Bruno Rogério Rui, Luana de Cássia Bicudo, Andressa Dalmazzo, Bárbara do Carmo Simões da Silva, Camilla Mota Mendes, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, Valquiria Hyppólito Barnabe, Marcilio Nichi</i>	
Efeitos da suplementação com fonte de ácidos graxos poliinsaturados na cinética espermática em sêmen fresco de machos da raça Nelore	137
<i>Natália Marins Bastos, Guilherme Fazan Rossi, Dayane Piscila Virsman, Naiara Nantes Rodrigues, Luana Lelis Souza, Anielly de Paula Freitas, Mariana Furtado Zorzetto, Fabio Morato Monteiro, Gisele Zoccal Mingoti, Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima</i>	
Embrões provenientes de touros de alta e baixa fertilidade <i>in vitro</i> não diferem na cinética do desenvolvimento das primeiras clivagens	140
<i>Tamie Guibu de Almeida, Letícia Signori de Castro, Adriano Felipe Perez Siqueira, Vivian S. C. Pinto, Thais R. S. Hamilton, Luana C. Bicudo, Camilla M. Mendes, Mayra Fernanda Alves, Andrea Cristina Basso, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção</i>	
Impacto da concentração de lipoproteínas de baixa densidade no meio diluidor sobre a cinética espermática do sêmen ovino	144
<i>Gabriel Felipe Oliveira de Menezes, Rodrigo Freitas Bittencourt, Paola Pereira Snoeck, Adrielle da Silva Lima, Edivânia Oliveira de Jesus, Jéssica de Jesus Pinheiro, Fernando de Lima Cardoso, Elisiane Sateles dos Santos, Mariana Alves de Andrade Silva, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho</i>	
Incidência de hipoplasia testicular em touros da raça Senepol: relato de caso	148
<i>Ana Cláudia Fagundes Faria, Ricarda Maria dos Santos, Teresinha Inês Assumpção</i>	
Incubação com solução de heparina e BSA não promove aumento do 8-OHdG no DNA de espermatozoides bovinos criopreservados	151
<i>Janaina Torres Carreira, Ana Carolina Pedrosa, Alexandre Champroux, Joël R. Drevet, Ayhan Kocer</i>	
Influência da insulação testicular em touros bubalinos (<i>Bubalus bubalis</i>) e mudanças no padrão da morfologia espermática	154
<i>Arnaldo Algaranhar Gonçalves, Thiago Velasco Guimarães Silva, Eduardo Baia de Souza, Dayana Neves De Melo, Sebastião Tavares Rolim Filho, Alexandre Rossetto Garcia, Otávio Mitio Ohashi</i>	

Influência do fotoperíodo no desempenho reprodutivo de ovinos da raça Santa Inês criados no Distrito Federal	158
<i>Áurea Maria Póvoa Duarte, Carolina Gonzales da Silva, Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva, Fernanda Beserra de Almeida, Bianca Damiani Marques Silva</i>	
Morfologia dos espermatozoides de tatu-canastra <i>Prionotus maximus</i> Kerr, 1972	162
<i>Teresinha Inês Assumpção, André Luiz Quagliatto Santos, Lilja Fromme, Graciele Freitas Cardoso</i>	
Perfil espermático de reprodutores da raça Bulldogue Francês	165
<i>Larissa Rodrigues Santana, Rodrigo Freitas Bittencourt, Morgana Duarte Felix, Catharina de Albuquerque Vieira, Alessandro Bitencourt Nascimento</i>	
Qual a melhor concentração de Trolox® associada ao ácido docosahexaenóico em diluidor BotuCrio® na congelação de sêmen de garanhões?	168
<i>Cristiane Silva Aguiar, Celso Henrique Souza Costa Barros, William Morais Machado, Antônio de Oliveira Leite Filho, Larissa Pires Barbosa, Ivan Bezerra Allaman, Paola Pereira das Neves Snoeck</i>	
Qualidade do sêmen criopreservado e fertilidade de fêmeas bovinas em programas de IATF: dados preliminares	171
<i>Camile Sanches Silva, Walvonvitis Baes Rodrigues, José Roberto Potiens, Juliana Corrêa Borges Silva, Eduardo Antonio de Almeida Rossignolo, Fernanda Battistotti Barbosa, Eliane Vianna da Costa e Silva, Eriklis Nogueira</i>	
Relação entre motilidade e potencial de membrana mitocondrial durante a maturação espermática em bovinos	175
<i>Bárbara do Carmo Simões da Silva, João Diego de Agostini Losano, Giulia Kiyomi Vechiato Kawai, Bruno Rogério Rui, Andressa Dalmazzo, Raquel Fernandes Redondo, Luana de Cássia Bicudo, Camilla Motta Mendes, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, Marcilio Nichi</i>	
Refrigeração do sêmen canino previamente contaminado por urina	179
<i>Israel Pereira dos Santos, Carolina Montes Silva, Fausto Paes de Carvalho, Isabel Candia Nunes da Cunha</i>	
Remoção do plasma seminal de ejaculados de touros antes da criopreservação: efeitos sobre a motilidade e cinética espermática	183
<i>Fernanda Nunes Marqui, Alicio Martins Júnior, Tatiana Issa Uherara Berton, Tairini Érica da Cruz, Diego Gouvêa de Souza, Eunice Oba</i>	
Temperaturas de superfície escrotal avaliadas por termografia de infravermelho e qualidade seminal de touros bubalinos em condições de clima tropical úmido	187
<i>Lílian Kátia Ximenes Silva, Daniel Vale Barros, José de Brito Lourenço Junior, Aluizio Otávio Almeida da Silva, José Silva de Sousa, Cristian Faturi, Messy Hannear de Andrade Pantoja, Daniela Botta, Alexandre Rossetto Garcia</i>	
Tempo máximo de conservação de espermatozoides bovinos do epidídimo mantidos à temperatura de 5°C	191
<i>Érika Talamonte Gonçalves Sousa, Matheus de Medeiros Rabelo, Carlos Frederico Martins, Carolina Gonzales da Silva</i>	
Utilização na IATF de sêmen congelado com incidência alta de patologias espermáticas com taxa satisfatória de concepção: relato de caso	195
<i>Juliana Corrêa Borges Silva, José Roberto Potiens, Márcio Ribeiro Silva, Eriklis Nogueira, Luiz Orcirio Fialho de Oliveira, Urbano Gomes Pinto de Abreu, Walvowitits Rodrigues, Deiler Sampaio Costa</i>	
Viabilidade do sêmen equino congelado com diferentes crioprotetores	198
<i>Teresinha Inês Assumpção, Lury Kao Moretti Itoyama, Paula Caroline Pereira</i>	

2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal - ABRAA

Introdução

Nos últimos anos, o desenvolvimento da Andrologia e o aumento do número de publicações na área foram acompanhados pelo crescente interesse de professores, pesquisadores, alunos de graduação e pós-graduação, bem como de médicos veterinários que trabalham em centros de processamento de sêmen ou no campo. Isso motivou um grupo de especialistas em Andrologia Veterinária, os quais, reunidos na cidade de São Paulo nos dias 8 e 9 de abril de 2016, fundaram a Associação Brasileira de Andrologia Animal – ABRAA, sendo os membros integrantes (Presidente - Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda – USP, Pirassununga, SP, Vice-Presidente – Profa. Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva – UFMS, Campo Grande, MS, Diretores Científicos: Dra. Juliana Corrêa Borges Silva – Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Dr. Marco Antônio Cartens Mendonça – Reprotect Ltda., Campo Grande, MS e Dr. Luiz Alfredo Garcia Deragon – Alta Genetics do Brasil, Uberaba, MG, Secretários: Dr. Alexandre Rossetto Garcia – Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlo, SP e Prof. Dr. Gustavo Eduardo Freneau – UFG, Goiás, GO, Tesoureiros: Dr. Athos de Assumpção Pastore – Androvet Ltda., Sertãozinho, SP e Profa. Dra. Theresinha Inês de Assumpção – UFU, Uberlândia, MG, Diretor Comercial: Dr. Neimar Correa Severo – Alta Genetics do Brasil, Uberaba, MG).

Neste sentido, a ABRAA surgiu como uma entidade voltada para o auxílio do desenvolvimento da Andrologia Animal. A ABRAA visa trabalhar em prol da Ciência e do Brasil e tem como uma de suas propostas contribuir na padronização e uniformização de técnicas laboratoriais utilizadas em Andrologia Animal. Além disso, prima por organizar eventos nos quais se discutam as reais necessidades da Andrologia Brasileira.

Este ano, em nossa segunda Reunião Anual, além de prepararmos um programa científico com assuntos técnicos altamente relevantes que visam à atualização profissional e, principalmente, a estimular debates técnicos e troca de experiências sobre os desafios diários encontrados pelos andrologistas, foram apresentados trabalhos científicos.

Participaram do evento, principalmente, pesquisadores, professores e acadêmicos de diversas instituições de várias regiões do País, profissionais de centrais de processamento de sêmen e profissionais de campo.

Nesta publicação estão sendo divulgadas 8 palestras e os 40 resumos expandidos apresentados durante a 2ª Reunião Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), realizada nos dias 9 e 10 de junho de 2017 em Uberlândia, Minas Gerais, no Cento de Convenções do Hotel San Diego.

Coleta de sêmen em animais selvagens– realidades e desafios

Teresinha Inês Assumpção¹

Introdução

O Brasil é extremamente rico em biodiversidade possuindo em torno de 11 mil espécies de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes, das quais 1.173 estão listadas como ameaçadas de extinção (ICMBIO, 2014). Nos últimos anos muitas espécies animais têm sido extintas ou estão em risco de extinção devido ao aquecimento global, destruição ou fragmentação de *habitats*, pressões antrópicas, entre outras.

Para a preservação de uma espécie é necessário à manutenção de populações com variabilidade genética sendo que a reprodução animal é essencial para sua sobrevivência. O uso de biotecnologias da reprodução ainda é um desafio, com limitados conhecimentos da fisiologia da reprodução, sazonalidade reprodutiva, técnicas de coleta de sêmen espécie-específica e características seminais dos animais. Nos animais selvagens, o sêmen pode ser obtido por dois métodos: 1) método ejaculatório - recolhimento pós-cópula do animal, vagina artificial, manipulação digital, eletroejaculação; 2) método não ejaculatório - coleta por sondagem uretral, massagem de órgãos internos via retal e coleta da cauda do epidídimo e ducto deferente após a morte ou castração do animal.

A geração de conhecimentos sobre técnicas reprodutivas para as diversas espécies de animais selvagens é primordial para os programas de conservação e recuperação das espécies selvagens.

O desafio da manutenção das espécies selvagens

O Brasil é o país da América do Sul com a maior diversidade de aves e também o que abriga o maior número de primatas, animais vertebrados e anfíbios da terra. Estima-se que sejam mais de 11 mil espécies de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes no país, das quais 1.173 estão listadas como ameaçadas de extinção (ICMBIO, 2014).

A biodiversidade vem sofrendo um grande impacto nos últimos anos devido a fatores como o aquecimento global, destruição ou fragmentação de *habitats* pelo avanço da ocupação do ambiente pelo homem (aumento populacional e a utilização dos recursos naturais), obstáculos à migração de espécies, alteração da sincronia entre as estações de reprodução e os eventos reprodutivos, a introdução de espécies exóticas nos ecossistemas, a caça ou outras pressões antrópicas que põe em risco ou têm levado a extinção de muitas espécies animais (BUENO, PEREIRA, 2008; WILDT et al., 2010; DOMINGUES et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Para a preservação de uma espécie é necessário à manutenção de populações mínimas viáveis em seus habitats naturais (*in situ*), garantindo assim a variabilidade genética, demográfica e ecológica. Outra forma é a utilização de métodos *ex situ*, mantendo os animais fora de seu ambiente (cativeiro) ou ainda a criação de bancos de germoplasma como estratégia complementar para recuperar e preservar o material genético de animais após sua morte (*ex situ, in vitro*) (WILDT et al., 2010; DOMINGUES et al., 2011; COMIZZOLI, 2015).

¹ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, MG.

O papel da reprodução na preservação das espécies selvagens

A utilização de biotécnicas da reprodução como inseminação artificial, transferência de embriões, fertilização in vitro e criopreservação de sêmen e de embriões são recursos válidos na luta contra a extinção de espécies silvestres (HOWARD, 1993), porém este conhecimento somente pode ser obtido de maneira consistente e confiável, mantendo-se exemplares de espécies selvagens em cativeiro (DURRANT, 1990).

A manutenção da diversidade genética é dependente da reprodução e essencial para sobrevivência de uma espécie, pois sua redução pode afetar a espermatogênese e ovulação, prenhes, desenvolvimento embrionário através de alterações epigenéticas do genoma, susceptibilidade a doenças, morbidade e mortalidade perinatal (MORATO et al., 1998; HOLT et al., 2014).

A aplicação de tecnologias reprodutivas às espécies selvagens ainda é muito limitada, isto devido principalmente à falta de conhecimento básico em biologia reprodutiva da maioria das espécies. As diferenças nas formas reprodutivas das espécies (anatomia / morfologia) e funções (mecanismos que regulam o sucesso reprodutivo) limitam a aplicabilidade prática para a produção de crias. Assim, o fator limitante é a falta de conhecimentos básicos sobre as várias espécies não estudadas, o que é a base fundamental para melhorar e controlar a reprodução das mesmas (PUKAZHENTHI; WILDT, 2004). De um total de 12.000 artigos publicados em 10 revistas de reprodução, apenas 6% foram dedicados a mamíferos (espécies não tradicionais), 3% para peixes e <1% para anfíbios, aves e répteis (SONGSASEN, 2015). Assim, o desafio é grande, pois segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza, 41% dos anfíbios, 26% dos mamíferos e 13% das aves estão ameaçados de extinção (UICN, 2015).

As classes de animais selvagens do Brasil

1. Peixes
2. Anfíbios
3. Répteis – serpentes, lagartos, tartarugas, jacarés
4. Aves
5. Mamíferos
 - a. Canídeos – lobo guará, cachorro do mato, raposinha do campo e cachorro do mato vinagre
 - b. Felídeos – onça pintada, suçuarana, jaguatirica, gato do mato pequeno, gato mourisco, gato palheiro e gato maracajá
 - c. Cervídeos – veado catingueiro, veado mateiro, veado campeiro, veado bororo e cervo do pantanal
 - d. Tapirídeos – anta
 - e. Xenartras – tatu canastra, tatu peba, tatu galinha, tatu do rabo mole, tatu bola, tamanduá bandeira, tamanduá mirim, tamanduá e bicho preguiça
 - f. Primatas – macacos, saguis e micos
 - g. Roedores – paca, cutia, capivara e ouriço cacheiro
 - h. Suídeos – cateto e queixada
 - i. Mustelídeos – lontra, ariranha, irara, furão e doninha amazônica
 - j. Procionídeos – quati e mão pelada (ICMBio, 2014)

A coleta de sêmen nas espécies selvagens

A coleta de sêmen em algumas espécies selvagens ainda é um desafio, devido ao pouco conhecimento existente sobre a anatomo-fisiologia reprodutiva, puberdade, maturidade sexual, sazonalidade reprodutiva e característica seminal dos animais (PUKAZHENTHI; WILDT, 2004; WILDT et al., 2010). A intratabilidade da maioria das espécies limita severamente os métodos a serem utilizados, necessitando, na maioria das vezes, de contenção química dos animais (DURRANT, 1990). Assim, é necessário o desenvolvimento de técnicas de coleta de sêmen espécie-específica, que garantam o bem-estar do animal e a tranquilidade da equipe que realiza o procedimento (MORATO et al, 1998).

A coleta de sêmen em animais selvagens pode ser realizada por dois métodos:

Método ejaculatório - recolhimento pós-cópula do animal, vagina artificial, manipulação digital, eletroejaculação;

Método não ejaculatório - coleta por sondagem uretral, massagem de órgãos internos via retal e coleta da cauda do epidídimo e ducto deferente após a morte ou castração do animal.

Métodos ejaculatórios

Coleta pós-cópula do animal

Método mais antigo de coleta de sêmen onde se recolhe o sêmen diretamente da vagina da fêmea pós-cobertura. A desvantagem da técnica é o pequeno volume recuperado e a contaminação do sêmen com secreções vaginais que afetam a viabilidade dos espermatozoides. Pode-se usar um revestimento interno da vagina, mas isto pode lesionar o pênis do animal. Em algumas espécies selvagens, utiliza-se fazer um esfregaço vaginal para verificar a presença de células espermáticas e confirmar a cópula (HOWARD, 1993).

Espécies que a técnica foi utilizada:

- Répteis - jabutis por Assumpção et al. (dados não publicados).
- Primatas não humanos por Kuederling et al. (1996)
- Mustelídeos - furão por Howard (1993)

Vagina artificial

É indicada quando se deseja ter ejaculado normal através de ejaculação fisiológica, sem o stress da contenção física ou química. Exige treinamento intensivo do animal, presença de um manequim ou fêmea em cio e é utilizada apenas para animais de boa tratabilidade. É uma técnica que produz sêmen de ótima qualidade, por simular uma cobertura normal.

Espécies que a técnica foi utilizada:

- Primatas – chimpanzés e gorilas por Durrant (1990) e Young et al. (1995)
- Carnívoros - raposas por Howard (1999). Em guepardo por Durrant (1990)
- Cervídeos por Giraldi e Duarte (2004); Rola et al. (2012)
- Roedores - pacas por Ferreira et al. (2004)
- Tapirídeos - anta por Durrant (1990)

Manipulação digital

Estimulação manual do pênis

Método alternativo utilizado em algumas espécies que não oferecem risco a equipe durante o processo de coleta e após treinamento do animal. Os ejaculados são de boa quantidade e qualidade e podem ser utilizados para criopreservação.

Espécies que a técnica foi utilizada:

- Primatas – chimpanzés e gorilas por Marson et al. (1988) e Durrant (1990)
- Carnívoros - lobo guará por Carneiro et al. (2011) e Teodoro et al. (2012).

Manipulação intracloacal

Técnica onde se utiliza a massagem digital ou aspiração direta do receptáculo espermático dentro da cloaca, provocando a liberação de ejaculados de bom volume e concentração.

Espécies que a técnica foi utilizada:

- Anfíbios por Calado (2009) e Silva et al. (2016)
- Répteis - serpentes por Mengden et al. (1980) e Zacariotti et al. (2007). Em crocodilos por Romero-Solórzano et al. (2010) e Johnston et al. (2014). Em jacarés por Assumpção et al. (2017, *in press*)
- Aves por Blanco et al. (2009) e Pereira e Blank (2017)

Massagem abdominal

Utilizada para coletas do sêmen em vertebrados aquáticos. Os animais são contidos, fazendo a secagem do corpo do animal e da papila genital, aplica-se então massagem na região ventral do animal sempre no sentido céfalo-caudal. Pode-se associar indução hormonal para espermiacção e sedar o animal a fim de reduzir o stress.

Espécie que a técnica foi utilizada:

- Peixes por Pereira et al. (2016) e Pinheiro et al. (2016).

Eletroejaculação

É o método mais utilizado nas espécies selvagens, associado à contenção química e, às vezes, física. É fundamental que haja um protocolo de contenção farmacológica para cada espécie, que alie praticidade, eficiência, segurança e baixo custo. O aparelho utilizado para gerar os estímulos é semelhante ao utilizado para animais domésticos, sendo que os eletrodos retais devem ser bipolares e com tiras longitudinais em cobre, sendo que o diâmetro do eletrodo vai variar de acordo com a espécie animal (HOWARD, 1993; PAZ, 2013).

A série de eletrochoques e sua intensidade variam com a espécie, sendo que o número de estimulações requeridas para ereção e ejaculação é afetado pelo plano anestésico que se encontra o animal (DURRANT, 1990). Antes do início da série de eletrochoques, o pênis do animal deve ser exposto, examinado e lavado com solução fisiológica e gaze. O material que entrará em contato com o sêmen deve estar aquecido a 37°C, temperatura esta que o sêmen deverá ser mantido durante as análises (PAZ, 2013), com exceção de animais ectodérmicos como os répteis que não há esta exigência.

Em algumas espécies, como canídeos e felinos, a coleta por esta técnica tem a desvantagem da contaminação do ejaculado com urina, quando a voltagem excede o mínimo necessário para ejaculação ou quando o eletrodo está posicionado muito cranialmente, sendo recomendada a drenagem da urina antes da coleta para minimizar o problema. O sucesso da coleta nos canídeos e felídeos selvagens está relacionado à família a qual a espécie pertence e a particularidades da própria espécie (MICHELETTI et al, 2011; PAZ, 2013).

Espécies em que a técnica foi utilizada:

- Répteis - lagartos por Molinia et al. (2010) e Mitchell et al. (2015). Em iguanas por (ZIMMERMAN et al., 2013). Em tartarugas por Kawasu et al. (2014) e Mitchell et al. (2015). Em jacarés por Santos et al. (2013). Em crocodilos por O'Malley (2005) e Johnston et al. (2014)

- Carnívoros - cachorro-do-mato por Souza et al. (2011) e Assumpção et al. (2017, *in press*). Em lobo guará por Silva et al. (2004). Em felinos de grande porte por Morato et al. (1998) e Ávila et al. (2012). Em felinos de pequeno porte por Moraes et al. (2002) e Erdmann (2005)

- Cervídeos por Abreu et al. (2009) e Favoretto et al. (2012)

- Roedores - pacas por Hoyos et al. (2001) e Stradiotti et al. (2015). Em Cutias por Mollineau et al. (2008) e Martinez et al. (2013). Em capivara por Rodriguez et al. (2012)

- Tapirídeos - anta por Pukazhenthil et al. (2013) e Fontana et al. (2017)

- Aves por Fisher et al. (2014) e Pereira e Blank (2017)

- Xenartras - tatu por Serafim et al. (2010) e Souza et al. (2014). Em tamanduás por Mendonça (2010); Tsuneda et al. (2015) e Hossotani e Luna (2016). Em bicho-preguiça por Peres (2005)

- Suídeos - cateto por Garcia et al. (2009) e Kahwage et al. (2010).

- Procionídeos – coatis por Barros et al. (2009) e Paz e Ávila (2015). Em guaxinim por Rocha et al. (2014)

- Mustelídeos – furão por Santymire et al. (2007) e Wolf et al. (2000)

Métodos não ejaculatórios

Sondagem uretral

Uma forma promissora na coleta de sêmen onde se utiliza a medetomidina (sedativo alfa-2 agonista), com sondagem uretral de 20 a 40 minutos após a aplicação do anestésico. Esta técnica fornece amostras concentradas de sêmen e sem perda da qualidade espermática, dispensando o eletroejaculador.

Espécies que a técnica foi utilizada:

- Felinos selvagens por Lueders et al. (2012) e Araújo (2016)

Massagem de órgãos internos via retal

É utilizada uma mão enluvada em espécies selvagens de grande porte e probe retal em pequenos animais, fazendo massagem ou pressão gentilmente nas paredes do reto repetidamente, sentido craniocaudal, sobre os órgãos acessórios internos.

Espécies que a técnica foi utilizada:

- Mamífero de grande porte – elefantes por Schmit & Hildebrandt (1998) e Arnold (2014)
- Mustelídeos – furão por Howard (1993)

Coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo e ducto deferente post-mortem do animal

A coleta por lavagem de ductos deferentes ou por fluxo retrógrado da cauda do epidídimo é realizada injetando solução salina diretamente dentro do ducto, sendo o líquido recolhido na extremidade oposta. Produz amostras com bom número de células, apresenta um menor nível de contaminação e são de melhor qualidade, porém possui a limitação devido ao tamanho do epidídimo. Já na coleta por fatiamento da cauda do epidídimo, realizam-se vários cortes da cauda do epidídimo verticalmente e transversalmente, com sequencial pressão para eliminar os espermatozoides e lavagem do material com solução salina.

Apesar de parecer uma técnica simples de ser realizada, nem sempre se obtém sucesso na recuperação de células espermáticas, devido ao pouco conhecimento sobre a fisiologia da reprodução das diversas espécies, seu período reprodutivo e as pequenas dimensões dos órgãos reprodutivos de alguns animais (observação pessoal).

Espécies que a técnica foi utilizada:

- Répteis - lagartos por Al-Haj et al. (1987) e Colli et al. (2007). Em serpentes por Tourmente et al. (2008). Em jacarés por Santos et al. (2013)
- Anfíbios por Trauth et al. (2015) e Sales et al. (2017)
- Cervídeos por Fernández-Santos et al. (2009) e Assumpção et al. (2016)
- Xenartras - tatu por Assumpção et al, 2017 (*in press*). Em bicho preguiça por Rossi et al. (2013)
- Suídeos - queixada por Costa et al. (2010)
- Roedores - paca por Stradiotti et al. (2015). Em capivara por Batalha e Oba (2006).

Considerações finais

A grande importância da biodiversidade brasileira e do patrimônio genético nacional, com o maior número de primatas, animais vertebrados e anfíbios da terra, sendo que todas elas têm um grande significado para o equilíbrio da natureza, da vida humana e do planeta.

O papel essencial dos diversos profissionais na manutenção da variabilidade genética das populações selvagens, seja em seus habitats naturais, em cativeiro/ criatórios controlados ou na formação dos bancos de germoplasma, para manutenção de material genético das espécies.

É fundamental o desenvolvimento de técnica de coleta de sêmen espécie-específica, que respeite seu bem-estar, que seja segura para o animal e o coletador e garanta uma ótima qualidade e quantidade de sêmen para ser utilizada na reprodução assistida. Ainda existem várias espécies sem qualquer estudo sobre metodologia de obtenção de sêmen.

A geração de conhecimentos e técnicas reprodutivas para as diversas espécies, como o congelamento de sêmen, a inseminação artificial e a produção de embriões, são tecnologias primordiais para programas de conservação e recuperação das espécies selvagens.

Referências

- ABREU, C. O, MARTINEZ, A. C, MORAES, W. M, JUVENAL, J. C, MOREIRA, N. Características reprodutivas de veado-bororó-do-sul ou veado-mão-curta (*Mazama nana*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 12, p. 993-998, 2009.
- AL-HAJ, H. A, JANAKAT, S., MAHMOUD, F. Electron microscopic study of sperm head differentiation in the lizard *Agama stellio*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 65, n.12, p. 2959-2968, 1987.
- ARAÚJO, G. R. **Coleta farmacológica e criopreservação de sêmen de grandes felinos, mantidos em cativeiro e capturados em vida livre com o uso de armadilhas de laço**: reprodução assistida em onças pintadas e onças pardas. 2016. 81f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- ARNOLD, D. **Successful Cryopreservation of Asian elephant (*Elephas maximus*) semen using simple techniques**. 2014. 129 f. Thesis (Doctor Science), University of Guelph, Ontário.
- ASSUMPCÃO, T. I, SANTOS, A. L. Q, MACEDO, G. G, PEIXOTO, L. R, ZAMPINI, A. C. A. Coleta e avaliação morfológica dos espermatozoides epididimários de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814. In: ENCONTRO SOBRE ANIMAIS SELVAGENS, 8; SIMPÓSIO SOBRE MEDICINA E CONSERVAÇÃO DA FAUNA DO CERRADO, 3., 2016, Uberlândia. **Anais...Uberlândia**: Universidade Federal de Uberlândia, 2016. p. 49-54. Disponível em: <publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/issue/download/153/8>. Acesso: 28 de maio de 2017.
- ÁVILA, E. C, PAULA, T. A.R, SOUZA, T. D, TRINDADE, T. F. S. L, MASCARENHAS, R. M, ARAÚJO, G.R, POLLI, G.O, CSERMAK JUNIOR A. C. Protocolos de coleta de sêmen por eletroejaculação em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*). **Revista Brasileira Reprodução**, v.36, n. 4, p. 260-263, out./dez. 2012.
- BARROS, F. F. P. C, QUEIROZ, J. P. A. F., FILHO A. C. M. , SANTOS, E. A. A., PAULA, V. V., FREITAS, C. I. A., SILVA AR. Use of two anesthetic combinations for semen collection by electroejaculation from captive coatis (*Nasua nasua*). **Theriogenology**, v. 71, p.1261–1266, 2009.
- BATALHA, L. M., OBA, E. Caracterização morfométrica e morfológica de célula espermática de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Archives of Veterinary Science**, v.11, n. 1, p. 66-72, 2006.
- BLANCO, J. M., WILDT, D. E, HÖFLE, U., VOELKER, W., DONOGHUE, A. M. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. **Theriogenology**, v. 71, n.1, p. 200-213, 2009.
- BUENO, A. P; PEREIRA, R. E. P. Biotecnologia aplicada aos animais silvestres e seus aspectos éticos e conservacionistas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, p.1-6, jul. 2008.
- CALADO, L. L. **Coleta e Criopreservação de sêmen de rã-touro (*Lithobates castebeianus*, Shaw, 1802)**. 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.
- CARNEIRO, F. T, SILVA, D. H. D. e, TRECE, A. S., CARRETA, M. J. R, OLIVEIRA, A. R, PAULA, T. A. R. Caracterização morfológica do sêmen de dois lobos-guarás da microrregião de Viçosa (*Chrysocion brachyurus*). In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 19, 2011, Belo Horizonte, MG. **Anais... Belo Horizonte**: CBRA, 2011. p.37.
- COLLI, G. R, TEIXEIRA, R. D, SCHELTINGA, D. M, MESQUITA, D. O, WIEDERHECKER, H. C, BÃO, S. N. Comparative study of sperm ultrastructure of five species of teiid lizards (*Teiidae*, *Squamata*), and *Cercosaura ocellata* (*Gymnophthalmidae*, *Squamata*). **Tissue and Cell**, v. 39, p. 59-78, 2007.
- COMIZZOLI P. Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, p. 640–645, 2015.
- COSTA, G. M. J, LEAL, M. C, SILVA, J. V, FERREIRA, A. C. S, GUIMARÃES, D. A, FRANÇA, L. F. Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (Collared Peccary, *Tayassu tajacu*). **Journal of Andrology**, v. 31, n. 2, p. 221-230, 2010.

DOMINGUES, S. F.S, LIMA, J. S, OLIVEIRA, K. G, SANTOS, R. R. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação *in situ* de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p.124-129, 2011.

DURRANT BS. Semen collection, evaluation, and cryopreservation in exotic animals species: maximizing reproductive potential. **Oxford Journals**, v. 32, n.1, p. 2-20,1990.

ERDMANN RH. **Exame reprodutivo, contenção farmacológica e criopreservação de sêmen em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775)**. 2005.70f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná.

FAVORETTO SM, ZANETTI ES, DUARTE JMB. Cryopreservation of red brocket deer semen (*Mazama americana*): comparison between three extenders. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 4, p. 820-827, 2012.

FERNÁNDEZ-SANTOS MR, MARTINEZ-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**, v. 111, p.93-104, 2009.

FERREIRA ACS, GUIMARÃES DA, LUZ-RAMOS RS, BASTOS LV, OHASHI OM Morphological and biometrics characteristics of semen of *Agouti paca* raised in captivity. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro, BA. **Abstracts...** Belo Horizonte: Colegio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p. 224.

FISCHER, D., NEUMANN, D., PURCHASE, C., BOUTS, T., TILLMANN, M. S., WEHREND, A., LIERZ, M. The Use of Semen Evaluation and Assisted Reproduction in Spix's Macaws in Terms of Species Conservation. **Zoo Biology**, v. 33, p. 234-244, 2014.

FONTANA, C., MOREIRA, N, CUBAS, Z. S, OLIVEIRA MJ, MORAIS W, MANGINI PR, SANTOS RC, BLANK MH, CABAÑAS MAA, CHAPARRO FJS, LOPEZ ETO, PUKAZHENTHI BS. Sperm motility of Brazilian-tapir (*Tapirus terrestris*) pre and post-thawing. **Animal Reproduction**, v.14, n.1, :364, 2017.

GARCIA, A. R., KAHWAGE, P. R, OHASHI, O. M. Aspectos reprodutivos de caititus (*Tayassu tajacu*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 2, p. 71-81, 2009.

GIRALDI, T., DUARTE, J. M. B. Implantação e avaliação de métodos não invasivos para colheita de sêmen de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). In: CONGRESSO, 8., ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 13., 2004, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2004. p.83.

HOLT, W. V.; BROWN, J.L.; COMIZZOLI, P. Reproductive science as an essential component of conservation biology. **Advanced Experimental Medical Biology**, v. 753, p. 3-14, 2014.

HOSSOTANI, C. M. S, LUNA, H. S. Aspectos reprodutivos do Tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n. 3, p.95-98, 2016;.

HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. E. (Ed.). **Zoo & Wild Animal Medicine Current Therapy**. 3.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. p. 390-399.

HOYOS, D., SMITH, A., CANO, A., LOPES J, RAMIREZ A, MOLINA S, VALENCIA F, SANCHEZ J, ANGEL MO. Sperm characterization in *Agouti paca* e *Agouti taczanowskii*. **International Journal of Andrology**, v. 1, n. 1, p. 37-41, 2001.

ICMBio. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2014. **Fauna Brasileira**. Disponível em: <www.icmbio.gov.br>. Acesso em: 25 maio 2017.

IUCN. International Union for Conservation of Nature. 2015. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 25 maio 2017.

JOHNSTON, S. D., LEVER, J., McLEOD, R., OISHI, M., QUALISCHEFSKI, E., OMANGA, C., LEITNER, M., PRICE, R., BARKER, L., KAMAU, K., GAUGHAN, J., D'OCCHIO, M. Semen collection and seminal characteristics of the Australian saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*). **Aquaculture**, v. 422/423, p. 25-35, feb. 2014.

KAHWAGE, P. R, GARCIA, A. R, GUIMARÃES, D. A. A., OHASHI, O. M, LUZ-RAMOS, R. S, DIAS, H. L. T., ALBUQUERQUE, N. I, BARTHA, M. M. P. Biometria testicular, eletroejaculação e características seminais de caititus, *Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758 (Mammalia, Artiodactyla, Tayassuidae) mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. **Acta Amazônica**, v.40, n. 4, 771-778, 2010.

KAWAZU, I., MAEDA, K., KOYAGO, M., NAKADA, K., SAWAMUKAI, Y. Semen Evaluation of Captive Hawksbill Turtles. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 13, n. 2, p. 271-278, 2014.

- KUEDERLING, I., MORREL, J. M., NAYUDU, P. L. Collection of semen from marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) for experimental use by vaginal washing. **Laboratory Animal**, v. 30, p. 260-266, 1996.
- 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**, v. 78, p. 696-701, 2012.
- MARTINEZ, A. C., OLIVEIRA, F. S., ABREU, C. O., MARTINS, L. L., PAULONI, A. P., MOREIRA, N. Colheita de sêmen por eletroejaculação em cutia-parda (*Dasyprocta azarae*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 86-88, 2013.
- MARSON, J., MEURIS, S., MOYSAN, F., GERVAIS, D., COOPER, R. W., JOUANNET, P. Cellular and biochemical characteristics of semen obtained from pubertal chimpanzees by masturbation. **Journal Reproduction Fertility**, v. 82, n.1, p.199-207, 1988.
- MENDONÇA MAC. **Análise descritiva do perfil espermático do Tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) de cativeiro**. 81f. 2010. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- MENGDEN, A. G., PLATZ, G. C, HUBBARD, R., QUINN, H. Semen collection, freezing and artificial insemination in snakes. In: MURPHY, J. B. **Reproductive biology and diseases of captive reptiles**. Lawrence, KS: The Society for the study of Amphibians and Reptiles, 1980. p. 71-78.
- MICHELETTI, T., CUBAS, Z. S., MORAES, W., OLIVEIRA, M. J., KOZICKI, L. E., WEISS, R. R., MOREIRA, N. Reprodução assistida em felídeos selvagens – uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 408-417, 2011.
- MITCHELL, M.; FUNCKE, S.; BUBLAT, A.; FISCHER, D.; LIERZ, M. Determining the value of electroejaculation as a method of semen collection in lizards and chelonians. INTERNATIONAL CONFERENCE ON AVIAN HERPETOLOGICAL AND EXOTIC MAMMAL MEDICINE, 2., Paris, 2015. **Proceedings...** [SI: sn], 2015, p. 426.
- MOLINIA, F. C, BELL, T., NORBURY, G., CREE, A., GLEESON, D. M. Assisted breeding of skinks or how to teach a lizard old tricks. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 5, n. 2, p. 311-319, 2010.
- MOLLINEAU, W. M., ADOGWA, A. O., GARCIA, G. W. A preliminary technique for electro-ejaculation of agouti (*Dasyprocta leporina*). **Animal Reproduction Science**, v.108, n. 1-2, p. 92-97, oct. 2008.
- MORAIS, R. N., MUCCIOLO, R. G., GOMES, M. L. F., LACERDA, O., MORAES, W., MOREIRA, N., GRAHAM, L. H., SWANSON, W. F., BROWN, J. L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2027-2041, may 2002.
- MORATO RG, GUIMARÃES MABV, NUNES ALV, CARCIOFI AC, FERREIRA F, BARNABE VH, BARNABE RC. Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 178-181, 1998.
- O'MALLEY B. **Clinical anatomy and physiology of exotic species**: structure and function of mammals, birds, reptiles and amphibians. Elsevier Saunders, 2005. 269 p.
- PAZ, R. C. R. **Reprodução de felinos domésticos e selvagens**. Edufimt, 2013. 125 p.
- PAZ, R. C. R., AVILA, H. B. S. Coatis (*Nasua nasua*) semen cryopreservation. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 52, n. 2, p.151-157, 2015.
- PEREIRA, R. J. G., BLANK, M. H. Desafios e atualidades no emprego de técnicas de reprodução assistida em aves selvagens. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 237-242, 2017.
- PEREIRA, P. N. B., SILVA, A. C. D. S., TEIXEIRA, E. G., FARIAS, W. R. L. Efeito do anestésico eugenol na qualidade espermática do sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 3, p. 415-435, 2016.
- PERES, M. A. **Colheita e avaliação do sêmen do bicho-preguiça (*Bradypus sp.*)**. 74f. 2005. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo, São Paulo.
- PINHEIRO, J. P. S., CASTRO, L. V. L., OLIVEIRA, F. D. C. E., LINHARES, F. R. A., LOPES, J. T., VANDERLEY, C. S. B. S. Qualidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma acropomum*) criopreservado em diferentes concentrações de gema de ovo. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 267-273, 2016.
- PUKAZHENTHI, B. S.; QUSE, V.; HOYER, M.; GASTELAARS, H. V. E.; SANJUR, O.; BROWN, J. L. A review of the reproductive biology and breeding management of tapirs. **Integrative Zoology**, v. 8, n.1, p. 18-34, 2013.

- PUKAZHENTHI, B. S; WILDT, D. E. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n.1-2, p. 33-46, 2004.
- ROCHA, L. A. M. R.; SILVA, H. V. R; MOTA FILHO, A. C; AQUINO-CORTEZ, A.; PINTO, J. N; SILVA, L. D. M. Avaliação da qualidade seminal em guaxinim (*Procyon cancrivorus*) – relato de caso. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 31-32, 2014.
- RODRÍGUEZ, J.; PEÑA, M.; GÓNGORA, A.; MURILLO, R. Obtención y evaluación del semen de capibara *Hydrochoerus hydrochaeris*. **Revista MVZ Córdoba**, v.17, n. 2, p. 2991-2997, 2012.
- ROLA, L. D; ZANETTI, E. S; DUARTE, J. M. P. Avaliação de dois métodos para condicionamento e coleta de sêmen em quatro espécies do gênero *Mazama*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 658-662, 2012.
- ROMERO-SOLÓRZANO, L.; ARDILA-ROBAYO, M.; MORENO-TORRES, C.; JIMÉNEZ-ESCOBAR, C. Extracción y análisis de las características macroscópicas y microscópicas del semen de cocodrilo del orinoco (*Crocodylus intermedius*). **Revista Memórias de la Conferencia Interna em Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional**, v. 6, n. 2, p. 48-58, 2010.
- ROSSI, L. F; LUACES, J. P; MARCOS, H. J. A; CETICA, P. D; JIMENO, G. P; MERANI, M. S. Anatomy and histology of the male reproductive tract and spermatogenesis fine structure in the lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*, *Myrmecophagidae*, *Xenarthra*): morphological evidences of reproductive functions. **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 42, n. 4, p. 247-56, aug. 2013.
- SALLES, N. M. E.; ZARA, F. J.; PRADO, C. P. A. Differences in sperm morphology in foam-nesting leptodactylid frogs (*Anura*, *Leptodactylidae*). **Acta Zoologica (Stockholm)**, v. 98, n.1, p. 1-12, 2017.
- SANTOS, A. L. Q.; ASSUMPÇÃO, T. I; PIMENTA, C. C; KAMINISHI, A. P. S. Coleta de sêmen em Jacaré Tinga (*Caiman crocodilus*, Linnaeus, 1758). CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 20., 2013, Uberlândia. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2013. p. 213.
- SANTYMIRE, R. M.; MARINARI, P. E; KREEGER, J. S; WILDT, D. E., HOWARD, J. G. Slow cooling prevents cold-induced damage to sperm motility and acrosomal integrity in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*). **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, n. 5, p. 652-663, 2007.
- SCHMITT, D. L., HILDEBRANDT, T. B. Manual collection and characterization of semen from Asian elephants (*Elephas maximus*). **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1-4, p. 309-314, oct. 1998.
- SERAFIM MKB, LIRA RA, COSTA, L. L. M.; GADELHA, I. C. N.; FREITAS, C. I. A; SILVA, A. R. Description of semen characteristics from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) collected by electroejaculation. **Animal Reproduction Science**, v.118, n. 2-4, p. 362-365, apr. 2010.
- SILVA, G. M. F., BASSO, A. D. V., SONALIO, K., SILVA, T. A.; M. JÚNIOR, J., PEREIRA, E. C. M.; COSTA, F. A. A., ASSUMPÇÃO, T. I. Análise seminal de reprodutores de rã-touro (*Lithobates castebeianus*, Shaw, 1802). In: ENCONTRO SOBRE AS PROFISSÕES DE MÉDICO VETERINÁRIO E ZOOTECNISTA, 2. Universidade Federal de Uberlândia, 2016, p. 76.
- SILVA A. R.; MORATO R. G.; SILVA, L. D. M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 1-2, p.159-175, mar. 2004.
- SILVA, A. R.; SOUZA, A. L. P.; SANTOS, E. A. A.; LIMA, G. L; PEIXOTO, G. C. X.; CASTELO, TS. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, v. 22, n.1, p. 219-234, 2012.
- SONGSASEN, N. Desafios na conservação de vida selvagem: perspectivas presentes e futuras. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 39, n.1, p. 83-84, 2015.
- SOUZA, N. P.; GUIMARÃES, L. D. A.; PAZ, R. C. R. Dosagem hormonal e avaliação testicular em cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) utilizando-se diferentes protocolos anestésicos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, 63, n.5, p.1224-1228, 2011
- SOUZA, P. C.; SANTOS, E. A. A.; SILVA, A. M.; CASTELO, T. S.; PEIXOTO, G. C. X.; FREITAS, C. I. A; SILVA, A. R. Viabilidade do sêmen de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*) centrifugado e diluído em Tris ou água de coco em pó. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p.1645-1650, 2014.
- STRADIOTTI, C. G. P.; SILVA, J. F. S.; CUNHA, I. C. N.; STRADIOTTI JUNIOR, D.; CÓSER, A. C.; RANGEL, C. C.; RODRIGUES, T. F.; ALMEIDA, F. M. Desenvolvimento de metodologia para coleta de sêmen de pacas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.37, n.3, p. 222-226, 2015.

TEODORO, L. O.; MELO JUNIOR, A. A.; SPERCOSKI, K. M.; MORAIS, R. N.; SOUZA, F. F. Seasonal aspects of reproductive physiology in captive male maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815). **Reproduction Domestic Animals**, v.47, Suppl. 6, p. 250-255, 2012.

TOURMENTE, M.; GIOJALAS, L.; CHIARAVIGLIO, M. Sperm ultrastructure of *Bothrops alternatus* and *Bothrops diporus* (*Viperidae*, *Serpentes*), and its possible relation to the reproductive features of the species. **Zoomorphology**, v. 127, n.4, p. 241-248, 2008.

TRAUTH, S. E.; CONNIOR, M. B. Testicular Histology and Sperm Morphometrics of the Bird-voiced Treefrog, *Hyla avivoca* (Anura: Hylidae), from Arkansas. **Journal of the Arkansas Academy of Science**, v. 69, p.101-105, 2015.

TSUNEDA, P. P.; DUARTE JUNIOR, M. F.; SENRA E SILVA, L. E.; JORGE, A. A.; HATAMOTO-ZERVOUDAKIS, L. K.; PAZ, R. C. R. da. Análise seminal e padronização da coloração eosina-nigrosina em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). **Revista Brasileira Ciências Veterinárias**, v. 22, n. 3-4, p. 198-201, jul./dez. 2015.

WILDT, D. E; COMIZZOLI, P.; PUKAZHENTHI, B. S.; SONGSASEN, N. Lessons from biodiversity-the value of nontraditional species to advance reproductive sciences, conservation, and human health. **Molecular Reproduction Development**, v. 77, n. 5, p. 397-409, 2010

WOLF, K. N.; WILDT, D. E; VARGAS, A.; MARINARI, P. E.; KREEGER, J. S.; OTTINGER, M. A.; HOWARD, J. G. Age-Dependent Changes in Sperm Production, Semen Quality, and Testicular Volume in the Black-Footed Ferret (*Mustela nigripes*). **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 1, p.179-187, 2000.

YOUNG, L. G.; SMITHWICK, E. B.; GOULD, K. G. Characteristics of Chipanzee (*Pan troglodytes*) ejaculates collected by rectal probe electrostimulation and by artificial vagina. **American Journal Primatology**, v. 35, n. 4, p. 293-304, 1995.

ZACARIOTTI, R. L.; GREGO, K. F.; FERNANDES, W.; SANT'ANNA, S. S.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). **Zoo Biology**, v. 26, n. 2, p.155-160, 2007.

ZIMMERMAN, D. M; MITCHELL, M. A.; PERRY, B. H. Collection and characterization of semen from green iguanas (*Iguana iguana*). **American Journal Veterinary Research**, v. 74, n.12, p.1536-1541, 2013.

Critérios para exame andrológico em cães

Fabiana Ferreira de Souza¹

Introdução

O exame andrológico, em todas as espécies, é essencial para adquirir informações mínimas e caracterizar o potencial reprodutivo de um macho. Por muitos anos, o ensino da avaliação andrológica no cão foi minimizado em muitas Instituições de Ensino Superior. Porém, atualmente torna-se essencial o treinamento do técnico veterinário para esta prática, já que o mercado Pet brasileiro é o terceiro do mundo. No cão, o principal objetivo desta avaliação é investigar a produção espermática, frente a qualquer alteração do trato reprodutivo ou para aplicação em alguma biotecnologia da reprodução (inseminação artificial, refrigeração ou congelamento do sêmen). Apesar disso, o exame andrológico deveria ter como outros objetivos a avaliação do potencial reprodutivo para compra ou venda de reprodutores, e comprovações de paternidade em exposições caninas. Estes últimos não são obrigatórios e, portanto, não são efetuados. Neste sentido, o criador, que objetiva o comércio, pode ter prejuízos, já que muitos machos são adquiridos na fase adulta, como reprodutores sem avaliação prévia do potencial reprodutivo. Apesar do valor de mercado destes animais não ser muito elevado (entre \$1.500,00 a \$10.000,00), quando comparado aos animais de produção, a venda da progênie também não possui valor final alto.

Exame andrológico

Para a aplicação em biotecnologias da reprodução o exame do sêmen é essencial, a fim de investigar o potencial reprodutivo do ejaculado. Esta avaliação, de certa maneira, valida as técnicas aplicadas à reprodução canina, já que quando se usa sêmen de alta qualidade, espera-se que o sucesso da técnica seja mais elevado. Contudo, se não se conhece a qualidade espermática, os resultados da aplicação da biotécnica são inesperados e, se negativos, não há como garantir se foram relacionados à qualidade espermática, a fertilidade da fêmea, ao manejo reprodutivo empregado ou a manipulação incorreta do sêmen. Estes fatores acabam permitindo o descredito das técnicas de reprodução assistida.

No cão, o exame andrológico deve incluir desde a anamnese, história e avaliação clínica e reprodutiva completa. Também é importante esclarecer ao proprietário pontos críticos da criação de cães, como a contribuição genotípica de determinadas características comportamentais, físicas ou reprodutivas. Características comportamentais, que são transmitidas à progênie, incluem, entre muitas, a agressividade, que embora não tenha influência racial, pode ter uma herdabilidade (h^2) em torno de 0,20 a 0,81 (PÉREZ-GUISADO et al., 2006; LIINAMO et al., 2007). Machos com alterações físicas hereditárias, como displasia coxofemoral, displasia do cotovelo, luxação de patela e outras não podem ser considerados reprodutores aptos. Animais com alterações reprodutivas como criptorquidismo também devem ser excluídos. Algumas endocrinopatias, como hipotireoidismo e hiperadrenocorticismos são consideradas doenças familiares que podem alterar a reprodução e, machos acometidos não devem acasalados.

Durante o exame andrológico o proprietário deve ainda ser orientado a respeito dos acasalamentos, a fim de evitar a consanguinidade, já que a reprodução pode ser comprometida em animais com parentescos muito próximos. Ademais, a coeficiente máximo de consanguinidade aceito pela maioria das associações de criadores para registro de ninhadas é de 12,5%. O exame clínico deve considerar a inspeção da pele, já que algumas alterações reprodutivas incluem manifestações dermatológicas. Deve-se avaliar minuciosamente as porções que compõem o trato reprodutivo, incluindo pênis, prepúcio, testículos, epidídimos, bolsa testicular, cordão espermático e próstata. Tais órgãos podem ser avaliados pela inspeção, palpação, ultrassonografia, radiografia, citologia aspirativa e biopsias, entre outros.

Exames sanitários incluem a pesquisa de determinados agentes infecciosos, especialmente *Brucella canis*, Herpesvírus e *Leptospira* sp, e, em algumas situações são necessários também exames hematológicos e bioquímicos séricos. A cariotipagem e genotipagem podem ser necessárias em algumas situações.

A análise do sêmen é parte essencial do exame andrológico, a qual fornece informações sobre a qualidade espermática, e inclui a motilidade, vigor, concentração, morfologia espermática, integridade de membrana plasmática e do acrossomo, e a determinação da concentração de fosfatase alcalina no plasma seminal, entre outras análises

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Botucatu, SP

mais complexas. Diferente de outras espécies, o cão possui ejaculado dividido em 3 frações, sendo a 1ª fração de origem prostática (volume entre 0,5 a 5,0 mL); a 2ª de origem testicular (volume entre 1,0 a 4,0 mL) e a 3ª prostática (volume entre 1,0 a 80,0 mL) (JOHNSTON et al., 2001). Em vista da grande variação do volume das frações nas diferentes raças e da ausência de necessidade de colheita do ejaculado total para a avaliação das características seminais, o volume não é um parâmetro de qualidade a ser considerado. O total de espermatozoides no ejaculado também varia de acordo com a raça e gira em torno de 300 a 2.000 x 10⁶ espermatozoides (JOHNSTON et al., 2001). A motilidade espermática considerada adequada para o ejaculado canino é acima de 70% e o vigor acima de 3, embora a fertilidade possa ser normal em machos com características inferiores. Alguns estudos apontam que há uma alta herdabilidade para motilidade ($h^2 = 0,57$) e produção total de espermatozoides em cães ($h^2 = 0,57$) para estas características (ENGLAND et al., 2010), indicando que se o canil pretende produzir reprodutores, deveria considerar os parâmetros seminais do macho a ser utilizado. Os defeitos espermáticos, normalmente são classificados em maiores (negativamente associados com a fertilidade) e menores (não associados com a fertilidade). A morfologia espermática pode ser avaliada pelo método de câmara úmida ou em esfregaços corados por diferentes corantes, exceto o panótico rápido, o qual é utilizado para colorações de esfregaços vaginais, mas não permite uma avaliação consistente das alterações espermáticas no cão. A integridade da membrana plasmática e do acrossomo podem ser avaliadas em esfregaços corados com corantes específicos, como a eosina-nigrosina e rosa-bengala, respectivamente.

Considerações finais

As biotecnologias da reprodução animal, que incluem a colheita do sêmen, devem sempre conter a avaliação espermática completa, a fim de promover a aplicação das técnicas de forma adequada e com resultados confiáveis. Ensinar adequadamente o exame andrológico do macho canino é parte do estudo da reprodução e deve ser incrementado nas Instituições de Ensino Superior.

Referências

- ENGLAND, G. C.; PHILLIPS, L.; FREEMAN, S. L. Heritability of semen characteristics in dogs. **Theriogenology**, v. 74, p. 1136-1140, 2010.
- JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Semen collection, evaluation, and preservation. In: _____. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia, PA. Saunders Company, 2001. p. 287-306.
- LIINAMO, A.; VAN DEN BERG, L.; LEEGWATER, P. A. J.; SCHILDER, M. B. H.; VAN ARENDONK, J. A. M.; VAN OOST, B. A. Genetic variation in aggression-related traits in golden retriever dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 104, n.1-2, p. 95-106, 2007.
- PÉREZ-GUISADO, J.; LOPEZ-RODRÍGUEZ, R.; MUÑOZ-SERRANO, A. Heritability of dominant-aggressive behaviour in English Cocker Spaniels. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 100, n. 3-4, p. 219-227, 2006.

Critérios para exame andrológico em suínos

Ana Luísa Neves Alvarenga Dias¹

Introdução

No programa de inseminação artificial (IA) em suínos, se considerarmos uma relação de macho: fêmea de 1:250, em um programa de IA tradicional, os reprodutores suínos, comparativamente, representam um maior impacto na produção de leitões, em relação à matriz, já que um reprodutor pode produzir aproximadamente 7.000 leitões desmamados ao ano (MELLAGI et al., 2017).

De forma geral, o sucesso da IA em suínos foi acompanhado pela redução do número de espermatozoides na dose inseminante, sendo possível alcançar excelentes índices reprodutivos. Algumas estratégias têm sido utilizadas a campo, tais como a deposição intrauterina do sêmen (IA pós-cervical), uma única inseminação com controle do estro e ovulação (IA tempo fixo) e a melhor utilização de machos reprodutores de alto mérito genético (BORTOLOZZO et al., 2015).

Frente a tantos desafios que estão sendo implantados no dia-a-dia das granjas de suínos, a qualidade das doses seminais e seu uso comercial tem aumentado ao longo dos anos. Além disso, a utilização do chamado “pool” de sêmen e também do número relativamente alto de espermatozoides por estro (1,5 a 4,0 bilhões de espermatozoides) tendem a mascarar e compensar a fertilidade subótima dos reprodutores suínos (DYCK et al., 2011).

Alguns reprodutores têm baixo desempenho reprodutivo (tamanho de leitegada) se o número de células espermáticas utilizado é baixo, devido à baixa qualidade de suas características seminais (FLOWERS, 2013). Por outro lado, outros reprodutores apresentam alta performance (taxa de parto e tamanho de leitegada excelentes) até mesmo quando se utiliza uma baixa concentração espermática (1,5 bilhões de espermatozoides) (KUMMER et al., 2013). O conhecimento destas informações é o que torna possível a redução do número de espermatozoides na dose inseminante (BROEKHUIJSE et al., 2015).

O desenvolvimento e o aprimoramento de técnicas que avaliam características seminais que são efetivamente preditoras da fertilidade relativa dos machos permitiria que os reprodutores menos férteis fossem identificados e removidos das centrais de inseminação, otimizando o uso de machos com fertilidade comprovada e de alto mérito genético (BORTOLOZZO et al., 2015).

A problemática é que a análise dessas características é focada no sêmen e pouca atenção é dada ao reprodutor propriamente dito. De fato, poucas horas da jornada de trabalho são dedicadas à saúde do reprodutor (KNOX et al., 2008).

Diante do exposto, esta revisão tem como objetivo descrever os critérios a serem utilizados no exame andrológico em suínos, tais como sua aplicabilidade e suas limitações.

Exame andrológico

Este exame tem como objetivo avaliar o potencial reprodutivo de animais jovens e aptidão reprodutiva dos animais adultos. Quando realizado de forma minuciosa, este exame auxilia na otimização do uso de reprodutores e descarte dos animais de baixa qualidade (MELLAGI et al., 2017).

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) possui o Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, que traz informações sobre várias espécies, inclusive a espécie suína (CBRA, 2013). Nas espécies bovina e equina, o exame andrológico é realizado com bastante frequência, o que não ocorre para a espécie suína.

A recomendação para a realização do exame andrológico em suínos é na entrada do reprodutor na central, aproximadamente de 5 a 8 meses de idade.

Dentre as avaliações que compõem o exame andrológico dos suínos, podemos citar: exame clínico geral, exame do sistema genital, comportamento sexual, avaliação do ejaculado e diagnóstico final.

¹ Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Uberlândia, MG

Exame clínico geral

O exame clínico é baseado no histórico do animal (identificação do reprodutor, linhagem genética e idade), devendo ser observadas as enfermidades e tratamentos anteriores, a frequência de coleta, o tipo de alojamento e as condições ambientais nas quais o animal de encontra. Além da avaliação dos sistemas nervoso, respiratório, circulatório, digestivo, deve-se avaliar a condição corporal dos mesmos, com ênfase para os membros locomotores.

Recomenda-se que os reprodutores sejam vacinados para as enfermidades reprodutivas, *Mycoplasma*, PCV2 e demais enfermidades de destaque (MELLAGI et al., 2017).

Lembrando ainda que, de acordo com a IN 19 (15/02/2002), os reprodutores da Central de Processamento de Sêmen (CPS) devem ser livres de Brucelose, Doença de Aujeszky, Tuberculose, Sarna e Peste Suína Clássica. Para a Leptospirose, a CPS deve ser livre ou controlada. Além disso, a CPS deve ser registrada como GRSC (Granja de Reprodutores Suínos Certificada) pelo MAPA (IN 19, 15/02/02).

Exame dos órgãos reprodutivos

Este exame inclui a avaliação visual e palpação do escroto, testículos, epidídimos, prepúcio e pênis. Seguem informações detalhadas de cada componente do aparelho reprodutivo a ser avaliado.

a) Escroto: deve ser avaliado quanto à existência de aderências, abscessos, ferimentos;

b) Testículos: localização (região perineal, não pendentes, situados paralelamente); tamanho (varia de 4,8 a 8 cm de largura e 8,2 e 12 cm de comprimento; forma (oval, alongada), consistência (fibroelástica), deslocamento (móveis dentro do escroto), temperatura, sensibilidade à dor;

A avaliação da consistência testicular pode ser feita via palpação, a partir da qual será atribuído um escore segundo a maciez dos testículos (CBRA, 2013) ou pode ser feita por tonometria (aparelho que gera um valor em mm, conforme resistência testicular).

A biometria testicular fornece dados importantes sobre a produção espermática, podendo ser feita através do paquímetro (mede comprimento e largura e calcula-se o volume) ou ultrassonografia (fornece diâmetro e largura, estimando o volume testicular). O exame ultrassonográfico é pouco invasivo, porém exige experiência para a interpretação das imagens e contenção mínima para a segurança do operador e do animal.

c) Epidídimo: localização (cabeça do epidídimo é acoplada ao polo ventral da gônada e sua cauda, no polo dorsal da gônada), tamanho, forma, consistência (elástica), sensibilidade à dor;

d) Prepúcio: avaliação do divertículo prepucial e orifício, verificando sinais de obstrução e inflamação;

e) Pênis: é do tipo fibro-elástico, apresentando “S” peniano e sua porção final tem formato de saca-rolhas; devem ser avaliados a exteriorização completa, frênulo persistente, lesões ou qualquer anormalidade que incapacite o animal de ejacular (MELLAGI et al., 2017).

Comportamento sexual

Esta avaliação leva em consideração o tempo entre o primeiro contato visual com o manequim até a primeira tentativa de salto. De acordo com Weitze (2010), este tempo deve ser inferior a 15 minutos. De acordo com Mellagi et al. (2017), problemas físicos e de saúde, uso excessivo, subnutrição, obesidade e problemas psíquicos podem estar associados à baixa libido dos reprodutores.

Avaliação do ejaculado

Analisando dados de 2006 até 2009 (45.532 ejaculados), Broekhuijse et al. (2012) observaram que os parâmetros relacionados aos machos – e ao sêmen – explicaram 5,3% da variação da taxa de parto e 5,9% da variação do número de leitões nascidos. Esta variação pode ser atribuída, dentre outros fatores, à linhagem genética do reprodutor, às características individuais do reprodutor, às características do sêmen, tais como as células morfológicamente anormais, motilidade espermática e número de espermatozoides na dose inseminante.

Para as centrais de IA, a implementação de uma política de controle para o processamento e produção das doses inseminantes deve basear-se na análise de dados que represente a relação entre a qualidade do sêmen e a fertilidade a campo.

O ejaculado suíno deve ser avaliado macroscópica e microscopicamente. A avaliação macroscópica do ejaculado baseia-se na avaliação dos seguintes parâmetros:

- a) volume: através da pesagem ou aferição em copo coletor milimetrado;
- b) aspecto: varia de soroso a leitoso;
- c) cor: varia entre branco e branco-acinzentado, podendo apresentar-se amarelado, avermelhado, quando na presença de urina ou sangue, respectivamente;
- d) odor: deve ser *sui generis*.

Dentre as avaliações microscópicas, podemos citar:

a) motilidade: baseada no número total de células móveis, sendo aceitável valor mínimo de 70%; pode ser feita subjetivamente, utilizando sêmen *in natura* com uso de lâmina e lamínula e observação em microscópio óptico em objetiva com aumentos de 10 a 40 vezes. Já a avaliação computadorizada (CASA – Computer-Assisted Sperm Analysis) é capaz de avaliar a vitalidade da célula, assim como o tipo de movimento dos espermatozoides. O sistema CASA está presente nas maiores CPS do Brasil.

b) concentração: determina número de espermatozoides por mililitro de sêmen e pode ser feita via câmara hemocitométrica, espermiométrico, fotolorimetria ou sistema CASA. Este valor, quando multiplicado pelo volume do ejaculado, gera o número total de espermatozoides do ejaculado.

d) morfologia: determina o percentual de alterações morfológicas dos espermatozoides; é considerada como o melhor indicador do potencial de fertilidade, o parâmetro mais estável e o preditivo do sucesso de fertilização (GAGO et al., 1998), sendo que aqueles machos que apresentam um alto percentual de defeitos morfológicos de seus espermatozoides podem apresentar baixa capacidade fecundante (JUNG et al., 2015). Adicionalmente, Knox (2016) mostrou que mesmo os reprodutores saudáveis apresentam espermatozoides defeituosos em baixas proporções.

Ombelet et al. (1997) mostraram que a avaliação morfológica é a que mais se diversifica dentre todos os parâmetros determinados durante o processo de avaliação do sêmen.

Esta avaliação pode ser realizada em microscopia óptica, com aumento de 1000 vezes, com ou sem contraste de fase, com ou sem o uso de corantes, em amostras fixadas em formalina (BORTOLOZZO et al., 2008). Este exame ainda pode ser feito via sistema CASA.

A ausência de uma técnica específica recomendada, especialmente em centrais de inseminação, disponibilidade de vários corantes diferentes, e a influência do corante sobre a morfologia do espermatozoide gera uma dificuldade na comparação e interpretação dos resultados obtidos nos diversos trabalhos científicos (ANTONCZYK et al., 2012).

De acordo com Brito et al. (2011), infelizmente, a avaliação da morfologia espermática é feita sem o uso de corantes e a fixação também não é perfeita. Estes autores mostraram também que em preparações úmidas fixadas em solução de formol salina tamponada há um maior número de artefatos (peça intermediária dobrada / enrolada).

Estudos tem sugerido que a avaliação espermática através de métodos simples e baratos pode fornecer prognósticos sobre a fertilidade do reprodutor de forma similar àqueles obtidos por métodos mais elaborados (BUENDIA et al., 2002).

De acordo com o CBRA (2013), recomenda-se a contagem de 200 células espermáticas, posteriormente convertidas em percentuais de anormalidades, sendo que a soma de defeitos em um ejaculado não ultrapasse 20%, com limites de 5% de alterações de cabeça, acrossoma, colo e peça intermediária, e 10% para gota citoplasmática proximal e defeitos de cauda dobrada ou enrolada.

A literatura científica tradicional nos traz que a gota citoplasmática distal não tem significado patológico (BONET et al., 2013; CBRA, 2013), porém, trabalhos recentes têm demonstrado que este defeito tem trazido consequências negativas para o espermatozoide, tais como flexão de cauda (FENTIC et al., 2006; COOPER, 2011), podendo alterar o movimento da célula espermática (REGAN et al., 2012) e sua posterior capacidade fecundante (FEITSMA et al., 2008; FEITSMA, 2009; McPHERSON et al., 2014).

Diagnóstico final

Ao final do exame andrológico, o reprodutor é considerado (1) apto (quando apresenta condições desejáveis do sistema genital, comportamento sexual, qualidade seminal e capacidade de executar a monta); (2) questionável (animal que falha em alguma das situações previamente citadas) ou (3) inapto (quando os exames caracterizarem condição indesejável irreversível). Vale ressaltar que a classificação do reprodutor não é permanente e que o mesmo deve ser reavaliado aproximadamente após 60 dias (período correspondente à duração da espermatogênese e trânsito epididimário).

Aplicabilidade prática do exame andrológico suíno

O exame andrológico deveria ser rotina nas centrais de processamento de sêmen suíno, porém a observação da saúde geral e dos órgãos genitais não é rotineiramente considerada. Na maioria das centrais, além da avaliação dos ejaculados, faz-se a avaliação do sistema locomotor dos machos quando os mesmos estão indo para a área de coleta de sêmen e também se faz a avaliação do pênis do animal no momento da coleta. Geralmente, há pouca mão de obra capacitada e pouco tempo dedicado a estas observações (MELLAGI et al., 2017).

Embora a literatura recomende um intervalo de 60 dias entre os exames andrológicos, atualmente, não existem recomendações de periodicidade para a espécie suína, sendo que cada empresa de melhoramento genético tem seus critérios para a seleção e avaliações de seus reprodutores.

Considerações finais

O conhecimento sobre a relação exata entre as informações geradas pelo exame andrológico e a fertilidade na espécie suína podem ter maior impacto tanto sobre o mérito genético dos futuros reprodutores quanto sobre a eficiência da IA.

Muitos parâmetros utilizados para a avaliação do reprodutor suíno são adaptações de outras espécies. Como desafio atual, temos a elaboração criteriosa das etapas do exame andrológico específico para a espécie suína, incluindo a revisão dos valores de referência e padronização das metodologias utilizadas.

Referências

- ANTONCZYK, A.; NIZANSKI, W.; PARTYKA, A.; OCHOTA, M.; MILA, H. The usefulness of real time morphology software in semen assessment of teratozoospermic boars. **Systems Biology in Reproduction Medicine**, v. 58, p. 362-368, 2012.
- BONET, S.; GARCIA, E.; SEPULVEDA, L. The boar reproductive system. In: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W. V.; YESTE, M. **Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends**. Berlin: Springer-Verlag, p. 65-107, 2013.
- BORTOLOZZO, F. P.; MENEGAT, M. B.; MELLAGI, A. P. G.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I. New Artificial Insemination Technologies for Swine. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, suppl. 2, p. 80–84, 2015.
- BORTOLOZZO, F. P.; BERNARDI, M. L.; BENNEMANN, P. E.; WENTZ, I. Inseminação artificial em suínos para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 5-16, 2008.
- BRITO, L. F.; GREENE, L. M.; KELLEMAN, A.; KNOBBE, M.; TURNER, R. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. **Theriogenology**, v. 76, p. 745-750, 2011.
- BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination centre, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. **Theriogenology**, v.77, 1466–1479, 2012.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; GAUSTAD, A. H.; BOLARIN GUILL, A.; KNOL, E. F. Efficient boar semen production and genetic contribution: the impact of low-dose artificial insemination on fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, suppl. 2, p. 103-109, 2015.

- BUENDÍA, P., SOLER, C., PAOLICCHI, F., GAGO, G., URQUIETA, B., PÉREZ-SÁNCHEZ, F. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the sperm-class analyzer computer-assisted system. **Theriogenology**, v. 57, 1207-1218, 2002.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Suínos. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. CBRA. Belo Horizonte-MG, p. 47-50, 2013.
- COOPER, T.G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 130-138, 2011.
- DYCK, M. K.; FOXCROFT, G. F.; NOVAK, S.; RUIZ-SANCHEZ, A.; PATTERSON, J.; DIXON, W. T.; Biological markers for boar fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 55-58, 2011.
- FEITSMA, H.; BERGSMA, R.; LEENHOUVEWERS, J.I.; KNOL, E.F. Combining AI and breeding databases for analyzing the relation between boar semen and sow fertility variables. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 43, p. 57-58, 2008.
- FEITSMA, H. Artificial insemination in pigs, research and developments in The Netherlands, a review. **Acta Sci Vet**, v. 37, p. 61-71, 2009.
- FENTIC, S.; YEUNG, C.; SONNTAG, B.; NIESHLAG, E.; COOPER, T. G. Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 294-301, 2006.
- FLOWERS, W. L. Triennial Reproduction Symposium: sperm characteristics that limit success of fertilization. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 3022-3029, 2013.
- GAGO, C.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; YEUNG, C. H.; TABLADO, L.; COOPER, T. G.; SOLER, C. Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the *Cynomolgus monkey* (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis. **International Journal of Andrology**, v. 2, p. 169-176, 1998.
- JUNG, M.; RUDIGER, K.; SCHULZE, M. In vitro measures for assessing boar semen fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 20-24, 2015.
- KNOX, R.; LEVIS, D.; SAFRANSKI, T.; SINGLETON, W. An update on North American boar stud practices. **Theriogenology**, v. 70, p. 1202-1208, 2008.
- KNOX, R. The physiology of sperm production and the reproductive management of boars for fertility. **Midwest Boar Stud Management Conference (BSMC)**, St. Louis Missouri, p. 1-19, 2016.
- KUMMER, A. B. H. P.; GAGGINI, T. S.; BERNARDI, M. L.; MCMANUS, C.; GONÇALES, E. M.; WENTZ, I. BORTOLOZZO, F. P. Multivariate analyses for determining the association of field porcine fertility with sperm motion traits analysed by computer-assisted semen analyses and with sperm morphology. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 747-754, 2013.
- MELLAGI, A. P. G.; PASCHOAL, A. F. L.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P. A avaliação andrológica em suínos foi esquecida na rotina de produção? **Avanços em Sanidade Produção e Reprodução de Suínos II**, p. 5-13, 2017.
- OMBELET, W.; POLLET, H.; BOSMANS, E.; VERECKEN, A. Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. **Human Reproduction**, v. 12, p. 1015–1020, 1997.
- REGAN, A. K.; AGARWAL, A.; VAN DER LINDE, M.; DU PLESSIS, S. S. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 1-8, 2012.
- WEITZE, K. F. Seleção de suínos machos jovens como doadores de sêmen. In: SIMPÓSIO SATÉLITE DO SIMPOSIO INTERNACIONAL DE SEUINOCULTURA, 5., 2010, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre, RS: UFRGS. 2010. 85 p.

Degeneração testicular: visão científica

Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹, Maíra Bianchi Rodrigues Alves¹, Bruna Marcele Martins de Oliveira¹, Leonardo Batissaco¹, Sâmara Cristine Costa Pinto¹, Vitor Hugo Guilger Gonzaga¹, Vinicius José Moreira Nogueira¹, Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Flávia dos Santos Almeida¹

Introdução

A degeneração testicular corresponde a alterações no parênquima testicular desencadeando mudanças nas estruturas das células de linhagem germinativa e modificações bioquímicas (GARCIA, 2017). A degeneração testicular acomete tanto homens quanto animais e possui fatores predisponentes multifatoriais. Essa alteração resulta em diminuição da fertilidade, visto que leva à redução da produção de espermatozoides e da qualidade espermática. Normalmente ela ocorre pela perda da termorregulação testicular (MOULE; WAITES, 1963), que pode ocorrer frente ao aumento da temperatura ambiental, em decorrência de alterações testiculares e escrotais tais como criptorquidismo, dermatites escrotais, hidrocele e hematocele. Inflamações ou traumas testiculares, lesões vasculares, infecções (SETCHELL, 1998; HANSEN, 2009) e até deficiência nutricional como a carência de vitamina A (retinol) (GOFF, 2006) também podem predispor a alteração. Dependendo do grau de acometimento do epitélio seminífero, a degeneração testicular pode ser classificada em leve, moderada ou grave (LAGERLOF, 1938; BICUDO et al., 2007). Sabe-se que os espermatócitos são as células mais sensíveis, seguidos das espermátides, dos espermatozoides e das espermatogônias (SETCHELL, 1998; PÉREZ-CRESPO et al., 2008). Sendo assim, se a causa primária da degeneração testicular for retirada, a produção espermática pode voltar à normalidade (HANSEN, 2009). Além das alterações de temperatura, a degeneração testicular pode ocorrer em função da desestruturação da barreira hemato-testicular (MRUK; CHENG, 2004).

Do ponto de vista histológico, a degeneração testicular apresenta primeiramente perda e vacuolização das células germinativas, com o avanço da alteração, há perda intensiva das células germinativas com acúmulo destas na luz dos túbulos. Há diminuição na espessura do epitélio seminífero e em casos exacerbados há perda total das células germinativas. Macroscopicamente, observa-se redução do volume testicular e aumento da flacidez do testículo, sendo também observadas alterações no espermograma (GARCIA, 2017).

Para o estudo da degeneração testicular, de forma controlada, se faz necessária a sua indução por meios conhecidos. Esta indução vem sendo bem descrita na literatura, podendo ocorrer por agentes que induzem a desestruturação da barreira hemato-testicular (MRUK; CHENG, 2004) ou por transtornos na termorregulação testicular (SIDIBÉ et al., 1992; BRITO et al., 2003; ARTEAGA et al., 2005; FERNANDES et al., 2008). A desestruturação da barreira hemato-testicular tem sido induzida tanto em estudos in vitro, utilizando-se cultivos de células de Sertoli e células germinativas, como em estudos in vivo, utilizando-se na maioria dos estudos o rato como modelo. A indução de danos na barreira hemato-testicular pode ocorrer por quebras nas junções compactas ou aderentes. Nestes estudos, são descritos usos de cloreto de cádmio, glicerol, peptídeo sintético de ocludina, andrógenos, estrógenos, óxido nítrico e outros (MRUK; CHENG, 2004).

A formação da barreira hemato-testicular é dependente de temperatura e de hormônios. A adição de testosterona em cultivo de células de Sertoli aumenta a resistência elétrica transepitelial (TER). O cloreto de cádmio diminui a TER, o que leva ao aumento da permeabilidade do manitol e altera as localizações de ocludina, zonula ocludens-1 e E-caderina. O glicerol rompe a barreira hemato-testicular e altera a espermatogênese, mas não afeta a esteroidogênese das células de Leydig, nem as concentrações sérias de FSH e LH. O glicerol altera a localização da ocludina e a organização dos microfilamentos e microtúbulos nos testículos. O cloreto de cádmio e o glicerol induzem danos irreversíveis na barreira hemato-testicular. Por outro lado, a administração intratesticular de um peptídeo sintético de ocludina causa ruptura reversível na barreira hemato-testicular; este peptídeo interfere com a interação homotípica entre duas moléculas de ocludina em aposição nas membranas de células de Sertoli. Uma vez que o peptídeo sintético de ocludina é metabolizado, a barreira hemato-testicular volta a sua estrutura normal; desta forma, este peptídeo tem sido utilizado como modelo in vivo para estudar a dinâmica da barreira hemato-testicular. A barreira hemato-testicular está sob a regulação de múltiplas variáveis, atuando independentes e/ou cooperativamente (MRUK; CHENG, 2004).

O modelo de indução da degeneração testicular por insulação escrotal (SIDIBÉ et al., 1992; BRITO et al., 2003; GARCIA, 2004; SOUZA, 2004; ARTEAGA et al., 2005; FERNANDES et al., 2008) parece ser mais adequado quando

¹ Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP

se pretende trabalhar com animais de produção. Já que no Brasil, a temperatura média anual é de 24°C (INMET, 2017) e a maior parte do rebanho fica localizada na zona tropical brasileira. Dessa forma, os animais estão submetidos a constantes aumentos de temperatura ambiental o que predispõe a alteração. Por se tratar de um país de clima tropical essa alteração já foi relatada como uma das maiores causas de diminuição da fertilidade em garanhões (ALVARENGA; PAPA, 2009) e touros (VALE FILHO et al., 1974). Em bovinos de origem europeia (*Bos taurus*) criados em regiões de clima semi-árido, subtropical e tropical essa afecção é corriqueiramente diagnosticada devido a não adaptação de determinadas raças às altas temperaturas destas regiões (KUMI-DIACA et al., 1981; WILDEUS; HAMMOND, 1993; BRITO et al., 2004).

Tendo em vista a importância da afecção na produção e reprodução animal, além da alta prevalência da mesma no Brasil, a presente revisão relaciona os principais conceitos e aspectos da degeneração testicular no tocante à etiopatogenia, diagnóstico e possíveis tratamentos.

Etiopatogenia e termorregulação testicular

A degeneração testicular normalmente decorre da perda de termorregulação testicular com o aumento da temperatura testicular que resulta no aumento do metabolismo celular. No entanto, não há aumento significativo da vascularização testicular e resulta na hipóxia celular levando ao estresse oxidativo (SETCHELL, 1998; HANSEN, 2009). Em decorrência deste processo, ocorre fragmentação de DNA (PAUL et al., 2009) e apoptose celular (PÉREZ-CRESPO et al., 2008; PAUL et al., 2009).

A manutenção da temperatura testicular é de suma importância para que a espermatogênese ocorra normalmente, sendo cerca de 2 a 6° C abaixo da temperatura corpórea (KASTELIC et al., 1996a,b), além da manutenção da espermatogênese, temperaturas testiculares mais baixas são necessárias para a produção de hormônios (WANKE; GOBELLO, 2006), essa diferença de temperatura é obtida devido a ação conjunta do plexo pampiniforme, os músculos da túnica *dartus* e cremaster, a superfície escrotal e as glândulas sudoríparas apócrinas escrotais (BLAZQUEZ et al., 1988; HANSEN, 2009).

O plexo pampiniforme corresponde ao entrelaçado de artérias e veias estando localizado no funículo espermático, onde ocorre troca de temperatura entre o sangue arterial e venoso dos testículos (KASTELIC et al., 1996a; HANSEN, 2009; BARROS et al., 2011). A túnica *dartus*, está localizada abaixo da pele escrotal, exercendo a contração ou relaxamento dos testículos de acordo com a temperatura escrotal, onde encontra-se os nervos sensitivos (SENGER, 2003), conjuntamente o músculo estriado cremaster ajusta a posição do escroto em relação ao corpo do animal como também altera o fluxo sanguíneo dos testículos (HANSEN, 2009; SENGER, 2003).

O aumento da temperatura ambiental pode levar ao processo de degeneração testicular, pois altera a termorregulação desencadeando redução na fertilidade. A umidade e a temperatura estão diretamente associadas com o processo de termorregulação, segundo Setchell (1998), se ocorrer elevação da temperatura climática, conseqüentemente, haverá aumento na temperatura escrotal, de forma exacerbada ocorrerá aumento no metabolismo testicular; contudo, o aporte sanguíneo não será suficiente acarretando em hipóxia testicular e desencadeando a degeneração testicular, corroborando os achados de Vale Filho (2001), os quais verificaram que a baixa eficiência reprodutiva pode ser oriunda de diferenças climáticas afetando a gametogênese. Quanto aos aspectos da cinética e morfologia espermática Kastelic et al. (1996b); Brito et al. (2003); Garcia (2004); Souza (2004); Arteaga et al. (2005); Fernandes et al. (2008) e outros autores relatam redução da motilidade espermática, diminuição da produção de espermatozoides, aumento de defeitos espermáticos ocasionados pelo aumento da temperatura testicular.

Diagnóstico

Durante o exame andrológico, a avaliação dos testículos, como consistência, perímetro e ultrassonografia podem revelar alterações características que podem contribuir no diagnóstico. O animal apresentando degeneração testicular poderá apresentar alterações da consistência, dependendo do grau da lesão, é possível que os testículos se apresentem mais flácidos. O perímetro escrotal tende a diminuir com a cronicidade da degeneração. Durante a ultrassonografia no modo B, o parênquima é observado como uma imagem mais heterogênea do que aquela do testículo normal (AHMADI; NOAKES, 1995; BRITO et al., 2003) e, dependendo da evolução do processo, pontos de calcificação, demonstrados por áreas hiperecoicas, podem ser observados (AHMADI; NOAKES, 1995). Porém, somente essas constatações não são suficientes para a conclusão do diagnóstico sendo necessária a colheita e avaliação do ejaculado (LAGERLOF, 1938; BARTH; OKO, 1989; BICUDO et al., 2007; PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009).

O espermograma é composto por uma série de etapas que visam avaliar a qualidade da amostra seminal. Estudos

demonstram que em animais com degeneração testicular, é observada queda na motilidade espermática (WETTEMANN et al., 1976; VOGLER et al., 1993). Durante a avaliação da morfologia, amostras de animais que apresentam degeneração testicular evidenciam principalmente alterações de cabeça e cauda, cabeças isoladas e gotas citoplasmáticas proximais (LAGERLOF, 1938; MOULE; WAITES, 1963; BARTH; OKO, 1989; GARCIA, 2004; BICUDO et al., 2007; PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009). Alterações na integridade dos compartimentos da célula espermática também são notadas após a degeneração testicular. Garcia (2004) avaliou a porcentagem de células com a membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial (células PIAIA), utilizando sondas fluorescentes em amostras de touros e verificou que duas semanas após o insulto, a porcentagem de células desta categoria foi de $4,38 \pm 2,40\%$ em animais submetidos à insulação, sendo significativamente reduzida ($p=0,0003$) quando comparada aos animais não insulados (controle) em que este percentual foi de $49,5 \pm 12,01\%$. Resultados semelhantes foram encontrados por Alves et al. (2016a) ao avaliar amostras de ovinos que foram submetidos à insulação escrotal, sendo observado 26,44% de células PIAIA, percentual significativamente ($p < 0,0001$) mais baixo do que aqueles de animais que não receberam o insulto, que apresentaram 55,15% de células PIAIA. Além disso, apresentaram maior porcentagem na produção de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e maior fragmentação de DNA.

Além das avaliações espermáticas, exames ultrassonográficos mais modernos e termográficos podem também ser realizados e são complementares no diagnóstico.

Animais apresentando degeneração testicular apresentam maior heterogeneidade do parênquima testicular (AHMADI et al., 2012) e presença de pontos de calcificação nos túbulos seminíferos (AHMADI; NOAKES, 1995), que podem ser constatados na ultrassonografia. A ultrassonografia Doppler pode ser usada para verificar alterações vasculares, como constatado em camelídeos inférteis (KUTZLER et al., 2011).

Estudos em humanos utilizam a análise da vascularização por ultrassonografia Doppler para a avaliação de diversas doenças testiculares (DUDEA et al., 2010). Na orquite aguda, por exemplo, o parênquima se apresenta intensamente colorido, denotando aumento da vascularização, denominado de aspecto típico de “inferno testicular” (DUDEA et al., 2010). Entretanto, a degeneração testicular é pouco caracterizada ainda ultrassonograficamente com o modo Doppler, demonstrando que mais pesquisas são necessárias para que essa ferramenta possa ser utilizada para auxiliar o diagnóstico.

A termografia também é uma ferramenta relativamente nova para a identificação de distúrbios reprodutivos (RUEDIGER et al., 2016), também pode ser usada como método diagnóstico. A técnica se baseia na captação das ondas eletromagnéticas de frequências infravermelhas emitidas pelas superfícies corporais, e representação destas com diferentes cores na imagem termográfica dependendo da quantidade de calor irradiado (COULTER et al., 1988; BASILE et al., 2010).

Com o exame é possível detectar a temperatura superficial da área examinada, no caso da superfície escrotal (COULTER et al., 1988). Por ser um exame não invasivo, não interfere na temperatura escrotal e é possível ser feito sem provocar estresse ao animal. Essa ferramenta foi utilizada em homens com distúrbios reprodutivos, varicocele e causas idiopáticas de oligozoospermia, quando comparados a homens sem problemas reprodutivos, notaram-se diferenças significativas entre as temperaturas da superfície escrotal (GAZVANI et al., 2000). Resultados similares foram encontrados para ovinos por Alves et al. (2016a), que mostraram que o aumento de temperatura verificado pela termografia é capaz de resultar em alterações espermáticas.

A técnica da termografia, entretanto, ainda possui algumas limitações como a temperatura ambiente, interferência da superfície a ser termografada, contato de outras superfícies com a área a ser analisada, que podem influenciar nos resultados (BASILE et al., 2010).

Terapias

O tratamento da degeneração testicular tem como ponto limitante o fato de seus sinais clínicos serem observados apenas quando a alteração atinge grau moderado a grave. A recomendação é que o agente causador seja retirado; no entanto, quando os sinais clínicos são observados, é possível que o fator causador já não esteja mais presente. De forma adicional, deve ser feita a terapia de suporte, utilizando antioxidantes como a vitamina E e o selênio (ALVARENGA; PAPA, 2009), já que a suplementação com essas substâncias pode auxiliar o retorno da função das espermatogônias, células de Leydig e Sertoli (HSU et al., 1998). Alguns estudos demonstraram que a utilização de substâncias antioxidantes auxiliou na diminuição da peroxidação lipídica, maior taxa de retorno à espermatogênese (VIGUERAS-VILLASEÑOR et al., 2011), na produção de testosterona, formação e desenvolvimento normal de espermatozoides (BEHNE et al., 1996), além de melhora no aspecto histológico testicular e aumento da concentração sérica de testosterona e LH (SAKR et al., 2011).

No entanto, dependendo do grau da lesão, somente a retirada do agente causador ou a administração de antioxidantes não são suficientes para o sucesso do tratamento, pois a recuperação plena da capacidade espermática dependerá de respostas individuais e principalmente do grau do dano causado (ALVARENGA; PAPA, 2009).

Apesar dos agentes antioxidantes possuírem papel importante e conhecido frente à degeneração testicular, os resultados variam muito, as doses de administração ainda não estão bem estabelecidas e os tratamentos com os antioxidantes devem ser preventivos, ou seja, o fornecimento dos antioxidantes deve ser feito na dieta de reprodutores saudáveis (ALVARENGA; PAPA, 2009) para evitar o distúrbio. Dessa forma, a vitamina A também aparece como uma alternativa de tratamento devido ao seu efeito proliferativo, principalmente em epitélios. Apesar de ainda haver poucos relatos de seu uso para o tratamento de degeneração testicular, Abdulkareem et al. (2005) observaram que ovinos suplementados com vitamina A mostraram diminuição dos defeitos espermáticos.

Outro potente agente antioxidante é a melatonina que tem ação sobre a regulação de GnRH, LH e FSH, através de seus receptores no hipotálamo e hipófise (WEAVER et al., 1993; JOHNSTON et al., 2006). Estudos recentes demonstraram que este antioxidante reduz significativamente os níveis de indicadores de estresse oxidativo e de peroxidação lipídica (PARLAKTAS et al., 2014), além de manterem as características histológicas da arquitetura do parênquima testicular (KANTNER, 2010) e atuar diretamente sobre a expressão de genes que participam ativamente da formação da barreira hemato-testicular, das células de Leydig, da espermatogênese e do mecanismo de apoptose (YANG et al., 2014). Em camundongos, a melatonina exerce efeito protetor contra o estresse oxidativo e a inflamação envolvidas na toxicidade da degeneração testicular induzida pelo cádmio (LI et al., 2016).

A somatotropina recombinante bovina foi testada como tratamento de touros induzidos à degeneração testicular por insulação escrotal; no entanto, nenhum efeito foi notado sobre as características seminais (GARCIA, 2004; SOUZA, 2004) e as concentrações sérias de testosterona e IGF-1 (SOUZA, 2004), nem sobre os aspectos clínicos dos testículos (GARCIA, 2004).

Além dos já citados, a laserterapia de baixa intensidade (LTBI) pode ser uma possibilidade de tratamento, com o objetivo de estimular a proliferação das células de Leydig, Sertoli e espermatogônias. Pesquisas demonstram a utilização de LTBI tem bons resultados na estimulação da proliferação de tecidos ósseos (HUERTAS et al., 2014), de melanócitos (AVCI et al., 2013) e na angiogênese (COLOMBO et al., 2013). Apesar desses bons resultados, Alves et al. (2016b) não observaram melhoras com a utilização da laserterapia em carneiros com degeneração testicular. Por este motivo, mais pesquisas precisam ser desenvolvidas na busca da melhor utilização desta ferramenta.

A quercetina, um flavonoide natural, que possui propriedades antioxidantes, tem apresentado resultados promissores sobre a recuperação de ratos com danos testiculares induzidos por cádmio (KANTER et al., 2016), por isquemia por torção induzida (CHI et al., 2017) e por manganês (ADEDARA et al., 2017). A quercetina também foi testada sobre os defeitos da espermatogênese induzida por nanopartículas de dióxido de titânio (NTiO₂) em camundongos, notou-se melhora na qualidade espermática e na histologia testicular, associadas ao aumento da concentração de testosterona, redução na apoptose das células germinativas e supressão ao estresse oxidativo no tecido testicular (KHORSANDI et al., 2017). Estes achados, podem mostrar uma nova possibilidade de tratamento aos danos testiculares, que ainda devem ser testados em outras espécies.

Considerações finais

Apesar dos conhecimentos já adquiridos sobre a degeneração testicular, ainda há muitos mecanismos das diferentes vias de etiopatogenia incertos, sendo necessários mais estudos, principalmente a um nível molecular. As diferentes ferramentas diagnósticas visam aumentar tanto a acurácia quanto a precocidade do diagnóstico. Apesar das diversas terapias existentes, muito mais deve ser explorado, abrangendo desde mecanismos antioxidantes até terapias de regeneração testicular e controle da apoptose. Com isso, fica evidente a necessidade de mais pesquisas acerca das consequências, métodos diagnósticos e possíveis terapias acerca da degeneração testicular, visto o grande impacto dessa sobre a fertilidade.

Referências

- ABDULKAREEM, T. A.; AL-HABOBY, A. H.; AL-MJAMEI, S. M.; HOBI, A. A. Sperm abnormalities associated with vitamin A deficiency in rams. **Small Ruminant Research**, v. 57, p. 67–71, 2005.
- ADEDARA, I. A.; SUBAIR, T. I.; EGO, V. C.; OYEDIRAN, O.; FAROMBI, E. O. Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 263, p.88-98, feb. 2017.

- AHMADI, B.; LAU, C. P.S.; GIFFIN, J.; SANTOS, N.; HAHNEL, A.; RAESIDE, J.; CHRISTIE, H.; BARTLEWSKI, P. Suitability of epididymal and testicular ultrasonography and computerized image analysis for assessment of current and future semen quality in the ram. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 2, p. 186-193, 2012.
- AHMADI, N.; NOAKES, D. E. Ultrasound imaging in determining the presence of testicular degeneration in two male goats. **British Veterinary Journal**, v. 151, n. 1, p. 101-110, 1995.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 204-209, 2009.
- ALVES, M. B.; ANDRADE, A. F.; ARRUDA, R. P.; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A.; OLIVEIRA, B.M.; TORRES, M.A.; LANÇONI, R.; RAVAGNANI, G. M.; PRADO FILHO, R. R.; VELLONE, V. S.; LOSANO, J. D.; FRANCI, C. R.; NICHI, M.; CELEGHINI, E. C. C. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 795-805, 2016a.
- ALVES, M.B.; DE ARRUDA, R.P.; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A.; DE OLIVEIRA, B.M.; TORRES, M.A.; RAVAGNANI, G.M.; LANÇONI, R.; DE ALMEIDA, T.G.; STORILLO, V.M.; VELLONE, V.S.; FRANCI, C.R.; THOMÉ, H.E.; CANELLA, C.L.; DE ANDRADE, A.F.; CELEGHINI, E.C. Low-level laser therapy to recovery testicular degeneration in rams: effects on seminal characteristics, scrotal temperature, plasma testosterone concentration, and testes histopathology. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 4, p. 695-704, 2016b.
- ARTEAGA, A. A.; BARTH, A.; BRITO, L. F. C. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. **Theriogenology**, v. 64, p. 408-415, 2005.
- AVCI, P.; GUPTA, A.; SADASIVAM, M.; VECCHIO, D.; PAM, Z.; PAM, N.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser (light) therapy (LLL) in skin: stimulating, healing, restoring. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 32, n. 1, p. 41-52, mar. 2013.
- BARROS, C. M. Q.; OBA, E.; SIQUEIRA, J. B.; LEAL, L. S.; KASTELIC, J. P. Efeitos da diminuição do fluxo sanguíneo testicular nas temperaturas escrotal superficial escrotal subcutânea, intratesticular e intravascular em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 49-54, jan/mar. 2011.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press, 1989. p. 3-6.
- BASILE, R.C.; ALBERNAZ, R.M.; PEREIRA, M.C.; ARAÚJO, R.; FERRAZ, G.C.; QUEIROZ-NETO, A. Guia prático de exames termográficos em equinos. **Revista Brasileira de Medicina Equina**, v. 6, n. 31, p. 24-28, 2010.
- BEHNE, D.; WEILER, H.; KYRIAKOPOULOS, A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 291-297, 1996.
- BICUDO, S. D.; SIQUEIRA, J. B.; MEIRA, C. Patologias do sistema reprodutor de touros. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 43-48, 2007.
- BLAZQUEZ, N. B.; MALLARD, G. J.; WEDD, S. R. Sweet glands of the scrotum of the bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 673-677, 1988.
- BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; UNANIAN, M. M.; KASTELIC, J. P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 1-15, 2003.
- BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; KASTELIC, J. P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v. 61, p. 511-528, jan. 2004.
- CHI, K. K.; ZHANG, W. H.; WANG, G. C.; CHEN, Z.; HE, W.; WANG, S. G.; CUI, Y.; LU, P.; WANG, X. J.; CHEN, H. Comparison of intraperitoneal and intraepididymal quercetin for the prevention of testicular torsion/detorsion-induced injury. **Urology**, v. 99, p. 106-111, 2017.
- COLOMBO, F.; VALENÇA NETO, A. D. A. P.; SOUSA, A. P. C.; MARCHIONNI, A. M. T.; PINHEIRO, A. L. B.; REIS, S. R. A. Effect of low-level laser therapy (λ660 nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 4, p. 308-312, jan. 2013.
- COULTER, G. H.; SENGER, P. L.; BAILEY, R. C. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 417-423, nov. 1988.

- DUDEA, S. M.; CIUREA, A.; CHIOREAN, A.; BOTAR-JID, C. Doppler applications in testicular and scrotal disease. **Medical Ultrasonography**, v. 12, n. 1, p. 43-51, mar. 2010.
- FERNANDES, C.E.; DODE, M.A.N.; PEREIRA, D.; SILVA, A.E.D.F. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, p. 1560-1568, 2008.
- GARCIA, A. R. **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. 258 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- GARCIA, A. R. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.33-39, 2017.
- GAZVANI, M. R.; WOOD, S. J.; THOMSON, A J.; KINGSLAND, C. R.; LEWIS-JONES, D. I. Assessment of testicular core temperatures using microwave thermography. **Human Reproduction** (Oxford, England), v. 15, n. 8, p. 1723-1726, ago. 2000.
- GOFF, J. P. Vitaminas. In: REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 520.
- HANSEN, P. J. 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, nov. 2009.
- HSU, P. C.; LIUM, M. Y.; HSU, C. C.; CHEN, L. Y.; GUO, Y. L. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, v. 128, n. 3, p. 169-179, jul. 1998.
- HUERTAS, R. M.; LUNA-BERTOS, E. de; RAMOS-TORRECILLAS, J.; LEYVA, F. M.; RUIZ, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, O. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation. **Biological Research for Nursing**, v. 16, n. 2, p. 191-196, abr. 2014.
- JOHNSTON, J. D.; KLOSEN, P.; BARRETT, P.; HAZLERIGG, D. G. Regulation of MT melatonin receptor expression in the foetal rat pituitary. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, p. 50-56, 2006.
- KANTNER, M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia–reperfusion injury in rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 89, p. 314-320, 2010.
- KANTER, M.; AKTOZ, T.; AKTAS, C.; OZEN, F.; YARALI, O.; KANTER, B. Role of quercetin in cadmium-induced oxidative stress, testicular damage, and apoptosis in rats. **Analytical Quantification Cytopathology Histopathology**, v. 38, n. 1, p. 45-51, 2016.
- KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 81-85, set. 1996a.
- KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H.; SAACKE, R.G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the Bull. **Theriogenology**, v.45, p.935-942, 1996b.
- KHORSANDI, L.; ORAZIZADEH, M.; MORADI-GHARIBVAND, N.; HEMADI, M.; MANSOURI, E. Beneficial effects of quercetin on titanium dioxide nanoparticles induced spermatogenesis defects in mice. **Environmental Science Pollution Research International**, v. 24, n. 6, p. 5595-5606, 2017.
- KUMI-DIAKA, J.; NAGARATNAM, V.; RWUAAN, J. S. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. **Veterinary Record**, v. 108, n. 1, p. 13-15, jan. 1981.
- KUTZLER, M.; TYSON, R.; GRIMES, M.; TIMM, K. Determination of testicular blood flow in camelids using vascular casting and color pulsed-wave Doppler ultrasonography. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-7, Jan. 2011
- LAGERLOF, N. Infertility in male domestic animals. **Veterinary Medicine**, v. 33, p. 550-561, 1938.
- LI, R.; LUO, X.; LI, L.; PENG, Q.; YANG, Y.; ZHAO, L.; MA, M.; HOU, Z. The protective effects of melatonin against oxidative stress and inflammation induced by acute cadmium exposure in mice testis. **Biology of Trace Element Research**, v. 170, p. 152-164, 2016.
- MOULE, G. R.; WAITES, G. M. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 5, p. 433-446, jun. 1963.
- MRUK, D. D.; CHEG, C.Y. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747-806, 2004.

- PARLAKTAS, B. S.; ATILGAN, D.; OZYURT, H.; GENCTEN, Y.; AKBAS, A.; ERDEMIR, F.; ULUOCAK, N. The biochemical effects of ischemia–reperfusion injury in the ipsilateral and contralateral testes of rats and the protective role of melatonin. **Asian Journal of Andrology**, v.16, p. 314-318, 2014.
- PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P. T. K. A Single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. **Biology of Reproduction**, v. 80, n.5, p. 913-919, jan. 2009.
- PÉREZ-CRESPO, M.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 40-47, jan. 2008.
- RUEDIGER, F. R.; CHACUR, M. G. M.; ALVES, F. C. P. E.; OBA, E.; RAMOS, A. A. Digital infrared thermography of scrotum, sêmen quality, serum testosterone levels in Nelore bulls (*Bos Taurus indicus*) and their correlation with climatic factors. **Ciências Agrárias**, v. 37, n.1, p. 221-231, 2016.
- SAKR, S. A. R.; MAHRAN, H. A.; NOFAL, A. E. Effect of selenium on carbimazole-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, p. 59-66, jan. 2011.
- SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. nd ed. Whasiginton, USA: Currente Conceptions, 2003. 373 p.
- SETCHELL, B. P. The Parkes lecture heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.114, p.179-194, 1998.
- SIDIBÉ, M.; FRANCO, L.A.; FREDRIKSSON, G.; MADEJ, A.; MALMGREN, L. Effects on testosterone, LH and cortisol concentrations and on testicular ultrasonographic appearance of induced testicular degeneration in bulls. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 33, n. 3, 191-196, 1992.
- SOUZA, L. W. O. **Efeitos da somatotropina recombinante bovina sobre as características espermáticas, concentrações de testosterona e IGF-I no plasma seminal de touros (*Bos taurus taurus*) submetidos à degeneração testicular**. 2004. 183 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- VALE FILHO, V. R.; MEGALE, F.; GARCIA, O. S.; ABREU, J. J.; FONSECA, V. O.; RESENDE, J. Prevalência das causas de baixa fertilidade e infertilidade, em touros criados em diferentes regiões do Brasil; de um levantamento de 9 Estados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 14., 1974, São Paulo. **Anais...Sao Paulo: SBMV**, 1974. p.179.
- VALE FILHO, V.R. Subfertilidade em touros: parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 35, p. 81-87, 2001.
- VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M.; OJEDA, I.; GUTIERREZ-PÉREZ, O.; CHAVEZ-SALDAÑA, M.; CUEVAS, O.; MARIA, D. S.; ROJAS-CASTAÑEDA. J. C. Protective effect of α -tocopherol on damage to rat testes by experimental cryptorchidism. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 92, p. 131-139, abr. 2011.
- VOGLER, C. J.; BAME, J. M.; DEJARNETTE, J. M.; MCGILLIARD, M. L.; SAACKE, R. G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, p. 1207-1219, dez. 1993.
- YANG, W. C.; TANG, K. Q.; FU, C. Z.; RIAZ, H.; ZHANG, Q.; ZAN, L. S. Melatonin regulates the development and function of bovine Sertoli cells via its receptors MT1 and MT2. **Animal Reproduction Science**, v. 147, p. 10-16, 2014.
- WANKE, M.M.; GOBELLO, C. **Reproduction en caninos y felinos Domesticos**. Buenos Aires: Inter.-Medica editorial, 2006. 309p.
- WEAVER, D.R.; STEHLE, J.H.; STOPA, E.G.; REPERT, S.M. Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 76, p. 295-301, 1993.
- WETTEMANN, R. P.; WELLS, M. E.; OMTVEDT, I. T.; POPE, C. E.; TURMAN, E. J. Influence of Elevated Ambient Temperature on Reproductive Performance of Boars. **Journal of Andrology**, v. 42, p. 664-669, 1976.
- WILDEUS, S.; HAMMOND, A. C. Testicular, semen and blood parameters in adapted and nonadapted *Bos taurus* bulls in the semi-arid tropics. **Theriogenology**, v. 40, p. 345-355, abr. 1993.

Eletroejaculação e massagem dos genitais internos: impacto sobre o bem-estar animal

Neimar Correa Severo¹

Introdução

A coleta de sêmen é utilizada para avaliação andrológica do macho (seja ele homem ou animal) e a qualidade da amostra coletada é dependente do método de coleta. A eletroejaculação (EEJ) é o método eleito para a coleta em touros, carneiros e bodes, tanto nos exames andrológicos a campo como nos centros de coleta e processamento de sêmen quando os reprodutores não aceitam a vagina artificial (VA) nos (CCPS), por comportamento ou problema clínico.

Nos exames andrológicos de rotina, isto é, aqueles utilizados para os reprodutores que vão entrar em serviço nas propriedades ou ainda para comercialização direta em feiras e leilões, é importante que seja feita a coleta de uma amostra de sêmen; isto com o intuito de avaliar a condição fisiológica do sistema reprodutivo animal. Para a venda de reprodutores em leilões, em sua maioria, é obrigatório a apresentação de exame andrológico com validade de até 30 dias.

Histórico da eletroejaculação

O método da EEJ foi desenvolvido como alternativa para a coleta de sêmen dos animais, a partir das observações feitas pela primeira vez no século XIX, onde a ejaculação ocorria quando as pessoas eram eletrocutadas (BALL, 1974). Em 1888, Remy e Batelli estimularam um gânglio situado sobre a veia cava posterior, na altura da veia renal e obtiveram vibrações intensas das paredes das glândulas vesiculares e com isso a ejaculação em cobaios (MASCARENHAS, GOMES, 1950). Porém, as primeiras tentativas para provocar a ejaculação através de estímulos elétricos foram realizadas por Batelli em 1922, quando obteve sêmen de cobaios adultos, com descarga elétrica de 30 volts e corrente alternada de 47 ciclos, com um eletrodo colocado na boca e outro na base da nuca dos animais (SEVERO, 2013).

Em 1936, Gunn, após exaustivos experimentos iniciados em 1932 com cobaios, publicou os primeiros resultados de coletas em carneiros utilizando um eletrodo no reto e outro na região lombar dos animais, fazendo passar um estímulo elétrico de 30 volts com corrente alternada de 50 ciclos e ritmo de 5 a 10 segundos para obter a ejaculação (SEVERO, 2013). Em 1944, Barreto e Mies Filho, descrevem pela primeira vez no Brasil, a estimulação elétrica para a coleta de sêmen de carneiros e cobaios, empregando a técnica descrita por Gunn em 1936.

Mais tarde, em 1945 na França, a técnica foi melhorada por Laplaud & Cassou, quando utilizaram um equipamento com eletrodo retal bipolar, reduzindo em muito as contrações musculares provocadas pelo aparelho de Gunn. Já em 1948, Laplaud & Cassou, obtiveram sêmen de touros através de um eletrodo bipolar retal, quando aplicaram corrente alternada de 30 volts e 700 miliampères e Thibault et al. (1948) usaram um eletrodo único com uma série de 30 anéis conectados a um potenciômetro (SEVERO, 2013).

Novos equipamentos foram desenvolvidos no Brasil (MASCARENHAS; GOMES, 1950) e nos Estados Unidos (DZIUK et al., 1954; MARDEN, 1954) com maior eficiência na estimulação e com sondas que diminuam as reações musculares. No Brasil existem vários modelos no mercado, com diferentes tipos de estimulação e desenho de sonda. Os melhores equipamentos devem provocar menores reações musculares, porém o sucesso da coleta de sêmen é dependente da habilidade do veterinário andrologista.

Posição anatômica dos órgãos genitais internos

É importante que o veterinário andrologista conheça a localização dos órgãos genitais internos, bem como dos músculos envolvidos com o mecanismo de emissão, ereção e ejaculação; tanto para a coleta com eletroejaculador

¹ Alta Genetics do Brasil, Uberaba, MG

como para a massagem transretal (MTR). Os principais órgãos envolvidos com a produção das secreções, que formam o plasma

seminal, são as ampolas dos ductos deferentes, glândulas vesiculares, próstata e glândulas bulbouretrais (SALISBURY et al., 1978).

Estes órgãos estão alojados no piso do ísquio e púbis, abaixo do reto e ocupam toda a extensão longitudinal da pelve. Próximo a eles se encontram vasos e nervos que irrigam e inervam a região, mas também irrigam e inervam os músculos dos membros posteriores. Grandes massas musculares se inserem na pelve óssea e sofrem a ação das estimulações elétricas durante a eletroejaculação.

O mecanismo fisiológico da ereção se faz através do seguinte mecanismo: os músculos uretral, bulbo-esponjoso e cavernosos estão envolvidos com o ato de ejaculação do sêmen; os músculos bulbo-esponjoso e cavernosos nascem na base do arco isquiático e formam a estrutura do pênis, juntamente com os músculos retratores, que se inserem na superfície ventral das primeiras vértebras caudais.

Neurofisiologia da ereção e ejaculação

A ejaculação é um processo que ocorre em duas fases: 1) Durante a fase de emissão, o sêmen é expelido dos ductos deferentes e das ampolas para a uretra pélvica, junto com os fluidos das glândulas anexas. Esta fase é mediada pelo sistema nervoso simpático; 2) Na fase ejaculatória, o sêmen é empurrado da uretra, pelas contrações vigorosas dos músculos uretrais e bulbo-esponjoso, para a uretra peniana e expelido para fora do pênis. Esta fase é mediada pelo sistema nervoso parassimpático (SALISBURY et al., 1978).

Os nervos associados ao processo de emissão e ejaculação são diferentes e estão localizados em pontos distintos da cavidade pélvica. A fase de emissão é controlada pelos nervos simpáticos (hipogástricos), que estão localizados na parte anterior da pélvis, sobre as ampolas e glândulas vesiculares. A estimulação desses nervos causa emissão do sêmen, porém não provoca a ereção. Os nervos que causam a ereção estão localizados na parte mais caudal da pélvis e se originam nos nervos sacrais, isto é, nos nervos pudendo e hemorroidal (BALL, 1978). Então, os problemas com a EEJ começam nesse ponto, devido à localização dos nervos da emissão e ejaculação estarem muito próximos dos nervos motores, como o nervo ciático e obturador, que inervam os grandes músculos dos membros posteriores. Estes nervos são facilmente estimulados ao mesmo tempo em que se estimulam os nervos da emissão, ereção e ejaculação.

Protocolos de estimulação

A quantidade de estímulos deve ser calibrada sempre pela resposta do reprodutor e não pela observação do voltímetro do equipamento. Os estímulos iniciais devem ser lentos (3 segundos de estimulação e 3 segundos de repouso) até que o animal comece a liberação da pré-secreção. Aumentam-se os estímulos para 15 a 20 estimulações, sempre seguidos do mesmo tempo de pausa. A taxa e o ritmo dos estímulos são mais importantes para a protrusão do pênis do que para a emissão do sêmen (BARTH, 2013).

Os impulsos para ejaculação devem ser mais longos com pausas menores. Em geral, se gradua os estímulos de acordo com a reação muscular do touro, aumentando a intensidade sem que ocorram mudanças repentinas que possam causar contrações musculares adversas, que possam prejudicar a ereção e a exteriorização do pênis, além de estressar o animal. Se o touro não expõe o pênis, um assistente deve empurrar a flexura sigmoide atrás da bolsa escrotal com movimentos firmes para frente até que a glândula seja exposta. O operador deve segurar rapidamente a glândula do touro com uma gaze e puxar o pênis para fora do prepúcio.

Mover a sonda para a posição caudal do reto e continuar a estimulação com a mesma frequência, coletando todas as frações do sêmen ejaculado é o mais recomendável. Estímulo mecânico (pressão ou massagem) sobre a região lombar e dorsal da coluna vertebral relaxa o touro e facilita a liberação do ejaculado.

A maioria dos touros libera o sêmen sem uma grande quantidade de estimulações; porém, se não houver resposta na primeira sequência, um período de 2-3 minutos de descanso será necessário. A seguir, executar uma segunda sequência, onde com frequência o touro responderá com poucas estimulações.

Estresse do desconforto e da dor

A eletroejaculação é adequada para colher sêmen de espécies em cativeiro, tanto animais silvestres como selvagens, uma vez que os animais podem ser sedados ou anestesiados, com boa resposta a estimulação. Porém, entre as espécies domésticas ela é utilizada em touros, carneiros e bodes, sem sedação ou anestesia (STAFFORD, 1995).

O uso da EEJ sem anestesia foi banida em vários países da Europa (MOSURE et al., 1998) e desencorajada no Reino Unido (PALMER, 2005), devido ao desconforto e provável dor causada durante o manuseio. Apesar dessas considerações, Esteban-Gil et al. (2016), citam que ocasionalmente a técnica da EEJ é usada na Europa para avaliar a função sexual de touros. Um estudo realizado por Whitlock et al. (2012) forneceu evidências de que este método de coleta de sêmen não resulta em dor para o touro.

A Associação Australiana de Veterinária ratificou em 15 de fevereiro de 2008 um parecer favorável ao uso da EEJ, desde que feita ou supervisionada por veterinários. Nos Estados Unidos a EEJ ainda é considerada um procedimento aceitável por vários comitês de bem-estar animal apesar das controvérsias e no Canadá, a Associação Canadense de Medicina Veterinária, emitiu uma declaração em 13 de março de 2013, considerando a técnica da EEJ um procedimento seguro para ruminantes sexualmente maduros. O código de bem-estar animal do governo da Nova Zelândia, ratificou em 15 de dezembro de 2016, parecer autorizando o uso da EEJ em ovinos e bovinos de corte, desde que executada ou supervisionada por veterinários.

Vários estudos foram realizados para avaliar os indicadores comportamentais de bem-estar animal relacionados com a EEJ em bovinos (MOSURE et al., 1998; FALK et al., 2001; ETSON et al., 2004). A elevação das frequências cardíaca e respiratória e da temperatura retal (MOSURE et al., 1998) são considerados indicadores de estresse nos bovinos e, a frequência de vocalização e de atitude de deitar são considerados indicadores de sensação de dor ou desconforto (PALMER, 2005). A ausência de um efeito de “memória” desagradável ao EEJ foi citado por Mosure et al. (1998), ao observar que os animais não apresentavam aversão ao retornarem as instalações para sessões sucessivas de coleta de sêmen, em *Bos taurus taurus*. Já Marques Filho et al. (2008) consideraram que a EEJ é um agente desencadeador do estresse em touros Nelore (*Bos taurus indicus*).

A EEJ é conhecida por causar aumento transitório do cortisol, da progesterona (P4) e da substância P no sangue, devido ao estresse (WHITLOCK et al., 2012). Porém, a técnica não provoca liberação das mesmas substâncias no plasma seminal (EILER et al., 1987). Touros submetidos a fatores estressantes apresentam aumento na secreção de cortisol e P4 pela adrenal, o que ocasiona efeito negativo sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. A P4 elevada inibe a secreção de GnRH, que bloqueia a secreção de FSH e LH pela hipófise, reduzindo os níveis de esteróides sexuais e da inibina pelos testículos, alterando a qualidade da espermatogênese em diferentes graus, dependendo do nível de estresse (MARQUES FILHO et al., 2009).

O que fazer para reduzir o estresse de coleta

É importante que o andrologista tenha em mente que a coleta de sêmen por EEJ não é sinônimo de câmara de tortura. Para que isso não ocorra, o animal deve ser adequadamente contido no brete de contenção, protegido com cintas ventrais sob o esterno e o trem posterior, tomando o cuidado de não sufocá-lo com a pescoceira. Se possível, manter o animal livre no brete, o que lhe dará mais conforto e segurança. As ações diretas com o animal devem ser realizadas com calma, como a medição do perímetro escrotal, avaliação dos genitais externos e internos e finalmente a EEJ. O reconhecimento por parte do animal que o trabalho não lhe provocará desconforto, ajuda a reduzir o nível de estresse durante a coleta de sêmen. Fazer o trabalho de forma rápida, sem atropelos e sem barulhos ao redor do animal é outro fator importante na redução do estresse. Ao soltar o animal do brete de contenção, o auxiliar deve atuar com calma na liberação da pescoceira, enquanto abre totalmente a porta de acesso frontal.

Avaliação dos indicadores de bem-estar animal

Entre as várias definições para bem-estar a que melhor se aplica aos animais é: “bem-estar é o estado em que é permitido aos animais manifestarem todo o seu potencial, livres de maus tratos por parte dos seus cuidadores, com boa condição alimentar e social, livres de desconforto, medos e angústias” (SEVERO, 2017).

Os indicadores de bem-estar animal estão relacionados às condições fisiológicas e comportamentais em que os animais se encontram em seu local de ação, que pode ser no ambiente livre ou durante uma atividade imposta pelos seus cuidadores.

Os principais indicadores fisiológicos de estresse são: frequência cardíaca, níveis plasmáticos de cortisol, progesterona e substância P. Os principais indicadores comportamentais de estresse são: vocalização, debater-se no brete, atitude de deitar e tentativas de fuga (MOSURE et al., 1998, FALK et al., 2001, ETSON et al, 2004, PALMER, 2005, MARQUES FILHO et al., 2009, WHITLOCK et al., 2012).

As principais reações de desconforto observadas nos touros coletados por EEJ são: intensa reação muscular, debater-se procurando libertar-se da contenção, vocalização e às vezes decúbito (MOSURE et al, 1998). A definição de dor ou sofrimento causado pela estimulação de terminações nervosas é difícil de ser interpretada no animal, mas o andrologista deve estar atento as alterações comportamentais durante a coleta de sêmen.

Mosure et al. (1998), avaliaram a frequência cardíaca de touros coletados por EEJ e massagem transretal (MTR), utilizando lidocaína epidural, xilazina epidural e xilazina intravenosa. A anestesia epidural com lidocaína ou xilazina tende a resultar em menores alterações da frequência cardíaca, porém os dados não são conclusivos quanto à diminuição da dor e do desconforto. Os autores concluíram que a lidocaína epidural pode ser usada para reduzir as reações musculares.

O uso do cortisol para medir o nível de estresse em resposta a dor foi controverso (WELSH; JOHNSON, 1981). Procedimentos simples como palpação retal, venopunção e injeção intramuscular provocam o aumento dos níveis de cortisol no sangue (STAFFORD, 1995). A simples massagem transretal provoca o aumento do cortisol no sangue.

Estudos posteriores mostraram que a P4 adrenal era mais efetiva para medir os níveis de estresse e dor associado ao uso da EEJ do que o cortisol (FALK et al. 2001). Outro estudo confirmou estes achados onde a concentração de P4 foi mais baixa aos 5 e 20 minutos após a EEJ em touros que receberam lidocaína epidural comparados aos não tratados (ETSON et al., 2004). O uso de anestesia epidural nesse estudo foi benéfico na redução da P4, um indicador de uma resposta de estresse endócrino à EEJ. A concentração de cortisol permaneceu inalterada em ambos os estudos.

A substância P é um neuropeptídeo envolvido na integração da dor, estresse e ansiedade e sua presença significa que ocorreu resposta à dor, pois aumenta a excitabilidade dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal. Em um estudo realizado por Whitlock et al. (2012) foi comparada a vocalização e as concentrações plasmáticas de cortisol, progesterona e imunorreatividade da substância P em touros como resposta a EEJ. Ocorreu um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de cortisol e P4 após a EEJ, provavelmente devido ao estresse agudo. No entanto, a ausência de diferença nas concentrações plasmáticas de substância P, após a EEJ, foi interpretada como uma falta de dor associada à nocicepção. Os resultados desses estudos tem importante implicação para o bem-estar animal e ajudam a justificar o uso da EEJ como parte do exame andrológico, sem provocar dor aguda no touro.

Pagliosa et al. (2015) testaram a hipótese de que a administração epidural de lidocaína, xilazina ou xilazina mais hialuronidase proporcionava redução da dor e do estresse durante a EEJ em touros. O tratamento com xilazina ou xilazina mais hialuronidase resultou em desconforto menor do que o tratamento com lidocaína, conforme os indicadores de comportamento animal avaliados. Os resultados desses pesquisadores sugerem que a xilazina mais hialuronidase epidural reduz o desconforto durante a EEJ de forma mais eficaz do que a xilazina ou a lidocaína isoladamente.

Métodos Alternativos de Coleta de Sêmen

Massagem dos Genitais Internos

Um método alternativo à EEJ para coleta de sêmen de touros a campo é a massagem dos genitais internos (MTR). A técnica foi descrita pela primeira vez por Case em 1925. Mais tarde, Miller e Evans (1934) aperfeiçoaram-na para uso em touros doadores de sêmen na inseminação artificial. A MTR tem sido pesquisada em alguns países da Europa onde a EEJ foi proibida (PERSSON et al., 2007; SYLLA et al., 2015) ou como método alternativo de coleta (PALMER et al., 2004; PALMER et al., 2005; ALI, 2014).

Na citação de Case, ele recomendava a massagem das glândulas vesiculares, enquanto Miller & Evans utilizavam primeiro a massagem das glândulas vesiculares, seguida pela massagem das ampolas para obter amostra com boa quantidade de espermatozóides. A massagem em todas as estruturas é feita no sentido crânio-caudal e a primeira secreção é transparente, resultado da massagem nas glândulas vesiculares e logo em seguida ocorre eliminação do sêmen, graças a massagem nas ampolas. Touros em repouso sexual apresentam as ampolas mais túrgidas do que touros que tenham ejaculado recentemente (MILLER; EVANS, 1934).

Palmer et al. (2004) compararam o uso da EEJ e MTR na coleta de sêmen de taurinos jovens acostumados ao manejo em confinamento, onde a MTR pareceu ser tão eficaz quanto a EEJ. Porém, os autores recomendaram mais experimentos para determinar se a MTR seria uma alternativa confiável a EEJ quanto a coleta em touros não acostumados ao manejo de curral. Os autores obtiveram 97 % de resposta a MTR *versus* 99% com a EEJ no experimento.

Em outro estudo de Palmer et al. (2005) com touros de pastagem, o sêmen foi coletado por MTR em 80% dos touros adultos e 95% dos touros de 1 ano, ambos acostumados ao manejo intensivo. A porcentagem de espermatozoides móveis e vivos foi menor em amostras coletadas por MTR e pode ter afetado a classificação reprodutiva. A incapacidade de estimular a ereção com a MTR impediu o exame do pênis na maioria dos touros e contribuiu para amostras de sêmen de baixa qualidade.

Persson et al. (2007) compararam a qualidade do sêmen coletado por MTR e vagina artificial em taurinos jovens, em média com 15 meses de idade. As maiores diferenças ocorreram no volume, concentração por mL e na motilidade, sem diferença na morfologia espermática, demonstrando que é possível avaliar a espermiogênese de amostras colhidas pela MTR.

Ali (2014) comparou a exposição do touro a vaca em estro, ao uso de prostaglandina (PGF2 α) ou de GnRH antes da coleta com MTR. Os resultados mostraram que os três grupos tiveram maior motilidade, maior porcentagem de espermatozoides vivos e menor porcentagem de anormalidades em relação ao grupo controle. Sylla et al. (2015) compararam o uso da MTR e da vagina artificial em touros jovens de raças italianas de corte, demonstrando que a MTR é um método de fácil uso e de boa eficiência no exame andrológico, onde 83% dos touros produziram amostras aceitáveis para análise.

Vagina Artificial Interna

Em 2004, Barth et al. publicaram um estudo comparando o uso da vagina artificial interna (VAI) e a eletroejaculação para avaliação andrológica em touros de campo. Os resultados foram promissores para o uso do equipamento, porém, apresenta a desvantagem dos custos envolvidos, a necessidade de fêmeas manequins e um controle sanitário prévio para *Campylobacteriose* e *Tricomomose* nas fêmeas utilizadas para coleta. A vantagem é a avaliação da capacidade de monta dos touros, com baixo tempo de exposição (em torno de 5 minutos) por fêmea.

No Brasil, Cruz et al. (2011) testaram o uso da VAI no exame andrológico de touros Devon e Nelore. Neste estudo 86,5% (45/52) dos touros Devon aceitaram a monta no equipamento, sendo que destes animais 69% (31/45) foram considerados aptos nos aspectos andrológicos completos (sêmen mais monta). Os reprodutores restantes apresentaram problemas clínicos variados, que somente seriam percebidos na avaliação de comportamento sexual, demonstrando a importância do exame funcional. Porém, seu uso foi considerado inadequado para touros Nelores jovens (entre 20 e 30 meses), onde todos os animais testados não completaram a monta na manequim com a VAI adaptada, provavelmente devido ao seu comportamento sexual quiescente e atraso na maturidade sexual. Os autores recomendaram estudos adicionais para avaliar o desempenho da VAI em touros Nelore mais velhos.

Considerações finais

A capacidade de provocar desconforto e induzir a vocalização, causando elevação significativa da progesterona sérica sugere que pode existir a associação de dor com a eletroejaculação convencional. Entretanto, a ausência de aumento nos níveis plasmáticos de substância P após a EEJ indica que não há dor associada ao uso da técnica.

Várias alternativas à eletroejaculação foram avaliadas, entre elas a massagem transretal e o uso da vagina artificial interna. Todas oferecem certas vantagens, mas nenhuma delas é confiável como a EEJ para a obtenção de uma amostra de sêmen de boa qualidade. A MTR pode ser útil como alternativa a EEJ em touros dóceis e pode também ser usada antes da EEJ para reduzir o tempo de estimulação elétrica.

Para minimizar os efeitos do estresse de coleta, alguns protocolos devem ser adotados na tentativa de reduzir o desconforto do animal; no entanto, a atuação do veterinário é fundamental para que o animal não sofra durante a EEJ, aplicando estimulação elétrica da forma mais suave possível.

Referências

- ALI, M. Quality of semen collected by transrectal massage in bulls restrained in the presence of a cow. **International Journal of Development Research**, v. 4, n. 10, p. 2097-2099, 2014.
- BALL, L. Electroejaculation in bulls. In: TECHNICAL CONFERENCE OF ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 5th, 1974, **Proceedings...** Madison, USA: National Association of Animal Breeders, 1974, p. 95-100.
- BALL, L. Semen collection by electro-ejaculation and massage of the pelvic organs. Technical Conference of Artificial Insemination and Reproduction, 7th, 1978, **Proceedings...** NAAB, 1978, p.37-38.

- BARRETO, J.F.; MIES FILHO, A. A inseminação artificial em ovinos. **Boletim de Inseminação Artificial**, v. 1, n. 1, p. 5-72, 1944.
- BARTH, A. D.; ARTEAGA, A. A.; BRITO, L. F. C.; PALMER, C. W. Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 3-4, p. 315–325, 2004.
- BARTH, A. D. **Bull Breeding Soundness**, 3rd edition. Western Canadian Association of Bovine Practitioner, 162 p., 2013.
- CASE, C. Handling cases of sterility in practice. **Cornell Veterinarian**, v. 15, p. 37–45, 1925.
- CRUZ, F. B.; LOHN, L.; MARINHO, L. S. R.; MEZZALIRA, J. C.; GAUDENCIO NETO, S.; MARTINS, L.T.; VIEIRA, A. D.; BARTH, A. D.; MEZZALIRA, A. Internal artificial vagina (IAV) to assess breeding behavior of young *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 126, n. 3-4, p. 157-161, 2011.
- DZIUK, P. J.; GRAHAM, E. F.; PETERSON, W. E. The Technique of Electroejaculation and Its Use in Dairy Bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 37, n. 9, p. 1035-1041, 1954.
- EILER, H.; ARMSTRONG-BACKUS, C. S.; SMALLING, J. D. Effect of electroejaculation on progesterone and cortisol excretion in bovine semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 3, p. 492-495, 1987.
- ETSON C. J.; WALDNER, C. L.; BARTH, A. D. Evaluation of segmented rectal probe and caudal epidural anaesthesia for electroejaculation of bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 3, p. 235-240, 2004.
- ESTEBAN-GIL, A.; JACQUIET, P.; FLORENTIN, S.; DECAUDIN, A.; et al. Does bovine besnoitiosis affect the sexual function of chronically infected bulls? **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1325-1332, 2016.
- FALK, A.J.; WALDNER, C.L.; COTTER, B.S.; GUDMUNDSON, J.; BARTH, A.D. Effects of epidural lidocaine anesthesia on bulls during electroejaculation. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, n. 2, p. 116–120, 2001.
- MARDEN, W.G.R. New advances in the electroejaculation of the bull. **Journal Dairy Science**, v. 37, n. 5, p. 556-561, 1954.
- MARQUES FILHO, W.C.; FERREIRA, J.C.P.; FUJIHARA, C.J.; HEITMAN, F.J.; FERRAZ, M.C.; MONTEIRO, A.L.R.; MAZIEIRO, R.R.D.; MÁRTIN, I.; OBA, E. Avaliação do estresse em touros Nelore (*Bos taurus indicus*) submetidos à eletroejaculação. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 531-541, 2008.
- MARQUES FILHO, W.C.; FERREIRA, J.C.P.; FUJIHARA, C.J. Indicadores de bem-estar em touros Nelore submetidos à eletroejaculação. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 52-63, 2009.
- MASCARENHAS, H.; GOMES, W.V. Contribuição ao estudo da eletroejaculação em bovinos. Novo tipo de elétrodo bipolar e técnica de sua aplicação. **Instituto de Zootecnia**, v. 8, 1950.
- MILLER, F.; EVANS, E. Technique for obtaining spermatozoa for physiological dairy studies and artificial insemination. **Journal of Agricultural Research**, v. 48, p. 941–947, 1934.
- MOSURE, W.L.; MEYER, R.A.; GUDMUNDSON, J.; BARTH, A.D. Evaluation of possible methods to reduce pain associated with electroejaculation in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 39, n. 8, p. 504–506, 1998.
- PAGLIOSA, R.C.; DE ROSSI, R.; COSTA, D.S.; FARIAS, F.C. Efficacy of caudal epidural injection of lidocaine, xylazine and xylazine plus hyaluronidase in reducing discomfort produced by electroejaculation in bulls. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 77, n. 11, p. 1339–1345, 2015.
- PALMER, C.W.; AMUNDSON, S.D.; BRITO, L.F.C.; WALDNER, C.L.; BARTH, A.D. Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n. 3-4, p. 213-223, 2004.
- PALMER, C.W.; BRITO, L.F.C.; ARTEAGA, A.A.; SORDERQUIST, L.; PERSSON, Y.; BARTH, A.D. Comparison of electroejaculation and transretal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 1-2, p. 25-31, 2005.
- PALMER, C.W. Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 469-479, 2005.
- PERSSON, Y., STRID, G.; HAARD, M.; SOEDERQUIST, L. Comparison of semen samples collected from beef bulls by transrectal massage or artificial vagina. **Veterinary Record**, v. 161, p. 662–663, 2007.
- SALISBURY G. W.; VANDEMARK, N. L; LODGE. J. R. **Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle**. 2nd. ed. San Francisco: W.H. Freeman, 1978.

SEVERO, N. C. **História ilustrada da inseminação artificial**. São Paulo: Livre Expressão, 2013. 408 p.

STAFFORD, K. J. Electroejaculation: a welfare issue? **Surveillance**, v. 22, n. 2, p. 15-17, 1995

SYLLA L.; PALOMBI, C.; STRADAIOLI, G.; VAGNILUCA, A.; MONACI, M. Effect of semen collection by transrectal massage of accessory sexual glands or artificial vagina on the outcome of breeding soundness examinations of Italian yearling beef bulls. **Theriogenology**, v. 83, n. 5, p. 779-785, 2015.

WELSH, T.H.; JOHNSON, B.H. Stress-Induced Alterations in Secretion of Corticosteroids, Progesterone, Luteinizing Hormone, and Testosterone in Bulls. **Endocrinology**, v. 109, n. 1, p. 185-190, 1981.

WHITLOCK, B.K.; COFFMAN, E.A.; COETZEE, J.F.; DANIEL, J. A. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. **Theriogenology**, v. 78, n. 4, p. 737-746, 2012.

Exame do potencial de fertilidade de touro: apto ou inapto à reprodução é suficiente?

José Domingos Guimarães¹

Introdução

A crescente demanda por reprodutores bovinos de potencial genético melhorador comprovado tem aumentado de forma acelerada em nosso país. Atualmente, os rebanhos multiplicadores de genética comprovada não têm condições de atender a demanda atual. Quando consideramos que o rebanho nacional contém 40 % (84 milhões / 210.000.000 rebanho) das fêmeas em idades reprodutivas e que adotamos uma taxa de reposição anual de 20 % de touros (84 milhões / 25 vacas/touro = 4.200.000 touros x 0,20 = 840.000 touros), teríamos que ofertar anualmente, aproximadamente 840.000 reprodutores melhoradores geneticamente. Aproximadamente apenas 250.000 touros zebuínos são registrados anualmente pela ABCZ (Associação Brasileira de Criadores de Zebu) mais um pequeno percentual de animais que são avaliados por empresas privadas na área de Melhoramento Animal, validando o potencial genético dos reprodutores. Estes esforços resultam em diversos sumários com avaliações genéticas de diferentes rebanhos nacionais, proporcionando maior número de animais avaliados com informações a disposição dos produtores no momento das aquisições de reprodutores. Apesar da importância das Centrais de Inseminações Artificiais com oferta de sêmen de animais melhoradores, de origem nacional ou internacional, valores aproximados de 13 milhões de doses foram comercializados em 2016. Porém, esta biotécnica é empregada em menos de 10 % do rebanho bovino do Brasil.

Neste contexto, não há alternativa se não otimizar o potencial dos touros melhoradores já em uso. Para isso se torna necessário conhecer o potencial reprodutivo de cada um deles para que se realize o manejo reprodutivo adequado. Até o momento, a maneira exequível de obtermos estas informações se dá pelo exame andrológico, procedimentos estes já descritos e recomendados pelo órgão Federal (MAPA) e o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA.

Exame andrológico e emissão de laudos

O Certificado Andrológico é composto por quatro partes interligadas que se complementam no intuito de auxiliar o Médico Veterinário no diagnóstico e no laudo final. O primeiro consiste na identificação do animal e seus dados, identificação do proprietário e fazenda e o local onde os animais são criados. No segundo, composto pelas informações ou histórico reprodutivo e as informações clínicas, biométricas e comportamentais dos animais. A terceira é composta pelas informações sobre o método de coleta e as características físicas e morfológicas do sêmen. A última corresponde ao laudo médico.

Nesta última, no qual se refere ao tema desta palestra, as recomendações são para a emissão dos laudos sejam como **animais aptos ou inaptos à reprodução ou questionáveis**. Certamente, este procedimento se torna extremamente simples e claro para os proprietários dos animais, o entendimento da indicação médica para o destino funcional dos animais (esta apto ou inapto à reprodução). Os mesmos sempre reclamam ao médico veterinário, quando há uma descrição mais detalhada sobre os aspectos clínicos que os levaram a redigir o laudo, alegando não entender nada sobre as descrições contidas no laudo. Entretanto, este procedimento, embora bem explícito, traz poucas informações aos profissionais que têm acesso a esses laudos, em muitas situações não ficando claro o real motivo do descarte do animal. Da mesma forma, fica muito difícil o levantamento da casuística dos problemas que acometem a fertilidade dos animais. Além disso, essas informações norteiam os profissionais para tomarem decisões quanto a estratégia a ser tomada no manejo reprodutivo ou nas aquisições de novos reprodutores.

Neste momento, vale ressaltar que o referido Manual de Andrologia nos recomenda que salvo algumas patologias, o laudo de **inapto à reprodução** deve ser dado somente após o terceiro exame andrológico, intercalado por 60 dias, o que totaliza 180 dias. Esta prática normalmente não é adotada na rotina do campo, por problemas logísticos ou mesmo por tempo que levaria para alcançar este laudo final, tempo este, que muitas vezes, estaria além da estação de monta adotada no Brasil. Desta forma é muito comum o laudo definitivo ser feito no primeiro exame andrológico.

¹ Universidade Federal de Viçosa, MG

Neste ponto, devemos ressaltar novamente o déficit de reprodutores e que devemos otimizar o potencial dos touros que estão em uso.

Exame andrológico – anormalidades mais frequentes

Entre as anomalias mais frequentes que acometem os machos, podem se destacar as de origens **congênitas**: Hipoplasia testicular, aplasia segmentar dos ductos deferentes, criptoquirdismo, desvio do pênis lateral ou ventral, micropênis, pênis em saca rolha, fimose, parafimose, persistência do frênulo, pseudo-hemafrodita macho, hérnia escrotal. Estas anomalias levam ao descarte direto dos animais; e as anomalias **adquiridas**: fratura do pênis, abscessos em diferentes órgãos tubulares ou mesmo testicular, granuloma testicular ou epidídima, estase espermática, orquites e hidroceles, degeneração testicular. As primeiras anomalias levam ao descarte dos animais e as três últimas devem ser avaliadas quanto ao grau de comprometimento para que os animais sejam descartados.

Entre as anomalias citadas, certamente a **degeneração testicular** é a mais frequente entre os reprodutores no Brasil, provavelmente devido às condições edafoclimáticas registradas em nosso país, onde ocorrem grandes oscilações de temperatura, umidade relativa do ar e oscilações na oferta quali-quantitativa de forragens nas diferentes épocas do ano. No entanto, a frequência desta anomalia depende da capacidade de adaptação dos animais no qual são submetidos, o que difere entre indivíduos e raças, sendo um processo reversível ou irreversível, podendo ocasionar o descarte dos animais. A degeneração testicular se apresenta em diferentes graus de comprometimento no funcionamento das gônadas, refletindo em diferentes índices de anomalias espermáticas nos ejaculados, sendo os indicadores para avaliar a gravidade da degeneração, com subfertilidade ou infertilidade do animal, ocasionando ou não o descarte do animal. Portanto, é de suma importância a descrição de todas as anomalias espermáticas e a presença de células germinativas. Outras causas de descartes de touros no Brasil se referem ao **tamanho das gônadas e da libido**. O primeiro, sabidamente uma das características reprodutiva mais empregada em modelos matemáticos no Melhoramento Animal, pelo fato da mesma estar relacionada à precocidade sexual, além da produção espermática total e o número de ejaculados férteis por dia, propiciando otimizar a taxa touro: vaca na estação de monta. No entanto, merece uma reflexão quanto aos valores mínimos para se descartar um reprodutor. O rebanho comercial nacional em sua predominância é composto por animais das raças zebuínas, conhecidamente apresentam a curva de crescimento mais lenta que os animais de raças taurinas.

O mesmo acontece com as características reprodutivas entre as duas sub-espécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, com o crescimento gonadal e das glândulas sexuais acessórias mais lento ou tardio em animais zebuínos. Desse modo, os valores recomendados para a avaliação do perímetro escrotal em zebuínos são menores que os indicados para as raças taurinas nas diferentes faixas etárias. Neste ponto é que merece uma reflexão quanto ao objetivo dessa seleção aplicada aos animais para uso em monta natural e em rebanho comercial. Este rebanho que inicialmente tem por finalidade direcionada para produção de carne. Nas condições de manejo no Brasil, as raças zebuínas do rebanho comercial apresentam o crescimento mais lento, independente do seu potencial genético, porém, ao alcançar a idade reprodutiva, os mesmos apresentam longevidade no rebanho, sendo muito comum animais em idades avançadas (acima de 15 anos) com produção regular. Fato que demonstra grande adaptabilidade dos zebuínos às condições brasileiras. Estudos anteriores demonstraram que o crescimento testicular ocorre até idades bem avançadas (6 a 7 anos) quando alcançam seu potencial reprodutivo. Então devemos pensar se animais apresentando 28 cm de perímetro escrotal, aos 24 meses de idade, deveriam ser classificados como inferiores ou questionáveis, pois certamente poderão alcançar valores médios em faixas etárias mais avançadas, igualando seu potencial reprodutivo aos animais inicialmente classificados como superiores. Estes últimos, após alcançarem valores biométricos classificados como muito bons ou excelentes em idade muito precoce, reduzem drasticamente seu crescimento (crescimento diário), tornando-se muito lento, enquanto os primeiros (zebuínos) continuam apresentando boa taxa de crescimento. Além disso, se deve levar em consideração a proporção touro: vaca que os animais zebuínos serão submetidos na estação de monta. Estudos demonstram que o potencial reprodutivo dos touros nas condições de manejo reprodutivo empregado no Brasil, em sua maioria, não desafia a capacidade dos touros (proporção touro: vaca), o que possibilita o uso de touros que apresentam menor perímetro escrotal na sua faixa etária inicial, sem que haja comprometimento a fertilidade do rebanho. Ressalta-se que na escolha de reprodutores doadores de sêmen, não se aplica este raciocínio, pois neste caso, além do potencial de transmissão da precocidade sexual da progênie, há a questão do número de doses a serem comercializadas. O que esta diretamente relacionada à produção espermática total/diária.

Entre as biotécnicas aplicadas na avaliação do sêmen *in vitro* se pode citar: bioquímica do plasma seminal, proteômica do plasma seminal, uso de sondas fluorescentes para estudos de viabilidade do acrossôma e da membrana plasmática, estabilidade de membrana plasmática, potencial de bainha mitocondrial e fragmentação do DNA e os aspectos físicos e morfológicos do sêmen por meio de programas para análises computadorizadas (CASA). Não há dúvidas que todas essas técnicas têm propiciado grandes conhecimentos sobre as anomalias espermáticas, principalmente, quando as mesmas são submetidas aos diferentes protocolos de criopreservação, ou na busca de

melhores meios diluidores para o resfriamento ou a criopreservação de sêmen em diferentes espécies (animais de produção ou de conservação de espécies ameaçadas de extinção). Além disso, nos permitem estudar sêmen, classificados como excelentes pelas análises convencionais, porém na avaliação por meio dos testes complementares, identifica-se diferentes populações de células espermáticas quanto a sua viabilidade, destacando àquelas com baixo potencial de fecundação. Contudo as correlações fenotípicas ou mesmo genética destas características até o momento, se mostram muito baixa com os parâmetros reprodutivos *in vivo*. Neste ponto, vale a reflexão quanto à extrapolação desses resultados obtidos *in vitro* com os resultados *in vivo*. Se as correlações genéticas e as fenotípicas das características reprodutivas são muito baixas, devem ser incluídas nos programas de seleção? Se estas características são de baixa herdabilidade, o que estamos passando para a progênie? Há sem dúvida, casos hereditários, ou mesmo a retenção de genes com baixa penetrância e baixa expressividade? Então não valeria a pena a definição de reprodutores para uso no rebanho comercial e rebanho multiplicadores? Não deveríamos atribuir maior peso para as características produtivas para uso em rebanho comercial? E atribuir aos rebanhos multiplicadores a aplicação de maior intensidade de seleção genética para as características reprodutivas?

A **libido** é outro aspecto que possui frequência relativamente alta entre as causas de descarte de touros. Neste aspecto, uma reflexão deve ser feita. Em quais condições foram realizadas as avaliações da libido. Os animais zebuínos exteriorizam os sinais fisiológicos da libido tal como os animais taurinos, em testes convencionais? Sabidamente, nos estudos efetuados no Brasil demonstraram que os animais zebuínos apresentam menor libido que os animais taurinos, quando avaliados nas mesmas condições de protocolo, originando diferentes tabelas de classificações da libido. Porém, diversos estudos demonstram que quando avaliados com metodologias diferentes aos testes aplicados aos taurinos, principalmente, em condições de pastagens ou piquetes, em detrimento aos testes feitos em currais, obtém-se resultados semelhantes para a libido. Além disso, quando se elevou o tempo de avaliação, resultados de classificação da libido, passaram a serem comparados aos valores atribuídos aos animais taurinos, com a aprovação dos animais testados. Estudos feitos tanto com reprodutores taurinos e zebuínos demonstraram que o número de montas completas efetuadas em uma fêmea no estro é em média de 1,5 a 2 montas. Portanto, estas sub-espécies apresentam comportamento semelhantes quanto as montas efetivamente férteis nas condições tropicais.

Vale ressaltar ainda a distinção entre baixa libido e desvio de comportamento sexual. A forma de manejo dos animais tem grande contribuição quanto ao comportamento sexual. Estudos anteriores demonstraram como o comportamento de dominância alteram o comportamento sexual dos animais subordinados. Estes aspectos têm sido desprezados em grande maioria dos rebanhos, onde a homogeneização dos touros no manejo múltiplo não é considerada, principalmente na introdução de novos reprodutores no rebanho, deixando que os animais se resolvam entre si. Tal conduta resulta naturalmente em baixos resultados na produção. A padronização desses grupos de manejo múltiplo se mostra de grande importância no manejo reprodutivo, visto que, a interação entre os reprodutores permite que grupos de fêmeas sejam acasaladas por diferentes touros no mesmo estro. Estudos têm mostrado que mesmo em condições extensivas e áreas territoriais muito grandes, fêmeas são acasaladas por diferentes touros no mesmo estro, fato que garante boas taxas de prenhez nos rebanhos.

Embora seja um dos principais fatores de descarte nos exames andrológicos em bovinos, o teste da libido ainda tem que ser mais difundido entre os rebanhos brasileiros, sendo mais aplicado atualmente em rebanhos classificados como rebanhos multiplicadores, mas muito pouco em rebanhos comerciais. Uma das justificativas mais relatadas se deve ao fato da logística para a execução destes testes, onde se dispõem grande número de funcionários na manipulação dos animais, além do longo tempo de teste e o pequeno número de animais testados/dia. No entanto, se devem buscar alternativas para as observações da libido, tais como, a observação do comportamento sexual dos animais no início da estação reprodutiva, quando se observa naturalmente grande número de fêmeas no estro. Tal procedimento tem sido bem sucedido na classificação da libido dos reprodutores.

Apesar dessas ocorrências nas avaliações andrológicas, se deve considerar a ação da seleção natural sobre a característica da libido. O fato dos animais do rebanho comercial serem desde o início, criados em manejo extensivo, os animais de baixa libido deixaram poucos ou nenhum produto durante sua permanência no rebanho, resultando até o momento, baixo percentual de animais de baixa libido em animais zebuínos e até mesmo em animais taurinos, salvo aqueles com distúrbios de comportamento sexual, ocasionados pelo manejo inadequado.

Exame andrológico – aspectos físicos e morfológicos

Outro aspecto que se deve considerar são os laudos inaptos à reprodução por razões de **aspectos físicos** do ejaculado e **aspectos morfológicos** dos espermatozoides. Os primeiros, os mais frequentes entre todos os animais inaptos à reprodução, merece grande reflexão. Em sua maioria, os exames andrológicos são realizados nos meses de julho a outubro, período que coincide com os meses de pior oferta quali-quantitativa de forragens e um período longo após a última estação de monta (4 a 7 meses), sendo comum desta maneira o repouso sexual. Desta forma, é muito comum que os aspectos físicos do ejaculado se mostrem com valores muito baixos nas primeiras coletas de sêmen,

sendo restabelecidas imediatamente após algumas ejaculações consecutivas em intervalos curtos. Neste contexto, na prática é pouco usual o procedimento de varias coletas em intervalos curtos em mesma sessão de coleta, ficando os animais para reavaliação em intervalos de 30 ou 60 dias, no qual essas características podem persistir e resultarem no descarte dos animais pelos aspectos físicos desfavoráveis. Até o momento, os procedimentos de coletas sucessivas e intervalos curtos na mesma sessão tem se mostrado eficiente no restabelecimento dos valores normais dos aspectos físicos do sêmen, sem provocar nenhum dano físico ou comportamental ao animal. Vale ressaltar que apesar do conceito de repouso sexual não seja consensual entre os pesquisadores, este procedimento tem permitido que o diagnóstico fosse feito numa mesma sessão de coleta, sem a necessidade de retorno para a reavaliação e que esta condição de repouso não ocorre na estação de monta pela frequência de vacas em estro e intensa atividade sexual dos animais.

As **patologias espermáticas** estão diretamente relacionadas à capacidade fecundante do sêmen, sendo preconizados valores mínimos aceitáveis para patologias totais, defeitos maiores e defeitos individuais. Neste contexto, sempre houve a preocupação na propagação dessas patologias no rebanho, principalmente pelo risco do caráter hereditário, com a persistência das mesmas nos rebanhos. Isto levaria danos irreversíveis, principalmente para os rebanhos multiplicadores de genética superior. No entanto, muitas das patologias já descritas podem estar presentes no sêmen em condições que não estejam relacionadas às condições genéticas e sim como consequência de fatores de condições de manejo ou condições fisiológicas temporariamente inadequadas à reprodução. Esta definição se torna essencial para a decisão de descarte do animal. Portanto, quando na presença de elevados índices de anomalias espermáticas, estando acima dos valores recomendado, antes de tomar a decisão de descartar um touro em uma única avaliação morfológica dos espermatozoides, se devem verificar quais as possibilidades do quadro seminal ser reversível ou não, se o tempo de recuperação é longo ou curto, se há necessidade de uso terapêutico ou simplesmente mudar o manejo do animal, ou que o restabelecimento da qualidade seminal irá ocorrer assim que as condições ambientais tornarem-se favoráveis a atividade reprodutiva.

Considerações finais

Neste contexto, estudos têm identificados efeitos compensatórios na fertilidade em presença de algumas patologias no sêmen, provavelmente em função da elevada concentração espermática apresentada em um ejaculado. No entanto, não podemos esquecer a probabilidade desta conduta manter determinadas patologias no rebanho, e se a atividade funcional do rebanho esta destinada à produção de carne ou multiplicadora de genética animal, como também na fertilidade do rebanho em questão (taxa de prenhez e taxa de nascimento).

Na prática, se têm observado o uso dos valores preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal/MAPA como classificatórios (regra) e não como valores de referências (norteiar), cabendo aos profissionais médicos veterinários relacionar os achados clínicos no exame andrológico com a fertilidade potencial do reprodutor na ocasião em questão.

Diante do exposto, acredita-se que os laudos andrológicos definindo apenas **animais aptos ou inaptos à reprodução ou mesmo questionáveis** mostram-se pouco informativo, principalmente quanto à importância de respaldo clínico reprodutivo e como documento para o levantamento da casuística das anomalias que acometem a reprodução do macho.

Referências

- AMANN, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal Andrology**, v. 10, p. 89-98, 1989.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa State University Press, 1989, 285 p.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, p. 621-628. 2003.
- BERGMANN, J. A. G. Seleção de zebuínos para precocidade sexual. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 1., 1999, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999, p.51-64.
- BRUSCHI, J. H. **Estabelecimento da função reprodutiva em tourinhos mestiços europeu x zebu**. 1991. 125f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 2. ed. Belo Horizonte. 1998. 49p.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3. ed. Belo Horizonte, 2013.
- COSTA e SILVA, E. V. **Capacidade reprodutiva de touros Nelore: Exame andrológico, teste de comportamento sexual e desafio de fertilidade**. 1994. 102 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.
- EASTON, T. G.; VALINSKY, J. E.; REICH, E. Merocyanine 540 as a Fluorescent Probe of Membranes: Staining of Electrically Excitable Cells. **Cell**, v. 13, p. 475-486. 1978.
- FONSECA, V. O., VALE FILHO, V. R., MIES FILHO, A. ABREU, J.J. Procedimento para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1992, 79p.
- FONSECA, V. O. **Efeito da concentração e da morfologia espermática sobre a taxa de gestação de vacas zebus (*Bos taurus indicus*)**. 1994. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte, MG.
- FONSECA, V. O.; FRANCO, C. S.; BERGMANN, J. A. G. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) acasalados com elevado número de vacas. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v. 49, p. 53-62, 1997.
- FRENEAU, G. E. **Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos Holandeses e mestiços Holandês-Gir desde os seis aos 21 meses de idade (Puberdade e pós-puberdade)**. 1991. 194p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- GUIMARÃES, J. D. **Puberdade e maturidade sexual em touros da raça Gir criados em condições semi-extensivas**. 1993. 85f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- GUIMARÃES, J. D. Maximização de touros a campo. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 1,1999, Viçosa, MG. **Anais**. Viçosa, MG Universidade Federal de Viçosa, 1999, p. 279-295.
- GRIVEAU, J. F.; LE, L. D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, p. 61-69. 1997.
- GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247. 2001.
- HAFEZ, E. S. E. & HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri, SP: Manole, 2004. 513p.
- HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, p. 1122-1136. 2006.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Animal Reproduction**, v. 88, p. 343-352. 1990.
- PINEDA, N. R. Provas de desempenho sexual, importância econômica e genética. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 20, p. 112-120, 1996.
- PINEDA, N. R.; FONSECA, V. O.; PROENÇA, R.V. Potencial reprodutivo de touros de alta libido da raça (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p. 45-48, 1997.
- SIQUEIRA, J. B. **Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática “in vitro”**. 2004. 77p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- VALE FILHO, V. R. **Patologia do Sêmen, Diagnóstico Andrológico e Classificação de *Bos Taurus* e *Bos taurus indicus* quanto à fertilidade para uso como reprodutores em condições de Brasil**: De um estudo em 1088 touros. 2. ed. UFMG, 1980. 54p.
- VAN CAMP, S. D. Bull Infertility. The Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice**. v.13, n. 2. p. 195-366, 1997.

Princípios da eletroejaculação

Gerson Duarte Metzker Filho¹

Introdução

Eletroejaculação e a vagina artificial são, provavelmente, as técnicas de colheita de sêmen mais empregadas (HAFEZ, 2004). Por motivos de praticidade, o uso do eletroejaculador torna-se mais vantajoso. Métodos alternativos como a *massagem das ampolas* do ducto deferente, vagina artificial e preservativo de fêmeas para a obtenção de amostras resultam em dificuldades semelhantes quando se trata de um grande volume de animais e a eletroejaculação continua sendo o método mais confiável para a obtenção de amostras de sêmen (PALMER et al., 2004), podendo ser usada em uma grande variedade de espécies domésticas e silvestres.

História

A história da eletroejaculação começa em 1022 com Bartelle citado por Gunn, 1936, publicando o primeiro relato do uso de eletro-ejaculador em cobaias para a coleta de sêmen. Em 1936, Gunn usou eletroejaculação para a colheita de sêmen de carneiros. A sonda retal foi produzida com eletrodos circulares em forma de anéis e estes constituíam um único polo, sendo que, o outro contato era feito através de um eletrodo em forma de agulha e introduzido na região lombar do animal (Figura 1). Laplaud e Cassou (1945) aplicaram a primeira sonda retal com eletrodos bipolares e Thibault (1948) modificou esta sonda para o uso em touros. A sonda de Thibault continha 30 anéis de latão, isolados uns dos outros, por ébano e polarizado por uma corrente alternada de 60 Hertz (Hz), que podia ser variada de 0 a 30 Volts a aproximadamente 700 miliamper (mA). Em 1950, os brasileiros Mascarenhas e Gomes publicaram o trabalho intitulado: "Contribuição ao estudo da eletro-ejaculação em bovinos". Relataram um grande número de colheitas de sêmen com o uso da estimulação elétrica. Eles também empregaram a sonda retal bipolar multianéis, e defenderam que o tipo de onda na forma de impulso de corrente elétrica foi superior ao fluxo senoidal.

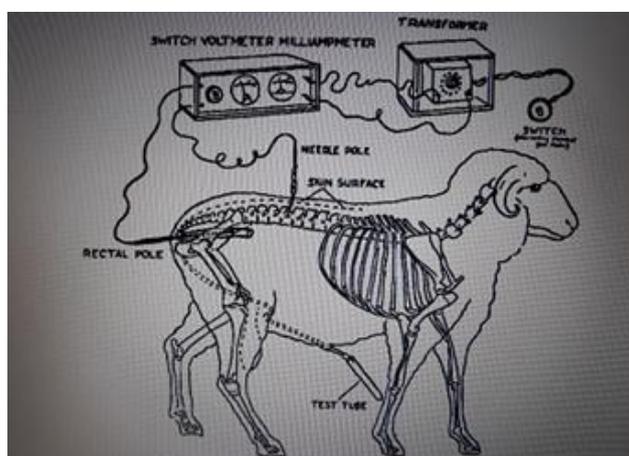


Fig. 1 – Diagrama do processo utilizado por Gunn (1936).

Marden (1954), demonstrou resultados bem-sucedidos, quando empregou uma sonda de plástico contendo quatro eletrodos longitudinais separados 90° e ligados em pares alternados. O mesmo descreve que a forma de onda e a frequência eram críticas na produção do ejaculado. Enquanto as ondas senoidais na faixa de frequência de 12 a 70 Hz produziram prontamente ejaculação em touros, o autor aplicou um máximo de 5,5 Volts (V) e mencionou uma corrente de 700 mA em uma impedância variando de 7 a 16 Ohms para uma corrente de excitação máxima.

¹ Duboi Indústria e Comércio Artefatos Pecuária Ltda, Campo Grande, MS

Descrição

Eletroejaculadores são equipamentos eletrônicos construídos com a função de estimular os nervos simpáticos e parassimpáticos da pelve com oscilações ou pulsações de tensão e amperagem relativamente baixa para induzir a exposição peniana e subsequente liberação do sêmen (BALL, 1986).

O conjunto é formado, basicamente, por um excitador e uma sonda retal. A alimentação é feita por bateria ou rede elétrica. Podem ser operados manualmente ou por sistemas automáticos. A maioria dos animais (touro) ejacula com voltagens e correntes menores que 9 V e 0,4 A, respectivamente.

Para sua utilização, a sonda é introduzida no reto do animal que em contato com as glândulas acessórias, via tecido do reto, transfere descargas elétricas de baixa intensidade que vão estimular estas glândulas a secretarem o plasma seminal, além de estimular a inervação parassimpática, desencadeando o mecanismo de ejaculação como um todo.

Excitadores

A função primordial do excitador é fornecer a corrente elétrica que irá produzir as contrações peristálticas da musculatura lisa do epidídimo, ducto deferente e uretra em conjunto com o estímulo síncrono das glândulas sexuais acessórias.

Os excitadores utilizados em ruminantes fornecem correntes elétricas de forma senoidal ou quadrada (pulsante) com frequência que varia de 20 a 100 Hz. Esta energia é entregue ao animal através de sondas bipolares com intervalo de 1 a 5 segundos seguido de um intervalo de descanso de mesmo valor. Tal protocolo irá produzir a ejaculação em até 2 minutos, em média.

A maioria dos eletro-ejaculadores atuais fornecem uma tensão máxima de 12 volts. Normalmente a ejaculação é estimulada começando com ajuste de tensão mais baixa, em torno de três volts e aumentando gradualmente até que esta ocorra.

A estimulação deve ser sempre contínua não permitindo uma pausa muito longa, pois esta afetará, significativamente, a exposição peniana.

A impedância na região de contato entre o eletrodo da sonda e o tecido do reto, para correntes alternadas ou pulsativas, constitui um parâmetro elétrico importante. A impedância elétrica é formada por componentes capacitivos, indutivos e resistivos. Para o estudo da eletroejaculação, apenas o componente resistivo é levado em consideração, visto que a reatância capacitiva é infinitamente pequena e a indutiva praticamente não exista. A corrente elétrica circulante depende diretamente da voltagem aplicada (lei de Ohm) já que a impedância, apesar de variar de animal para animal, é praticamente constante, variando de 12 a 19 ohms nos animais (touro) analisados. Já a forma de onda da corrente aplicada, seja senoidal ou quadrada, não se mostra relativamente importante para o efeito da eletroejaculação.

Ondas elétricas

As formas de ondas mais empregadas no processo da eletroejaculação são: quadrada, pulsativa e senoidal. Com relação ao ejaculado, todas as formas de ondas se apresentam eficazes e têm pouco efeito sobre as características do sêmen. Existem vários estudos a respeito deste assunto desde Gunn (1936) até os dias de hoje. As formas de onda estão diretamente ligadas à sensibilidade do animal, em que a onda pulsada mais estreita com frequências em torno de 30 Hz se assemelha a onda senoidal com frequência de 60 Hz produzindo reações de menor intensidade nos touros. Em geral as ondas de forma senoidal apresentam uma reação mais discreta, mas não significativas, quando comparadas às ondas quadradas e pulsativa se observadas: a respiração, a pulsação e as contrações musculares durante o processo.

Sondas

As sondas comerciais mais antigas possuíam eletrodos em forma de anel, isto é, eletrodos circulares que envolvem todo o diâmetro da sonda. Neste caso, os eletrodos estimulam outros nervos além dos necessários para a eletroejaculação. Assim, os nervos localizados na região dorsal são estimulados, resultando em fortes contrações dos músculos das pernas, coxas e costas. Há de se ressaltar que, guardado as devidas proporções, no touro, durante a ejaculação natural, são observadas contrações musculares generalizadas (HAFEZ, 2004) tal qual a atividade muscular observada durante a eletroejaculação. A figura 2 mostra alguns dos primeiros modelos de sondas utilizados.

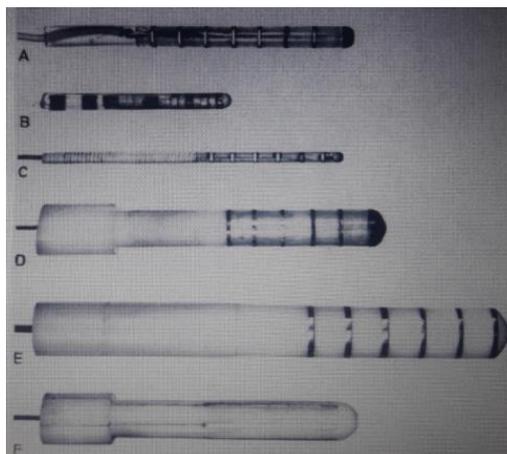


Fig. 2 - Sondas com eletrodos em forma de anel.

Fonte: Healey e Sadleir (1966)

Para reduzir efeitos musculares, as sondas atuais têm eletrodos longitudinais instalados em um terço da circunferência. Estes eletrodos concentram a estimulação elétrica na área onde os tecidos e nervos relevantes estão localizados com menor estimulação de nervos motores que fornecem estímulos aos músculos esqueléticos. Esta modificação no projeto das sondas diminuiu significativamente a intensidade da resposta física à estimulação elétrica, necessitando menor intensidade de corrente. É por isso que o posicionamento e a orientação, corretos, da sonda são importantes. A figura 3 mostra uma sonda de eletrodos paralelos longitudinais.



Fig. 3 - Sonda com eletrodos longitudinais paralelos.

Fonte: Elaborado pelo autor

Existem diferentes tamanhos de sondas para os diferentes tamanhos de animais. O diâmetro, peso, e o número de eletrodos influenciam diretamente no processo. Por isso, para obter-se melhores resultados é importante escolher o tamanho adequado da sonda para um perfeito contato elétrico entre o eletrodo e o tecido, transmitindo melhor o estímulo para os nervos e músculos. A prática tem mostrado que para animais de até 700 quilos, sondas com diâmetros de 7 a 7,5 centímetros produzem um bom contato e conseqüentemente um bom ejaculado. Já para animais maiores, sondas de 8 a 9 centímetros são recomendadas, visto que, em touros grandes, a sonda pode não atingir as áreas corretas para a estimulação.

Considerações finais

O processo de eletroejaculação vem evoluindo com o passar do tempo. A forma de onda pode interferir, discretamente, na sensibilidade do animal e características do sêmen. Todas as formas de onda apresentadas, respeitadas as devidas faixas de frequência, resultam em um ejaculado. A maior diferença encontrada foi com relação às sondas. Sua forma deve ser capaz de reduzir a estimulação dos músculos não necessários à ejaculação. Sondas com eletrodos dispostos longitudinalmente e posicionados em um terço da circunferência da mesma são mais eficientes. Isto se deve ao fato deste tipo de configuração transferir a corrente elétrica de excitação diretamente à região desejada. Com relação a intensidade de corrente, esta é diretamente proporcional à quantidade de tensão aplicada.

Referências

- BALL, L. Electroejaculation. In: KLEMM, W. R. (Ed). **Applied electronics for veterinary medicine and animal physiology**. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1986. p. 395-441.
- GUNN, R. M. C. **Fertility in Sheep**: artificial production of seminal ejaculation and the characters of the spermatozoa contained therein. Melbourne: Government Printer, 1936. 114p. Bulletin (Council for Scientific and Industrial Research (Australia)).
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ªed. São Paulo: Manole, 2004. 582 p.
- HEALEY, P; SADLEIR, R.M.F.S, The construction of rectal electrodes for electro-ejaculation. **Journal Reproduction Fertility**, v.11, p. 299-301, 1966
- LAPLAUD, M.; CASSOU, R. Nouveau procédé de récolte du sperm par électrode bipolaire rectal unique. **Comptes rendus Hebdomadaires des Seances de l'Académie des Sciences de Paris**, p. 31- 37, 1945.
- MARDEN, W. G. R. New advances in the electroejaculation of the bull. **Journal of Dairy Science**, v. 37, n.5, p. 556, 1954.
- PALMER, C. W; AMUNDSON, S. D.; BRITO, L. F.; WALDNER, C. L.; BARTH, A. D. Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n. 3-4, p. 213-223, feb. 2004.
- THIBAUT, C, LAPLAUD, M.; ORTAVANT, R. L'électro-éjaculation chez le Taureau, technique et résultats. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, p. 226- 2006,1948.

Variáveis metodológicas na avaliação do movimento espermático

André Maciel Crespilho¹

Introdução

Em resposta à crescente necessidade de padronização dos procedimentos relacionados à análise de qualidade espermática, em 1980 a Organização Mundial da Saúde (WHO) publicou a primeira versão do manual para avaliação laboratorial do sêmen humano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Ao longo das últimas décadas esse mesmo manual recebeu novas edições, sofrendo revisões e atualizações necessárias, em consonância ao avanço dos conhecimentos técnicos e científicos na área de andrologia humana.

Embora a andrologia animal vivencie um período de extremo desenvolvimento científico e tecnológico voltado ao maior entendimento dos processos fisiológicos que regem a produção, transporte e maturação de gametas, servindo como base estrutural para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para otimização do potencial de fertilização de espermatozoides, ainda não se observa o mesmo grau de organização e padronização técnica da andrologia humana. Questões relacionadas aos métodos de preparação seminal para análise de espermática, valores mínimos de referência para os diferentes testes conduzidos laboratorialmente e procedimentos padrão operacionais para garantia da qualidade na condução e interpretação dos resultados das análises de sêmen ainda não possuem consenso entre profissionais e instituições envolvidas na análise e manipulação do sêmen animal.

Nesse contexto, os tópicos abaixo ilustram alguns dos fatores que podem comprometer a acurácia e a interpretação dos achados da análise do movimento de espermatozoides de mamíferos domésticos, com enfoque na avaliação de sêmen bovino criopreservado.

Qualidade e padronização das análises de sêmen nas Centrais

O controle de qualidade é fundamental para as Centrais de Processamento de Sêmen (CPS), responsáveis pelo abastecimento do mercado interno e externo com material genético bovino (VINCENT et al, 2012). Embora existam recomendações quanto aos testes e padrões mínimos de qualidade que devem ser respeitados não apenas pelos estabelecimentos comerciais produtores de material genético, como também pelos médicos veterinários envolvidos na área de análise de sêmen criopreservado (CBRA, 2013), diversos estudos apontam para a falta de padronização na condução dos exames e na adoção dos padrões mínimos de qualidade esperados para uma dose de sêmen congelado. Com o objetivo de investigar quais os testes e limites mínimos de qualidade adotados para cada método empregado no controle de qualidade das partidas de sêmen congelado no Brasil, Crespilho et al. (2009) enviaram questionários técnicos às principais CPS bovino do país. Embora técnicas clássicas de avaliação da qualidade espermática, como o percentual de defeitos espermáticos totais ou motilidade total pós-descongelamento não sejam utilizadas de forma unânime pelas CPS pesquisadas, o estudo apontou uma grande heterogeneidade nos valores mínimos de referência adotados para o controle de qualidade espermática. De acordo com a pesquisa, pode-se observar uma grande variação nos valores mínimos aceitáveis e adotados por cada estabelecimento para o percentual de células móveis totais (30% a 70%) e progressivas (25% a 70%), concentração mínima de espermatozoides por dose (6 a 30×10^6) e resultados de motilidade após teste de termorresistência (15% a 30%) entre as diferentes Centrais consultadas, demonstrando um expressivo coeficiente de variação (CV) que gera incertezas quanto à qualidade do material genético disponível comercialmente no país.

Em recente estudo conduzido por Brito (2016) foi observado grande CV intra e inter laboratórios para análise cinética, de concentração e de defeitos espermáticos para as mesmas partidas de sêmen quando encaminhadas para diferentes centros especializados na análise de sêmen bovino no Brasil e nos USA. De acordo com a pesquisa, diferenças da ordem de 30% para motilidade, $\pm 30 \times 10^6$ espermatozoides por palheta e $\pm 15\%$ para a proporção de espermatozoides normais foram observadas quando comparadas às análises das mesmas partidas de sêmen conduzidas em replicatas intra e inter laboratórios. De acordo com o autor, a precisão (ou falta dela) varia

¹ Universidade Santo Amaro, Unisa, SP; Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ; VetSemen – Análise de Sêmen para Inseminação Artificial, Barueri, SP

consideravelmente e, em parte, pode ser justificada pela grande variação nos métodos empregados para análise do sêmen e pela falta de padronização das metodologias para calibração dos equipamentos laboratoriais.

Análise subjetiva vs análise computadorizada (CASA) dos espermatozoides

Embora pouco dispendiosa, de rápida e simples execução, a análise subjetiva do movimento espermático em microscopia de luz apresenta baixa acurácia e repetibilidade entre diferentes técnicos e laboratórios, dificultando a estimativa do potencial de fertilidade de uma amostra espermática. Mesmo quando envolve profissionais treinados e com formação continuada em avaliação laboratorial da qualidade espermática, coeficientes de variação entre 10 a 15% podem ser observados para a estimativa da motilidade total e progressividade quando as mesmas amostras de sêmen são avaliadas por diferentes técnicos (BRASIL et al, 2004).

Em virtude das limitações encontradas para a estimativa do padrão de movimento espermático através de análises subjetivas, nos últimos 15 anos foram desenvolvidos e implementados sistemas automatizados para análise computadorizada de sêmen, com o objetivo de agregar objetividade e fornecer dados acurados a respeito do movimento de cada espermatozoide de uma amostra (MATOS et al, 2008).

Fontes de variação na análise computadorizada do movimento espermático (CASA)

A CASA permite que múltiplos parâmetros de movimento desempenhado por cada espermatozoide de uma amostra possam ser objetivamente analisados através de um software computacional. Embora a técnica agregue maior precisão e repetibilidade para análise espermática quando comparada à avaliação subjetiva de movimento, diversas fontes de variação podem comprometer a obtenção dos resultados e estabelecimento de conclusões baseadas na CASA.

Temperatura de análise

A temperatura com que o sêmen é analisado representa um importante fator que pode comprometer os resultados da CASA. De acordo com revisões de Vincent et al. (2012), estudos independentes e contemplando diferentes espécies indicaram influencia negativa sobre os diferentes parâmetros do movimento espermático para amostras avaliadas sob temperatura abaixo de 37°C.

Câmara empregada para a análise cinética

Se por exemplo considerarmos as dimensões da cabeça de um espermatozoide bovino (8 a 10µm de comprimento, área entre 28 a 30 µm), torna-se provável supor que a profundidade da câmara em que as avaliações de movimento são realizadas pode comprometer a estimativa do movimento espermático. Comparando diferentes metodologias para avaliação do movimento de espermatozoides bovinos Bastos et al (2015) observaram que amostras analisadas entre lâmina e lamínula de vidro apresentaram menor percentual de motilidade total, velocidade, índice de oscilação e amplitude lateral de cabeça em relação às mesmas partidas de sêmen avaliadas em câmara de Makler (altura de 20µm). Tais diferenças podem ser justificadas pela pressão exercida pela lamínula sobre a amostra de sêmen, interferindo negativamente na expressão de movimento da célula espermática. Dessa forma, a câmara de análise deve ser profunda o suficiente para que o padrão de motilidade de uma amostra seja corretamente avaliado (MATOS et al, 2008).

Concentração de espermatozoides e diluição das amostras de sêmen previamente à CASA

De acordo com revisões específicas sobre CASA, a maior parte dos equipamentos disponíveis comercialmente avaliam com acurácia amostras de sêmen que possuem entre 20 a 50x10⁶/ml (BRAZIL et al, 2004). No entanto, especificamente para o sêmen bovino criopreservado no Brasil, comumente se praticam doses inseminantes entre 20 a 40x10⁶ células totais por palheta, determinando alta densidade celular por campo de análise. Dessa forma, se torna imperativo à diluição do sêmen previamente à CASA. Nesse contexto, Salgado et al (2015) observaram a influencia significativa da diluição do sêmen bovino previamente a CASA para garantir maior acurácia na determinação da linearidade e motilidade progressiva. No entanto, até o presente não existe uma definição clara na literatura sobre qual o melhor meio a ser utilizado para diluição do sêmen bovino previamente à análise cinética. Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de influência negativa desse procedimento sobre a integridade e motilidade total de espermatozoides em função de possíveis choques osmóticos relacionados à diluição, o que certamente gera muitas dúvidas em relação a essa importante etapa da análise espermática.

Equipamentos

A precisão na avaliação cinética e de concentração espermática pode ser inferior para CASA em relação a qualquer outro método de avaliação empregado (incluindo a avaliação subjetiva), na dependência da qualidade do equipamento

(BRITO, 2016). Dessa forma, a escolha e calibração dos equipamentos voltados à análise computadorizada do sêmen são fundamentais para correta obtenção e interpretação das informações relativas à cinética espermática.

Considerações finais

Para que possamos avançar na área de análise de sêmen animal torna-se imperativo definir técnicas, metodologias, equipamentos, procedimentos padrão operacionais e valores mínimos de qualidade para o sêmen, de acordo com as particularidades da célula espermática de cada espécie doméstica.

Referências

- BASTOS, Y.H.G.B.; SILVA, C.F.; DINELLI, M.V.; et al. Influência da câmara de análise nos resultados da avaliação computadorizada do movimento espermático. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 21, 2015, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2015.
- BRAZIL, C.; SWAN, S.H.; TOLLNER, C.R.; et al. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. **Journal of Andrology**, v. 25, p.645-656, 2004.
- BRITO, L. A multilaboratory study on the variability of bovine semen analysis. **Theriogenology**, v.85, p.254–266, 2016.
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; MARTINS JUNIOR, A.; DELL'AQUA JUNIOR, JA. Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers (SCPC) evaluate the quality of commercialized samples? **Veterinaria e Zootecnia**, v.16, n.2, p.335-342, 2009.
- MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p. 225-232, 2008.
- SALGADO, A.M.; GOMES, G.M.; GOMES, L.P.M.; PEIXOTO JUNIOR, K.C.; CRESPILHO, A.M. Sêmen bovino congelado em palhetas de 0,25 ml deve ser previamente diluído para correta avaliação computadorizada do movimento espermático. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 21, 2015, Santos, SP. **Anais...** Santos: CBRA, 2015.
- VINCENT, P.; UNDERWOOD, S. L.; DOLBEC, C.; BOUCHARD, N.; KROETSCH, T.; BLONDIN, P. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.153-165, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction**. 4th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1999. 136 p.

A eficácia dos testes *in vitro* de sêmen para prever o sucesso da prenhez após a inseminação artificial na cadela

Marcelo Carvalho dos Santos¹, Amanda de Ascensão Rocha¹, Célia Raquel Quirino¹, Isabel Cândia Nunes da Cunha^{1*}

Resumo: Em muitas espécies, incluindo o cão (*Canis familiaris*), os protocolos de análise do sêmen melhoraram nos últimos anos. A avaliação *in vitro* da qualidade do sêmen fornece informações importantes. No entanto, o parâmetro final para determinar a qualidade do sêmen é o resultado da prenhez. O estudo foi conduzido com objetivo de investigar a eficiência dos testes da viabilidade espermática *in vitro* na predição da qualidade seminal em cães, correlacionando esses resultados com o sucesso de prenhez após a inseminação artificial (IA). Quarenta e oito amostras de sêmen refrigerado por 24, 48 ou 72 h foram examinadas quanto à motilidade espermática e motilidade progressiva, integridade da membrana e capacidade de ligação à zona pellucida antes de serem usadas para inseminar as cadelas. Os resultados indicaram correlações positivas entre o sucesso da prenhez e motilidade espermática (0,77), vigor (0,72), integridade da membrana (0,72) e ligação à zona de peleína (0,81). O sucesso da prenhez e as características do sêmen diminuíram com o aumento do tempo de armazenamento. Em conclusão, as características do sêmen avaliadas neste estudo podem ser usadas para prever o potencial de concepção de amostras de sêmen no cão.

Palavras-chave: Sêmen Refrigerado. Avaliação de fertilidade. Canino.

The efficacy of *in vitro* sperm tests in predicting pregnancy success after artificial insemination in the bitch

Abstract: In many species, including the dog (*Canis familiaris*), semen analysis protocols have improved in recent years. *In vitro* assessment of semen quality provides important information; however, the ultimate parameter for determining semen quality is pregnancy outcome. The objective of the present study was to investigate the efficiency of *in vitro* sperm tests in predicting seminal quality in dogs by correlating those results with pregnancy success after artificial insemination (AI). Forty-eight semen samples refrigerated for 24, 48 or 72 h were examined for sperm motility and progressive motility, membrane integrity, and zona pellucida-binding capacity before being used to artificially inseminate bitches. Results indicated positive correlations between pregnancy success and sperm motility (0.77), vigor (0.72), membrane integrity (0.72) and zona pellucida-binding (0.81). Both pregnancy success and the sperm characteristics declined with increased semen storage time. In conclusion, the semen characteristics evaluated in this study can be used to predict the conception potential of semen samples in the dog.

Keywords: Semen Refrigerated. Fertility assessment. Canine.

Introdução

A qualidade do sêmen é indicada pela motilidade e vigor espermáticos, integridade da membrana plasmática e acrossomal, morfologia, integridade do DNA das células espermáticas e habilidade destas se unirem e fertilizar os oócitos. No entanto, as taxas de prenhez ainda são os melhores indicadores da capacidade de fertilização, mas a relação entre as características do sêmen e o potencial de fertilização continua controversa (SILVA et al., 2011). A microscopia tem sido a técnica padrão para avaliar a motilidade e vigor; No entanto, sua subjetividade pode levar a resultados imprecisos, assim, métodos alternativos para avaliar a qualidade do sêmen foram propostos. Testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a capacidade de fertilização do sêmen canino foram padronizados para aumentar a precisão. Esses métodos permitem a avaliação de várias características funcionais do espermatozoide, como ligação, penetração e fertilização do oócito (HEWITT, INGLATERRA, 2001). Uma vez que muitos dos parâmetros avaliados por ensaios *in vitro* não estão associados à real capacidade de fertilização dos espermatozoides, a prenhez continua sendo o parâmetro mais confiável para o teste de diferentes procedimentos de manuseio e armazenamento de sêmen (AMMAN; HAMMERSTEDT, 1993). No entanto, testes de fertilidade *in vivo* são difíceis de conduzir em canídeos. Isso ocorre porque as cadelas têm um ciclo estral longo e um grande número de fêmeas seria necessário para avaliar a qualidade do sêmen e o potencial de concepção (EILTS, 2005). O estudo foi conduzido com o objetivo de: 1)

¹ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 28035-200, Goytacazes, Rio de Janeiro.

* cunhaicn@gmail.com

investigar a correlação do sêmen canino avaliado por testes *in vitro* e taxa de prenhez; e 2) comparar as amostras de sêmen de fertilidade utilizadas após serem recém-diluídas ou resfriadas durante 24, 48 ou 72 h.

Material e Métodos

Foram utilizados seis cães machos adultos, saudáveis, com idade entre 1,6 e 4,6 anos como doadores de sêmen. Utilizamos 48 fêmeas adultas de 2,3 a 4,9 anos. Todos os animais foram de criadores comprovados. As raças eram Bulldog inglês, Bulldog francês, Pug, Poodle, Yorkshire Terrier e Chowchow. O mesmo macho foi usado em diferentes momentos do experimento para inseminação artificial de diferentes fêmeas (repetições do mesmo grupo de tratamento). As cadelas foram divididas em quatro grupos, dependendo do método de inseminação: sêmen fresco (CG), sêmen refrigerado por 24 h (G24), 48 h (G48) e 72 h (G72). As 48 cadelas selecionadas para inseminação estavam saudáveis e já tiveram pelo menos uma cria. A estimulação manual do pênis foi realizada para coletar a fração de sêmen rica em espermatozoides. Os parâmetros avaliados foram: motilidade (%); vigor (0 a 5) e concentração espermática. A integridade da membrana foi analisada pelo teste hiposmótico. Teste de ligação à zona - Os oócitos foram recuperados a partir de ovários obtidos imediatamente após a cirurgia. No laboratório, os ovários foram lavados em PBS e os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram liberados cortando o córtex do ovário. Os oócitos com grau de qualidade 1 foram lavados e transferidos para uma placa de petri contendo 95 µL de gotas de meio Talp FIV. Cada gota continha 10 oócitos e foi coberta com óleo mineral (Sigma®) e mantida na incubadora (38°C, 5% de CO₂) durante 1h. A cada gota, foram adicionados 100 µL de sêmen (a 2×10^6 espermatozoides/mL de meio de cultura) e incubados (38°C, 5% de CO₂) durante 18h. Os oócitos foram examinados sob um microscópio de contraste de fase com ampliação de 10x para contar o número de espermatozoides ligados à zona pelúcida. Um escore de 0 a 3 foi utilizado para avaliar a ligação: 0 = não vincutivo; 1 = 5 a 25 ligações, 2 = 26 a 50 ligações, 3 = mais de 51 ligações. Resfriamento de Sêmen - A ejaculação de cada cão foi diluída em um meio contendo leite desnatado e glicose e dividido em 2 alíquotas de 2 mL. A concentração de sêmen foi de 200×10^6 espermatozoides/mL. Uma alíquota foi utilizada para os testes laboratoriais e a outra para inseminar as cadelas de acordo com os tratamentos (sêmen fresco ou sêmen refrigerado por 24, 48 ou 72 h). Ciclo estral e monitoramento da gestação - A Inseminação Artificial (AI) foi realizada para cada animal. Os grupos de tratamento foram os seguintes: sêmen fresco diluído (grupo controle, CG); Sêmen refrigerado por 24 (G24); 48 (G48); E 72 h (G72). O diagnóstico de gestação foi realizado por ultra-sonografia 21 dias após o diestrus. As fêmeas gestantes foram novamente examinadas aos 35 e 55 dias de gestação e foram monitoradas durante o trabalho de parto e determinaram o tamanho da ninhada. Análise estatística: motilidade, vigor e integridade da membrana espermática, e tamanho da ninhada foram analisados utilizando o PROC GLM do pacote SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2009), ajustando o seguinte modelo linear $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$; Onde Y_{ij} são as características do sêmen e os valores de tamanho da ninhada; μ são os grupos de tratamento (grupo de controle (CG), sêmen refrigerado por 24 h (G24), 48 h (G48) e 72 h (G72)) e ϵ_{ij} o erro associado a cada parâmetro. Os meios e os desvios-padrão foram obtidos e o teste Student-Newman-Keuls ou SNK foi utilizado para comparações de médias. O nível de significância do tratamento foi de $p < 0,05$. As correlações entre as características foram estimadas usando um PROC CORR. Frequências para cada nível dos escores da ligação da zona pelúcida com a taxa de prenhez foram analisados utilizando o PROC FREQ / chisq.

Resultados e Discussão

Tanto os resultados de motilidade e vigor espermáticos, integridade de membrana e sucesso de prenhez pelo teste de ligação da zona pelúcida diminuíram com o aumento do tempo de armazenamento do sêmen (Tabela 1). Das 48 cadelas inseminadas, 34 engravidaram. Os valores médios foram 72% para a motilidade, 3 para o vigor e 68% para integridade de membrana das amostras de sêmen. Observou-se correlação positiva entre teste de ligação da zona pelúcida e sucesso da fertilização ($p < 0,05$). Os achados no presente estudo indicam uma correlação entre os resultados de testes *in vitro* de qualidade do sêmen e sucesso da gestação (tabela 1). No presente estudo, os escores de integridade da membrana espermática foram correlacionados com os resultados de prenhez. Conforme relatado anteriormente, o dano da membrana está associado a baixa capacidade de fertilização (BRITO et al., 2003), provavelmente porque compromete o reconhecimento do oócito e a ligação de espermatozoides à zona pelúcida. O espermatozoide deve funcionar adequadamente para conseguir interação satisfatória com o oócito. Sabe-se que as membranas são ricas em ácidos graxos poli-insaturados e, portanto, muito suscetíveis à peroxidação lipídica, o que provoca perda de funcionalidade parcial ou total (MONTEIRO et al., 2009). Neste estudo, os oócitos utilizados em testes de ligação à zona pelúcida foram homólogos e frescos, obtidos após a remoção de ovário das cadelas doadoras. Este teste de ligação é um método confiável para avaliar a qualidade espermática e tem a vantagem de ser mais rápido do que os testes de fertilização *in vitro*, que requerem períodos de incubação longos. Teste do início dos anos 2000 sugerem que os testes de ligação de zona pelúcida em oócitos previamente preparados podem ser usados para avaliar diferentes métodos de tratamento do sêmen, como os efeitos da refrigeração do sêmen sobre a capacidade de fertilização dos espermatozoides caninos. Os resultados obtidos em ensaios de ligação à zona

pelúcida confirmaram a eficácia deste teste, demonstrando que os índices de ligação estão associados aos resultados da prenhez. Resultados semelhantes foram observados em bovino, onde os testes de penetração da zona e os testes de penetração espermática realizados utilizando oócitos homólogos foram considerados indicadores fortes da fertilidade *in vivo* (VILLA et al., 2001). No presente estudo, os escores de integridade da membrana espermática foram correlacionados com os resultados de prenhez. Conforme relatado anteriormente, o dano da membrana está associado a baixa capacidade de fertilização (BRITO et al., 2003), provavelmente porque compromete o reconhecimento de oócitos e a ligação de espermatozoides à zona pelúcida. Os resultados apresentados neste estudo indicam que a motilidade e o vigor do esperma, a integridade da membrana e os escores de ligação à zona estão relacionados ao sucesso da gravidez no cão doméstico. Os testes *in vitro* podem, portanto, ser usados para prever o potencial de fertilização do sêmen canino.

Tabela 1. Número de amostras (N) e valores obtidos nas avaliações seminais para motilidade espermática, integridade da membrana plasmática, teste de ligação da zona pelúcida e média (μ) e desvio padrão (DP) do tamanho da ninhada para diferente tempo de refrigeração do sêmen canino (24, 48 e 72 h). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Tratamento	Cães (N)	Motilidade (%)	Vigor (escore)	Integridade (%)	Ligação ZP (escore)	Prenhez (%)	Tamanho da ninhada ($\mu \pm DP$)
IA com semen fresco	12	97,09 ^a	4,66 ^a	96,00 ^a	3,00 ^a	100 ^a	5,75 \pm 1,4 ^a
IA com semen refrigerado por 24h	12	70,00 ^a	3,00 ^a	71,17 ^a	2,33 ^a	100 ^a	4,58 \pm 0,67 ^b
IA com semen refrigerado por 48h	12	44,58 ^b	2,33 ^b	31,00 ^b	0,83 ^b	83 ^a	1,42 \pm 0,79 ^c
IA com semen refrigerado por 72h	12	17,92 ^c	1,00 ^c	13,50 ^c	0 ^c	0 ^b	0 \pm 0 ^d

Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

O processo de refrigeração do sêmen durante 48 e 72h interfere direta e negativamente na qualidade do sêmen e nas taxas de prenhez em cadelas inseminadas. A taxa de gestação diminui ao usar sêmen refrigerado a partir de 48h. O tamanho da ninhada obtido com sêmen fresco foi maior do que quando se utilizou sêmen refrigerado por 48h. Os testes realizados *in vitro* (motilidade e vigor espermáticos, funcionalidade da membrana e teste de ligação da zona pelúcida) têm correlação positiva com a taxa de prenhez em cadelas inseminadas com sêmen fresco e refrigerado.

Referências

- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 6, p. 397-406, 1993.
- BRITO, L. F. C.; BARTHA, A. D.; BILODEAU-GOESELSB, S.; PANICHB, P. L.; KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1539-1551, 2003.
- EILTS, B. E. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 685-691, 2005.
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. Manipulation of canine fertility using in vitro culture techniques. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 111-125, 2001.

MONTEIRO, J. C.; GONÇALVES, J. S.; RODRIGUES, J. A.; LUCIO, C. F.; SILVA, L. C.; ASUMPÇÃO, M. E. Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 359-362, 2009.

SILVA, T. F.; REIS, N. A.; SILVA, A. O. A.; SOUSA, J. S.; SANTOS, R. C. Utilização do teste hiposmótico como indicador do potencial de fertilidade do sêmen congelado de touros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 19., 2011, Recife, PE. **Anais...** Recife, PE: CBRA, 2011.

VILLA, R. A.; FERNANDES, M. B.; ACCORSI, M. F.; GALERANI, M. A.; LOBO, R. B. Avaliação da fertilidade in vitro do sêmen congelado de touros da raça Caracu. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 390-392, 2001.

Análise computadorizada do sêmen de queixada (*Tayassu pecari*) com SCA®: dados preliminares

Celso Henrique Souza Costa Barros¹, Renan Luiz Albuquerque Vieira¹, William Morais Machado¹, Thaise da Silva Oliveira Costa¹, Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho¹, Paola Pereira das Neves Snoeck^{1*}

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de avaliar as características do movimento dos espermatozoides de queixada utilizando o *Sperm Class Analyser* (SCA®). Foram usados cinco machos entre 4 e 7 anos de idade. Os machos foram submetidos à coleta de sêmen por eletroestimulação utilizando um protocolo de sedação com xilazina e quetamina. Antes da anestesia, os animais passaram por jejum hídrico. Apenas dois machos ejacularam. O volume foi inferior a 0,3 mL, com alta concentração, motilidade total superior a 70% e motilidade progressiva superior a 38%.

Palavras-chave: Espermatozoide. Características do Movimento. *Tayassu pecari*.

Computer assisted semen analysis of peccary (*Tayassu pecari*) with SCA®: preliminary data

Abstract: The aim of the study was to evaluate motion characteristics of peccary sperm using *Sperm Class Analyser* (SCA®). Five males between 4 and 7 years of age were used. Males were collected by electroejaculation using an anesthesia protocol with xylazine and ketamine. Before anesthesia, animals were submitted to water and food fasting. Only two males ejaculated. The volume was below 0.3 mL, with high concentration, total motility greater than 70% and progressive motility greater than 38%.

Keywords: Sperm. Motion Characteristics. *Tayassu pecari*.

Introdução

O queixada (*Tayassu pecari*) está na família que inclui outras duas espécies, o cateto (*Tayassu tajacu*) e o taguá (*Catagonus wagneri*), conhecidos genericamente como pecaris. São também conhecidos como porcos do mato, porém, não pertencem à família Suidae, a qual é representada pelo javali e o porco doméstico (SILVA, 2006). Sua distribuição vai desde o sul do México até o nordeste da Argentina (DEUTSCH; PUGLIA, 1990). A espécie encontra-se em declínio ao longo de sua vasta área de ocorrência geográfica. Em regiões de grandes extensões contínuas de floresta intacta, como é o caso da Floresta Amazônica, sua sobrevivência está ameaçada pela alta pressão de caça de subsistência (KEUROGHLIAN et al., 2013). Enquanto em outras regiões, como nos remanescentes da Mata Atlântica do sudeste do Brasil, a fragmentação do habitat tem sido a principal causa de extinção de queixadas, bem como a diminuição de populações de pecaris (CULLEN et al., 2000). A ausência destes animais afeta a manutenção das florestas em razão da sua atuação na dispersão de sementes e plântulas (PAINTER, 1998). Devido à importância desta espécie para a manutenção das florestas (TICKTIN, 2003), é preciso estabelecer práticas que reduzam seu declínio populacional o que levou a mesma a ser classificada como vulnerável pela União Internacional para Conservação da Natureza (KEUROGHLIAN et al., 2013). No criatório científico da UESC, a nutrição dos queixadas é bastante estudada (NOGUEIRA-FILHO et al., 1999, 2014) embora sejam identificados alguns gargalos para reprodução dessa espécie em cativeiro. Populações pequenas e isoladas resultam em endogamia, reduzindo a heterose, reprodução e sobrevivência (GOTARDI, 2012). Por isso, o uso do sêmen de reprodutores de outros rebanhos pode minimizar os efeitos negativos da endogamia. Objetivou-se estudar o sêmen de queixada e descrever a cinética espermática por meio do *Sperm Class Analyser*® (SCA®).

¹ Universidade Estadual de Santa Cruz, 45662-900, Ilhéus, Bahia.

* paolasnoeck@gmail.com

Material e Métodos

Os procedimentos experimentais realizados foram submetidos à avaliação pelo Comitê de Ética na Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) de acordo com o protocolo 031/16. O estudo foi realizado no período de fevereiro a abril de 2017 no Laboratório de Etologia Aplicada (LABET; 14°47'39.8 "S, 39°10'27.7"W) e no Laboratório de Reprodução Animal da UESC, Ilhéus, Bahia, Brasil. Cinco machos foram submetidos à coleta de sêmen por meio de eletroestimulação. Antes da coleta de sêmen, todos os machos passaram por jejum hídrico de 6 horas e alimentar de 12 horas. No momento da coleta, cada macho era capturado individualmente com auxílio de puçá, pesado e submetido ao protocolo de sedação com xilazina (2 mg/ Kg) e anestesia dissociativa com uso de quetamina (5mg/kg), ambos administrados pela via intramuscular. A xilazina era aplicada 10 minutos antes da quetamina e a eletroestimulação era iniciada 5 minutos depois da aplicação do último fármaco. A coleta de sêmen foi realizada seguindo o protocolo de eletroestimulação com estímulos crescentes: 10 repetições intercalando 3 segundos de estímulo e 3 segundos de descanso com o amperímetro em 50 mA, 10 repetições em 100 mA, 10 repetições em 150 mA e subindo gradativamente até atingir 500 mA com auxílio de um eletroejaculador (Eletojet®, Eletrovet, São Paulo, Brasil). A eletroestimulação não durou mais de 10 minutos. O ejaculado coletado era avaliado de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas, depois era acondicionado em banho-maria à 37° C para avaliação da cinética espermática por meio de análise computadorizada de sêmen (SCA®, v.5.2.01, Microptic S.L., Barcelona, Espanha). Foi utilizada a configuração do software para suíno: área da partícula entre 10 e 80 µm²; VCL: Lento > 10 µm/s e < 25 µm/s, Médio >25 µm/s e < 45 µm/s e Rápido > 45 µm/s; progressivo > 45% de retilinearidade; circular < 50% de linearidade. Uma gota de 5µL de sêmen era colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecida, sendo a cinética espermática avaliada após análise de cinco imagens digitalizadas consecutivas obtidas de diferentes campos. Os parâmetros mensurados foram: Motilidade Total (MT-%); Motilidade Progressiva (MP-%); Velocidade Curvilínea (VCL- µm/s); Velocidade Linear Progressiva (VSL-µm/s); Velocidade Média do Trajeto (VAP-µm/s); Percentual de espermatozoides Rápidos; Médios; Lentos; Linearidade (LIN-%); Retilinearidade (STR -%); Index de oscilação (WOB -%); Amplitude do deslocamento Lateral de Cabeça (ALH-µm); Frequência de Batimento de Cauda (BCF-Hz) e Hiperativos (%).

Resultados e Discussão

Dos cinco animais coletados, apenas dois ejacularam, embora nossos resultados sejam compatíveis com os descritos na literatura (MOREIRA et al., 2005; CASTELO et al., 2010), que relatam sobre a dificuldade de ajustar o protocolo anestésico e de eletroestimulação para a coleta de sêmen desta espécie e de animais da mesma família. Além disso, é descrito que o uso de xilazina ou fármacos da classe alfa – 2 – adrenérgico podem interferir na concentração espermática final ou proporcionarem maior estímulo na inervação das glândulas anexas, bem como favorecer a ejaculação retrógrada durante a ejaculação (TECIRLIOGLU et al., 2002).

Tabela 1. Cinética espermática de queixadas avaliada pelo SCA®. Motilidade Total (MT-%), Motilidade Progressiva (MP-%), Rápidos (%), Médios (%), Lentos (%), Velocidade Curvilínea (VCL- µm/s), Velocidade Linear Progressiva (VSL-µm/s), Velocidade Média do Trajeto (VAP-µm/s), Linearidade (LIN-%), Retilinearidade (STR -%), Index de Oscilação (WOB -%), Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça (ALH-µm), Frequência de Batimento de Cauda (BCF-Hz) e hiperativos (HIPER - %).

Parâmetros	Queixada 1	Queixada 2
MT (%)	76,0	83,0
MP (%)	38,1	42,4
Rápidos (%)	39,4	61,7
Médios (%)	21,4	11,3
Lentos (%)	14,9	10,1
VCL (µm/s)	38,6	64,7
VSL (µm/s)	12,1	24,8
VAP (µm/s)	20,0	50,9
LIN (%)	31,3	38,3
STR (%)	60,3	48,7
WOB (%)	51,8	78,6
ALH (µm)	2,3	2,2
BCF (Hz)	6,6	7,2
HIPERATIVOS (%)	7,3	2,0

Fonte: Elaborado pelos autores.

O ejaculado do animal 1 e 2 apresentou as seguintes características: volume 0,2 e 0,3mL; coloração branco acinzentado e marfim, ambos com aspecto leitoso e concentração de $2,9 \times 10^9$ e 800×10^6 de espermatozoides por mL, respectivamente. Os resultados encontrados diferem do encontrado na literatura para queixada (MOREIRA et al., 2005), pois obtivemos um volume inferior, uma concentração mais elevada e não foi possível coletar a fração gel conforme descrito. A cinética espermática está apresentada na (Tabela 1). A porcentagem de motilidade obtida está um pouco mais alta do que a motilidade avaliada por meio de análise subjetiva (MOREIRA et al., 2005). Vale ressaltar que utilizamos o software para análise de sêmen de suíno e não sabemos se o espermatozoide do queixada possui as mesmas características morfométricas, o que pode comprometer esta análise.

Conclusões

Foi possível estudar as características do movimento espermático do queixada usando o SCA®. No entanto, será importante o estudo da morfometria da cabeça dos espermatozoides do queixada para validar o software de suíno como adequado para avaliar a cinética espermática desta espécie.

Agradecimentos

Ao funcionário do LABET, Deni, pelo apoio fundamental no manejo dos animais. Ao Prof. Dr. Rodrigo Freitas Bittencourt pelo empréstimo do eletroejaculador.

Referências

- CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S. B.; SOUZA, A. L. P.; MOREIRA, M. A. P.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 1060-1065, 2010.
- CULLEN JUNIOR, L.; BODMER, R. E.; PADUA, C. V. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. **Biological conservation**, v. 95, n. 1, p. 49-56, 2000.
- DEUTSCH, L. A.; PUGLIA, L. R. R. **Animais silvestres: proteção, doenças e manejo**. 2. ed. São Paulo: Globo, 1990. 191 p.
- GOTARDI, Mariana Sayuri Tanaka. **Caracterização da diversidade genética em queixadas (*Tayassu pecari*) e catetos (*Pecari tajacu*) isolados em um fragmento florestal**. 2012. 42 f. Monografia (Graduação em Ecologia) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, Rio Claro.
- KEUROGHLIAN, A.; DESBIEZ, A.; REYNA-HURTADO, R.; ALTRICHTER, M.; BECK, H.; TABER, A.; FRAGOSO, J. M. V. *Tayassu pecari*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2013.
- MOREIRA, N.; ERDMANN, R. H.; DELGADO, L. E. S.; PACHALY, J. R.; CIFFONI, E. M. G.; HATAMOTO, L. K. Coleta de sêmen e avaliação andrológica de queixada (*Tayassu pecari*). In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SILVESTRES, 9.; ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SILVESTRES, 14., 2005, São José do Rio Preto, SP. **Anais...** São José do Rio Preto, SP: UNIRP, 2005. p. 67.
- NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; BORGES, R. M.; MENDES, A.; DIAS, C. T. S. Nitrogen requirements of white-lipped peccary (Mammalia, Tayassuidae). **Zoo biology**, v. 33, n. 4, p. 320-326, 2014.
- NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. C.; SATO, T. A estrutura social de pecaris (*Mammalia, Tayassuidae*) em cativeiro. **Revista de Etologia**, v. 1, n. 2, p. 89-98, 1999.
- PAINTER, R. L. E. **Gardeners of the forest: plant-animal interactions in a neotropical forest ungulate community**. 1998. 248 f. Thesis (Ph.D. of Animal Biology) - University of Liverpool, Liverpool, England.
- SILVA, R. W. A. **Avaliação da variabilidade genética em *Tayassu tajacu* (cateto) e *Tayassu pecari* (queixada) por meio da utilização de marcadores microsatélites**. 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- TECIRLIOGLU, R. T.; HAYES, E. S.; TROUNSON, A. O. Semen collection from mice: electroejaculation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, n. 6, p. 363-371, 2002.

TICKTIN, T. Relationships between El Niño Southern Oscillation and demographic patterns in a substitute food for collared peccaries in Panama. **Biotropica**, v. 35, n. 2, p. 189-197, 2003.

Análise do ejaculado de touros da raça Nelore (*Bos indicus*) de alta e baixa resistência espermática à criopreservação

Mariana Furtado Zorzetto^{1*}, Erika Aline Ribeiro Dias², Fabio Morato Monteiro², Camila de Paula Freitas Dell'Aqua¹, Cláudia Cristina Paro de Paz², Edson Guimarães Lo Turco³, Thaís Regiani Cataldi⁴, Fabiana Ferreira de Souza¹, Frederico Ozanam Papa¹, Eunice Oba¹

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de avaliar as diferenças nos parâmetros espermáticos da ejaculação de touros da raça Nelore, resistentes e suscetíveis a lesões pelo processo de criopreservação. Foram utilizados os ejaculados de 15 touros Nelore, com idade entre 3 e 6 anos. Os animais foram divididos em dois grupos, de acordo com a motilidade espermática e integridade da membrana plasmática, grupo A com baixa resistência espermática para a criopreservação e grupo B com alta resistência espermática para a criopreservação. As análises cinéticas foram avaliadas por Análise Computadorizada do Sêmen (CASA), a integridade da membrana plasmática por microscópio de epifluorescência e o índice de caspase ativado, a peroxidação lipídica e integridade da membrana plasmática e acrossomal por citometria de fluxo. Não houve diferença entre os grupos das análises realizadas pela citometria de fluxo.

Palavras-chave: Bovino. Citometria de fluxo. Sêmen.

Analysis of the ejaculate of bulls of the Nelore breed (*Bos indicus*) of high and low sperm resistance to cryopreservation

Abstract: The objective of this study was to evaluate the differences in sperm parameters of the ejaculate of bulls of the Nelore breed, resistant and susceptible to injuries due to cryopreservation. The ejaculates of 15 Nelore bulls, aged between 3 and 6 years, were used. The animals were divided into two groups according to sperm motility and plasma membrane integrity, group A with low sperm resistance to cryopreservation and group B with high sperm resistance to cryopreservation. Kinetic analyzes were performed by Computer Assisted Semen Analysis (CASA), plasmatic membrane integrity by epifluorescence microscopy and activated caspase index, lipid peroxidation and plasma membrane integrity and acrosomal membrane by flow cytometry. There was no difference between the groups for the analyzes performed by flow cytometry.

Keywords: Bovine. Flow cytometry. Semen.

Introdução

A perda de viabilidade dos espermatozoides após o processo de congelação está relacionada principalmente a ruptura na membrana plasmática (WHITE, 1993). Estudos sugerem que os espermatozoides de cada espécie possuem diferentes propriedades criobiológicas, bem como apresentam variação quanto à sensibilidade e tolerância osmótica à congelação (KATKOV; MAZUR, 1999; PHELPS et al., 1999). Os procedimentos de congelação e descongelação acarretam quedas da fertilidade quando comparada àquela do sêmen a fresco. Existem touros que apresentam baixa resistência espermática à congelação seminal. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as diferenças nos parâmetros espermáticos do ejaculado de touros da raça Nelore, resistentes e sensíveis às injúrias decorrentes da criopreservação.

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 18618-687, Botucatu, São Paulo.

² Centro APTA Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, 14160-900, Sertãozinho, São Paulo.

³ Universidade Federal de São Paulo, 04023-062, São Paulo, São Paulo.

⁴ Universidade de São Paulo, 13400-970, Piracicaba, São Paulo.

* mary-zorze@hotmail.com

Material e Métodos

Foram utilizados 15 touros da raça Nelore, com idade entre 3 e 6 anos. Os touros foram mantidos à pasto em piquetes constituído de capim braquiária (*Brachiaria brizantha*), sal e água ad libitum. A colheita do sêmen foi realizada com eletroejaculador (Autojac®, Neovet®, Uberaba, Brasil). Os animais utilizados no experimento foram submetidos a uma colheita de sêmen. O ejaculado foi diluído em meio convencional (Botu-Bov®, Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil) na concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. O envase foi realizado manualmente em palhetas francesas de 0,5 mL, posteriormente foram colocadas a 5°C em refrigerador digital (Minitub®, Alemanha) durante 4 horas. Após a refrigeração, as palhetas foram acondicionadas em caixa isotérmica com capacidade de 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido até a marca de 3,0 cm de altura. Desta forma, as palhetas ficaram dispostas horizontalmente a 3,0 cm do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos e, após este período, foram imersas no mesmo (PAPA et al., 2008). O sêmen foi descongelado à 37°C por 30 segundos em banho-maria e analisado quanto a cinética espermática (Análise Computadorizada do Sêmen - CASA), integridade da membrana plasmática (microscópio de epifluorescência), índice de caspase ativado, peroxidação lipídica e integridade da membrana plasmática e acrossomal (citometria de fluxo). Após as avaliações pós-descongelamento, os animais foram divididos em dois grupos conforme a qualidade espermática e utilizando o intervalo de confiança realizado pelo SAS INST., INC, Cary, NC: grupo A, touros com baixa resistência ao processo de congelamento do sêmen ($n=6$), os quais apresentam motilidade total (MT) e integridade de membrana plasmática < 30% e grupo B, touros com alta resistência ao processo de congelamento do sêmen ($n=9$), apresentando MT e integridade de membrana plasmática > 50% após a descongelamento. Tanto o sêmen fresco quanto o descongelado foram avaliados pelo sistema computadorizado de cinética espermática (CASA, IVOS, Versão 14, Hamilton-Throne Bioscience®, Beverly, USA). Para esta análise uma alíquota de 10 μ L da amostra foi depositada em câmara de Makler (Makler Counting ChamberR, Sefi-Medical Instruments Ltda., Haifa, Israel) pré-aquecida a 38°C. A análise foi realizada pelo programa Animal Motility, com escolha automática e padronizada de cinco campos de leitura sendo avaliado no mínimo 1000 células/amostra. Foram consideradas as variáveis: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, μ m/s), velocidade progressiva (VSL, μ m/s) velocidade curvilínea (VCL, μ m/s) e percentagem de espermatozoides rápidos (RAP, %). A avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides (IMP%, espermatozoides viáveis) foi realizada antes e após a congelamento do sêmen (HARRISON; VICKERS, 1990). As análises de citometria de fluxo foram realizadas apenas nas amostras descongeladas. O equipamento utilizado foi BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW; vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm. Os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v6.1. Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal foram utilizadas as sondas iodeto de propídio e FITC-PSA, associadas ao Hoechst 33342 (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2012). Quanto ao índice de caspase ativada foi utilizado a associação de FITC-VAD-FMK com PI e H33342. A peroxidação lipídica foi avaliada utilizando a sonda C11-BODYPY associada ao H3342 (GUASTI et al., 2012). Os dados obtidos de cinética espermática, citometria de fluxo e microscopia de epifluorescência foram submetidos à análise estatística pelo PROC MIXED (SAS INST., INC, Cary, NC) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%.

Resultados e Discussão

Os valores de MT ($24,89 \pm 2,40^a; 68,17 \pm 1,91^b$), MP ($22,83 \pm 3,14^a; 57,00 \pm 2,56^b$) e RAP ($24,67 \pm 2,82^a; 63,67 \pm 2,30^b$) apresentaram diferença no momento pós-congelamento entre os animais do grupo com baixa (A) e alta (B) resistência a congelamento, respectivamente. As análises realizadas pela citometria de fluxo do sêmen pós-congelamento estão apresentadas na (Tabela 1). Não houve diferença entre os grupos para IMP e acrossomal, caspase ativada e peroxidação lipídica. Paasch et al. (2004) observaram caspases ativas (caspases 1, 3, 8, e 9) no espermatozóide de humanos, e que a criopreservação levou ao aumento do número de células com essas caspases ativas. Ainda esses mesmos autores concluíram que as caspases 1, 3, 8 e 9, representam as principais vias para que ocorra o processo da apoptose e estão presentes no sêmen humano. A avaliação da peroxidação lipídica pode ser utilizada como indicador do estresse oxidativo celular. Diferente dos resultados encontrados no presente estudo, Ramires Neto (2015) avaliando a peroxidação lipídica em garanhões *Bad e Good Freezer* observou que os animais *Bad Freezer* apresentaram maiores índices de peroxidação lipídica e espécies reativas de oxigênio em células íntegras em relação aos *Good Freezer*.

Tabela 1. Médias ajustadas e erro padrão das características: membrana plasmática e acrossomal íntegras (MPAI), iodeto de propídio negativo e caspase negativa (PI-CASP-) e peroxidação positiva (PER+) no momento pós-descongelamento do sêmen entre os grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) no sêmen de touros Nelore. *Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

Variáveis	Grupos	
	Grupo A N=6	Grupo B N=9
MPAI (%)	26,57±4,50 ^a	33,22±3,68 ^a
PI-CASP- (%)	26,45±2,98 ^a	25,58±2,43 ^a
PER+ (%)	29,70±5,90 ^a	23,84±4,82 ^a

Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

Não houve diferença na integridade da membrana plasmática e acrossomal, caspase ativada e peroxidação lipídica entre os touros com alta e baixa resistência espermática à criopreservação.

Agradecimentos

A Bolsa Capes e o Centro APTA Bovino de corte, Instituto de Zootecnia, Sertãozinho/SP.

Referências

- FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; MAZIERO, R. R. D.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 4., 2012, Campinas, SP. **Animal Reproduction**. Campinas, SP: ISABR, 2012. p. 941. v. 9.
- GUASTI, P. N.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; MAZIERO, R. R. D.; HARTWIG, F. P.; MONTEIRO, G. A.; LISBOA, F. P.; PAPA, F. O. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 4., 2012, Campinas, SP. **Animal Reproduction**. Campinas, SP: ISABR, 2012. p. 929. v. 9.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.
- KATKOV, I. I.; MAZUR, P. Factors affecting yield and survival of cells when suspensions are subjected to centrifugation. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 31, n. 3, p. 231-245, 1999.
- PAASCH, U.; GRUNEWALD, S.; AGARWAL, A.; GLANDERA, H. J. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 1, p. 802-809, 2004.
- PAPA, F. O.; MELO, C. M.; FIORATTI, E. G.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; ZAHN, F. S.; ALVARENGA, M. A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3, p. 293-301, 2008.
- PHELPS, M. J.; LIU, J.; BENSON, J. D.; WILLOUGHBY, C. E.; GILMORE, J. A.; CRITSER, J. K. Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 4, p. 1031-1041, 1999.
- RAMIRES NETO, C. **Perfil lipídico da membrana plasmática e alterações morfofuncionais de espermatozoides de garanhões resistentes e sensíveis à criopreservação**. 2015. 130 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, Botucatu.
- WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 639-658, 1993.

Avaliação do hormônio Anti-Mülleriano à desmama e precocidade sexual de machos Nelore

Alessandro Luiz Carlos Cesar da Costa Filho^{5}, Ellen Caroline Soligo⁶, Alini Silva Peixoto², Fernanda Battistotti Barbosa¹, Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo¹, Tallita Silva de Assis¹, Vitor Miotto Oliveira², Maria Inês Lenz Souza¹, Eliane Vianna da Costa e Silva¹*

Resumo: A pediatria já utiliza o hormônio Anti-Mülleriano (AMH) como parâmetro clínico na identificação de problemas de precocidade sexual, puberdade precoce (baixas concentrações de AMH) e tardia (altas concentrações de AMH). O estudo foi conduzido com objetivo de verificar a correlação das concentrações de AMH à desmama em bezerros Nelore, de acordo com a classe de precocidade sexual. Sessenta e um machos Nelore, utilizados para este experimento, foram classificados conforme sua precocidade sexual: superprecoces (SM) - animais que apresentaram idade à puberdade até 52 semanas de idade; precoces (M) - aqueles que chegaram à puberdade entre 53 e 64 semanas de idade; e tardios (L) - aqueles que alcançaram a puberdade a partir de 65 semanas. Destes, o sangue foi coletado três vezes (desmame, 12 e 16 meses) para quantificação de AMH e testosterona (T). Na puberdade, os machos SM, embora mais jovens e com menor peso e peso de desmama, não diferiram de M e L para níveis hormonais de AMH e T. Os dados mostram que a medição de perímetro escrotal (PE) não pode ser uma única ferramenta para definir a puberdade, uma vez que cada classe deste trabalho apresentou medidas distintas. O perímetro escrotal não influenciou ($P > 0,05$) a expressão da idade à puberdade dos tourinhos. Não foi encontrada correlação da concentração do AMH com nenhuma das características estudadas ($P > 0,05$). A utilização do parâmetro de perímetro escrotal, como único fator de predição de precocidade sexual, não conseguiu identificar a precocidade sexual, sendo necessário acompanhamento por coleta de sêmen ($P > 0,05$).

Palavras-chave: AMH. Puberdade. Touros.

Evaluation of Anti-Müllerian hormone at weaning and sexual precocity of Nelore males

Abstract: Pediatrics already uses the anti-Müllerian hormone (AMH) as a clinical parameter in the identification of problems of sexual precocity, early puberty (low concentrations of AMH) and late (high concentrations of AMH). The objective of the present study was to verify the correlation of the concentrations of AMH to weaning in Nelore calves according to the sexual precocity class. Sixty-one Nelore males used for this experiment were classified as sexual precocity as: super maturing bulls (SM) - animals that presented puberty age up to 52 weeks of age; maturing (M) - those who reached puberty between 53 and 64 weeks of age; and late bulls (L) - those who reached puberty after 65 weeks. From these, blood was collected at three times (weaning, 12 and 16 months) for quantification of AMH and testosterone (T). At puberty, SM males, although younger and with lower weight and PW, did not differ from M and L for hormone levels of AMH and T. The data show that PE measurement can't be a single tool to define the Puberty, since each class of this work had different measures. The scrotal circumference did not influence ($P > 0.05$) the expression of age at puberty of the young bulls. No correlation of the concentration of AMH was founded with any of the characteristics studied ($P > 0.05$). The use of the scrotal circumference parameter as the only predictor of sexual precocity was not able to identify the sexual precocity, and follow-up by semen collection was necessary ($P > 0.05$).

Keywords: AMH. Bulls. Puberty.

⁵ Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

⁶ GERA, 79040-453, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

* luizccesar@hotmail.com

Introdução

Bovinos *Bos indicus* são tipicamente mais tardios sexualmente em relação ao gado *Bos taurus* (LOPEZ et al., 2006). Um método promissor para identificação de precocidade sexual em bovinos é a quantificação do hormônio Anti-Mülleriano (AMH). Em humanos, a pediatria já utiliza o AMH como parâmetro clínico na identificação de problemas de precocidade sexual, puberdade precoce (baixas concentrações de AMH) e tardia (altas concentrações de AMH) (REY et al., 1993; OKAY, 2003). Em bovinos Nelore, a concentração sérica do AMH em animais não púberes é elevada, comportamento esse inverso ao da testosterona (T). Nos animais púberes acontece uma inversão dessas concentrações, quando os níveis de AMH são reduzidos e os da T se elevam, resultados esses que demonstram que o AMH revela-se como um possível marcador biológico de precocidade sexual em machos bovinos (QUEIROZ, 2014). Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar a correlação das concentrações do AMH à desmama em bezerros Nelore de acordo com a classe de precocidade sexual.

Material e Métodos

Utilizou-se dados de 61 machos Nelore pertencentes a uma propriedade que realiza seleção para precocidade sexual, no estado de Mato Grosso do Sul. Após a desmama foram suplementados com concentrado (18% PB) diariamente, em uma relação concentrado/peso vivo de 1%. Os animais foram submetidos à pesagem e mensuração do perímetro escrotal (PE) e à coleta sanguínea para quantificar o nível sérico de AMH e T ao desmame, aos 12 e aos 16 meses. Aos 12 e aos 16 meses os animais foram submetidos também à eletroejaculação para obtenção do sêmen. A classe de precocidade sexual foi definida: superprecoces (SM) - animais que apresentaram idade à puberdade até 52 semanas de idade; precoces (M) - aqueles que atingiram a puberdade entre 53 e 64 semanas de idade; e tardios (L) - aqueles que alcançaram a puberdade a partir de 65 semanas de idade. Os tourinhos que após a coleta de sêmen atingiram a concentração espermática total do ejaculado de no mínimo 50×10^6 e motilidade $\geq 10\%$ foram considerados púberes, classificação já definida (WOLF et al., 1965). As coletas sanguíneas deram-se pela da punção da veia/artéria coccígea. Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 20 minutos (SANTOS et al., 2000). E o soro armazenado em freezer a -18°C para dosagem de AMH. Analisou-se as concentrações séricas de AMH (ng/mL) através do método de ELISA, utilizando-se o kit comercial "Bovine AMH ELISA" (AnshLabs®, USA). As concentrações de T (ng/mL) foram obtidas utilizando o kit comercial "RIA Testosterone" (Immunotech®, USA), ambas realizadas no Instituto Gênese de Análise Científica (São Paulo, Brasil). A sensibilidade do ensaio do AMH e da T foi de 0,011 ng/mL e 0,04 ng/mL, respectivamente, e o coeficiente de variação intraensaio $<5\%$. Inicialmente, estabeleceram-se as correlações entre as variáveis, por meio da Correlação de Spearman. As variáveis foram submetidas à análise de variância considerando o efeito fixo de precocidade sexual do animal por meio do procedimento GLM do SAS (2002). Posteriormente, verificou-se o efeito fixos dos níveis séricos de AMH e T, peso, perímetro escrotal à desmama e à puberdade e idade à desmama, avaliados em modelo de regressão processada por stepwise, utilizando-se o Programa SAS.

Resultados e Discussão

Os bezerros foram desmamados, na média, com $41,31 \pm 2,71$ semanas de idade (9 meses), peso médio de $271,95 \pm 35,35$ kg, PE médio de $20,59 \pm 1,65$ cm. Os níveis séricos de AMH e T, nesta fase, foram de $16,14 \pm 1,47$ ng/mL e $2,78 \pm 2,14$ ng/mL, respectivamente. Registrou-se idade média dos animais à puberdade de $60,26 \pm 6,92$ semanas (14 meses), peso vivo médio de $367,53 \pm 6,47$ kg, com PE de $29,29 \pm 0,39$ cm, apresentando níveis séricos de $8,42 \pm 3,42$ ng/mL e $9,24 \pm 6,93$ de AMH e T, respectivamente.

Quanto à classe de precocidade, os animais classificados como L apresentaram maior medida de PE ($30,73 \pm 0,48$ cm) ao atingirem a puberdade em relação aos M ($29,39 \pm 0,49$ cm), os quais também mostraram maior PE que os SM ($26,46 \pm 0,89$ cm). Esse resultado sugere que a medida do PE não pode ser uma única ferramenta para definir a puberdade, pois cada classe deste trabalho apresentou medidas distintas. A medida do PE não influenciou significativamente a expressão da idade à puberdade dos tourinhos. Não foi identificada diferença significativa para as variáveis hormonais (AMH e T), porém, apenas os tourinhos SM apresentaram uma inversão das concentrações hormonais no momento da puberdade, pois a concentração da T já estava mais alta que a do AMH. Estes resultados diferem dos já relatados (QUEIROZ, 2014), também com animais Nelore, que revelaram que o AMH é um possível biomarcador de precocidade sexual em machos bovinos, considerando-se que o declínio nas concentrações séricas deste correlacionou-se à precocidade sexual, principalmente na distinção dos animais SM dos animais L. Na fase adulta de humanos, sugere-se que ocorra uma regulação antagônica entre AMH e T, sendo que a T parece exercer um efeito supressor sobre a secreção do AMH pelas células de Sertoli. Nestes momentos, os receptores de andrógeno (RA) já estão expressos nas células de Sertoli e a T encontra-se em alta concentração intratesticular. Assim, a T atua nos RA, através da ação parácrina, inibindo a secreção do AMH pelas células de Sertoli (REY et al.,

2003). Se esse comportamento hormonal se repetir em bovinos, pode explicar o que aconteceu com o AMH e a T nos animais SM.

Tabela 1. Médias (\pm desvio padrão) dos aspectos clínicos andrológicos e níveis séricos de hormônio AMH e de T, de acordo com a classe de precocidade sexual à desmama e à puberdade de bezerras Nelore. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) para teste t de Student; SM – superprecoces; M – precoce; L – tardios; Idade desm (sem) – idade a desmama em semanas; desm – desmama; pub – puberdade; AMH – concentração de AMH em ng/mL; T – concentração de Testosterona em ng/mL; PE – perímetro escrotal; Mot. Progressiva – motilidade progressiva; Conc. TT – concentração espermática.

Variáveis à desmama	Classe de Precocidade Sexual		
	SM	M	L
Idade desm (sem)	39,43 \pm 0,71 ^a	41,39 \pm 0,54 ^b	42,43 \pm 0,48 ^b
AMH desm (ng/mL)	15,90 \pm 0,42 ^a	15,82 \pm 0,43 ^a	16,59 \pm 0,44 ^a
T desm (ng/mL)	2,46 \pm 0,49 ^a	2,51 \pm 0,52 ^a	3,31 \pm 0,82 ^a
PE desm (cm)	20,61 \pm 0,41 ^b	20,78 \pm 0,30 ^a	20,40 \pm 0,40 ^c
Peso desm (kg)	265,36 \pm 8,49 ^a	273,61 \pm 6,95 ^a	274,21 \pm 8,15 ^a
Variáveis à puberdade	SM	M	L
Idade pub (sem)	50,86 \pm 0,65 ^a	59,65 \pm 0,87 ^b	66,86 \pm 0,38 ^c
AMH pub (ng/mL)	9,62 \pm 1,17 ^a	8,64 \pm 0,56 ^a	7,45 \pm 0,71 ^a
T pub (ng/mL)	10,81 \pm 2,65 ^a	8,49 \pm 2,22 ^a	5,59 \pm 0,22 ^a
PE pub (cm)	26,46 \pm 0,89 ^c	29,39 \pm 0,49 ^b	30,73 \pm 0,48 ^a
Peso pub (kg)	311,31 \pm 10,26 ^c	368,48 \pm 8,00 ^b	397,08 \pm 8,24 ^a
Mot. Progressiva (%)	46,43 \pm 4,64 ^a	29,13 \pm 3,82 ^b	17,39 \pm 2,20 ^c
Conc. TT (nx10 ⁶ sptz/ejac)	303,82 \pm 55,19 ^a	182,57 \pm 45,80 ^a	80,60 \pm 16,95 ^b

Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

Não foi encontrada correlação da concentração do AMH com nenhuma das características estudadas. A utilização do parâmetro PE, como único fator de predição de precocidade sexual, não conseguiu identificar a precocidade sexual, sendo necessário acompanhamento por coleta de sêmen.

Agradecimentos

Ao grupo Genética Aditiva pelo apoio na pesquisa e a Fundect pela concessão de bolsa de Doutorado e apoio financeiro para pesquisa.

Referências

- LOPEZ, R.; THOMAS, M. G.; HALLFORD, D. M.; KEISLER, D. H.; SILVER, G. A.; OBEIDAT, B. S.; GARCIA, M. D.; KREHBIEL, C. R. Metabolic hormone profiles and evaluation of associations of metabolic hormones with body fat and reproductive characteristics of angus, brangus and brahman heifers. **The Professional Animal Scientist**, v. 22, n. 3, p. 273-282, 2006.
- OKAY, T. S. Hormônio anti-mülleriano: importância na prática pediátrica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 16-17, 2003.
- QUEIROZ, V. L. D. **Hormônio anti-Mülleriano sérico como preditor da puberdade de touros jovens Nelore**. 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.
- REY, R.; LORDEREAU-RICHARD, I.; CAREL, J. C.; BARBET, P.; CATE, R. L.; ROGER, M.; CHAUSSAIN, J. L.; JOSSO, N. Anti-müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, n. 5, p. 1220-1226, 1993.
- REY, R.; LUKAS-CROISIER, C.; LASALA, C.; BEDECARRAS, P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 211, n. 1, p. 21-31, 2003.

SANTOS, M. D.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; MACHADO, G. V.; COSTA, D. S.; ANGULO, L. M. Concentração sérica de testosterona em touros zebu. **Revista brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 738-744, 2000.

SAS – STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **User's guide**. Cary: SAS Institute, 2002. 525p.

WOLF, F. R.; ALMQUIST, J. O.; HALE, E. B. Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, v. 24, n. 3, p. 761-765, 1965.

Cacodilato como tampão na solução fixadora para análise ultraestrutural de espermatozoide de felinos

José Luiz Blassioli Junior¹, Anne Kemmer Souza¹, Cristiane Sella Paranzini¹,
Luiz Guilherme Corsi Trautwein¹, Maria Isabel Mello Martins^{1*}

Resumo: A fixação das amostras é fundamental para a preservação da integridade morfológica, molecular e realizar a análise ultraestrutural dos espermatozoides. O trabalho foi conduzido com objetivo de usar cacodilato de sódio como solução tampão para microscopia espermática. Foram utilizados espermatozoides coletados de três gatos adultos e após a centrifugação foi adicionado uma solução contendo sedimento de Glutaraldeído a 4,5% e tampão de cacodilato 1,5 M e armazenado no refrigerador a 4°C por sete dias. Após o processamento, foram realizados cortes de 0,2 micrômetros de espessura para escolha do local do corte ultrafino, que foi posteriormente cortado no ultramicrótomo com espessura de 60 nanômetros. A análise ultraestrutural do material foi examinado ao microscópio eletrônico de transmissão. O uso do tampão de cacodilato de sódio se mostrou eficaz no preparo das amostras armazenadas por sete dias antes do processamento, demonstrando ser um tampão eficaz para a fixação de amostras biológicas que tenham que ser estocados antes do seu processamento.

Palavras-chave: Microscopia eletrônica. Gatos. Células espermáticas.

Cacodylate as a buffer on fixative solution to ultrastructural analysis of feline spermatozoa.

Abstract: The determination of the samples is fundamental for the preservation of the morphological and molecular integrity to perform the ultrastructural analysis of the spermatozoa. The objective of this work was to use sodium cacodylate as a buffer solution for sperm microscopy. Spermatozoa collected from three adult cats were used. After centrifugation was added to pellet one solution containing 4.5% Glutaraldehyde and 1.5 M cacodylate buffer and stored in the refrigerator at 4 °C for seven days. After processing, cuts of 0.2 micrometers of thickness were made to select the site of the ultra-thin cut, which was then cut in the ultramicrotome with a thickness of 60 nanometers. Ultrastructural analysis of the material was examined under the transmission electron microscope. The use of the sodium cacodylate buffer proved to be effective in preparing the stored samples for seven days prior to processing, proving to be an effective buffer for the fixation of biological samples that have to be stored prior to processing.

Keywords: Electron microscopy. Cats. Sperm cells.

Introdução

A identificação, caracterização, e avaliação dos defeitos espermáticos é importante na identificação de possíveis falhas na funcionalidade do gameta, impedindo a fecundação. Alguns defeitos de acrossomo, peça intermediária e cauda só são possíveis por meio da microscopia eletrônica de transmissão, pois são realizados cortes ultrafinos em escala manométrica, proporcionando avaliar a estrutura e integridade da membrana plasmática e acrossomal, identificando uma possível ruptura de membranas. Considerando que a membrana das células espermáticas tem a capacidade de transporte seletivo de moléculas, sendo um processo essencial para a viabilidade e capacidade fertilizante do espermatozoide (KUMI-DIAKA, 1993). Defeitos estruturais em espermatozoides podem ocorrer por diversos motivos: razões individuais do animal, má nutrição, estresse, uso de medicamentos, anestésicos e também após a congelação-descongelação do sêmen. Na espécie felina, defeitos de membrana plasmática e acrossomal são comuns, visto que grande quantidade dos gatos são teratospérmicos, acima de 60% de espermatozoides defeituosos (HOWARD et al., 1990). Para que as amostras espermáticas possam ser armazenadas sem que haja a deterioração das células, o glutaraldeído é utilizado como fixador associado a uma solução tampão. Atualmente, o fosfato salino é o tampão mais utilizado para análise ultraestrutural de espermatozoides, por ser considerado mais fisiológico porque é encontrado em células na forma de fosfatos inorgânicos e éster de fosfato, não sendo tóxico para o crescimento de células em cultura, entretanto, durante a estocagem da amostra apresentar contaminação bacteriana. O Cacodilato de sódio é uma solução tampão que oferece vantagens na fixação de materiais biológicos as quais sejam: a ausência de íons fosfato que possam interferir em estudos citotóxicos; preservação da atividade de determinadas enzimas,

¹ Universidade Estadual de Londrina, 86057-970, Londrina, Paraná.

* imartins@uel.br

sendo mesmo superior a tampões como tris-maleato ou tris-HCl; resistência à contaminação por bactérias durante a estocagem de amostras, pois o mesmo possui arsênico e inviabiliza o crescimento de microorganismos. A fixação das amostras é fundamental para a preservação da integridade morfológica e molecular do material, baseado nisso, o objetivo desse trabalho foi utilizar o Cacodilato de sódio como solução tampão para fixação de células espermáticas de felinos para realização da microscopia espermática de transmissão.

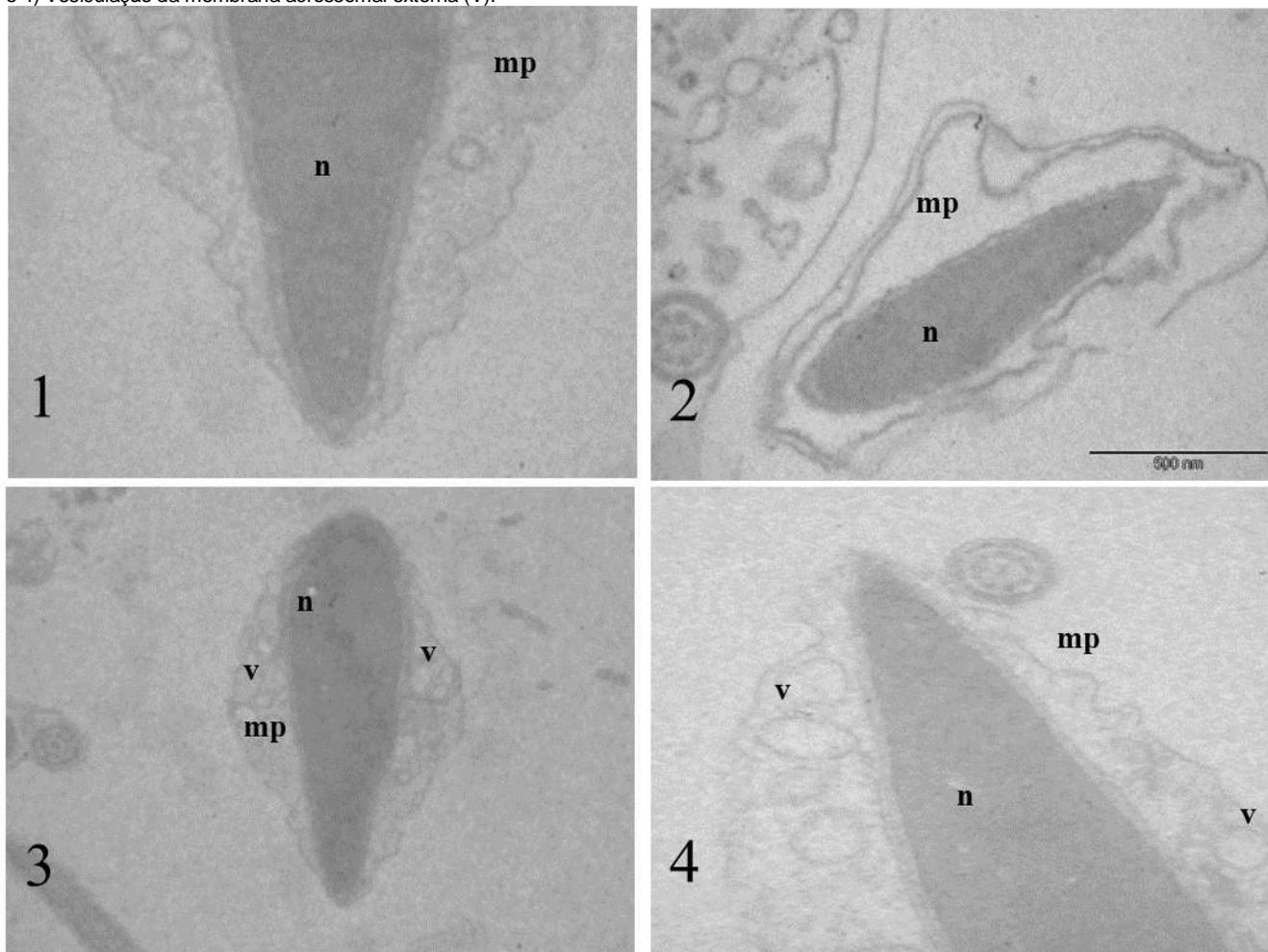
Material e Métodos

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos de Pesquisa em Animais e sob a anuência da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEL) da Universidade Estadual de Londrina – PR, conforme sob o número 29850.2013.38. Foram utilizados espermatozoides colhidos por eletroejaculação e recuperação da cauda do epidídimo, de três gatos machos, adultos, sem raça definida de peso variando de 3,2 a 4 Kg (3,6 + 0,41 Kg). A eletroejaculação dos gatos foi realizada após anestesia com cetamina (12 mg/Kg - Dopalen®, Ceva, Brasil) associado a medetomidina (30µg/Kg - Dormitor®, Pfizer, França). Realizou-se a exposição peniana e cateterização uretral com cateter 24G acoplado a um microtubo de polipropileno de 1,5 mL. O protocolo da eletroejaculação utilizado foi baseado em Howard et al. (1990). A recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo foi realizada imediatamente após a orquiectomia eletiva. A vascularização da cauda do epidídimo e do ducto deferente foi isolada, e com auxílio de uma pinça hemostática foi realizada a compressão para a obtenção do fluido epididimário em uma placa de Petri, contendo 100 µL de solução de NaCl 0,9% para cada epidídimo, totalizando um volume de 200 µL por animal. Após a obtenção das amostras, foi realizada a centrifugação a uma velocidade de 300G por 10 minutos (Microcentrifuga MiniSpin Plus® – Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil), para separação do plasma seminal/epididimários, e ao pellet foi adicionado uma solução contendo fixador e tampão composto de Glutaraldeído a 4,5% e tampão cacodilato 1,5 M juntamente com água destilada e armazenada no refrigerador a 4°C por sete dias. As amostras foram novamente submetidas a centrifugação (300G por 10 minutos). Para retirada residual do glutaraldeído foram realizadas três lavagens com o tampão cacodilato 1,5 M tendo um intervalo de 15 minutos entre cada lavagem. Após este procedimento o pellet foi fixado com tetróxido de ósmio a 1% (50 uL) aguardado uma hora e fixado novamente com o mesmo fixador. Para a desidratação, após a retirada do fixador foram realizadas uma série de desidratações com álcool 70, 80, 90 e 100°. Para a embebição e inclusão em resina foi retirado o álcool 100° e deixado apenas o pellet, e colocado uma parte de óxido de propileno para uma parte de resina araldite, aguardado quatro horas e repetindo o procedimento. Para trimagem foram realizados cortes de 0,2 micrometros de espessura para escolha do local do corte ultrafino, que foi posteriormente cortado no ultramicrótomo com espessura de 60 nanômetros. Para contrastação dos cortes ultrafinos foi utilizado uma solução saturada de acetato de uranila em álcool etílico 50% e, posteriormente, em citrato de chumbo. A análise ultraestrutural do material foi examinado ao microscópio eletrônico de transmissão (FEI Company / Tecnai G2 Spirit BioTWIN).

Resultados e Discussão

A análise ultraestrutural com as amostras fixadas com glutaraldeído com tampão de cacodilato revelou alterações espermáticas, conforme a imagem 1 e 2 (Figura 1), semelhantes as observadas por Tebet (2004), que utilizou como solução tampão o fosfato de sódio. Os defeitos observados foram em sua grande maioria defeitos em membrana plasmática como distensão e vesiculação e em menor escala defeitos em membrana acrossoma, alterações essas que podem estar relacionadas ao fato dos felinos serem teratospérmicos. Entretanto, o resultado mais relevante foi o de não ter havido contaminação bacteriana das amostras, estocadas por sete dias sob refrigeração, o que possibilita o armazenamento de amostras obtidas longe de um laboratório especializado, como por exemplo em avaliações espermáticas de felinos selvagens.

Figura 1. Ultraestrutura espermática de felinos domésticos. 1 e 2) Espermatozóide mostrando distensão de membrana plasmática (MP). 3 e 4) Vesiculação da membrana acrossomal externa (V).



Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

A utilização do tampão cacodilato de sódio se mostrou eficaz no preparo das amostras armazenadas por sete dias antes do processamento, demonstrando ser um tampão eficaz para a fixação de amostras biológicas que tenham que ser estocadas antes do seu processamento.

Agradecimentos

A Profa Dra Célia Guadalupe T. de J. Andrade e a Uel, Capes e CNPq pelas bolsas de residência e mestrado.

Referências

- HOWARD, J. G.; BROWN, J. L.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary—gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *Journal of Andrology*, v. 11, n. 3, p. 204-215, 1990.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v. 39, n. 6, p. 1279-1289, 1993.
- TEBET, J. M. **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 Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus Botucatu, Botucatu.

Características reprodutivas de machos jovens da raça Senepol

Teresinha Inês Assumpção^{1}, Mateus Barra Bernardes¹, Gustavo Guerino Macedo¹*

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de analisar as características reprodutivas dos touros Senepol de 9 a 16 meses de idade. O sêmen foi coletado de 11 animais utilizando o método da eletroejaculação, e analisado fisicamente e morfológicamente utilizando técnicas de rotina. A análise estatística foi realizada pelo Windows SAS®, usando os procedimentos GLIMMIX e o teste LS Means. O perímetro escrotal aumentou proporcionalmente ao tamanho do animal ($p = 0,876$), com excelente perímetro escrotal em todas as idades, sendo o crescimento em 9 meses $22,3 \pm 0,4$ cm e o crescimento aos 16 meses $32,4 \pm 0,37$ cm. Os animais apresentaram sêmen aos 10 meses, mas com baixa qualidade. A qualidade tornou-se melhor aos 16 meses de idade, com motilidade de $65,9 \pm 2,8\%$ e patologias totais de $25,6 \pm 1,9\%$. O perímetro escrotal do animal aumentou proporcionalmente ao seu desenvolvimento, juntamente com a produção de sêmen e sua qualidade, atingindo padrões recomendados para bovinos aos 16 meses, mostrando a precocidade da raça.

Palavras-chave: Bos taurus. Perímetro scrotal. Reprodução. Sêmen.

Reproductive characteristics of young Senepol males

Abstract: This study aimed to analyze reproductive characteristics of Senepol bulls from 9 to 16 months old. The semen was collected from 11 animals using the electro ejaculation method, and analyzed physically and morphologically using routine techniques. The statistical analysis was performed using Windows SAS®, using the proceedings Glimmix, and LS Means test. Scrotal perimeter increased proportionally to the animal size ($p=0.876$), with excellent scrotal perimeter in all ages, being the growth at 9 months 22.3 ± 0.4 cm and the growth at 16 months 32.4 ± 0.37 cm. Animals presented semen at 10 months, but the quality was low. The quality became great at 16 months old, with motility of $65.9 \pm 2.8\%$ and total pathologies of $25.6 \pm 1.9\%$. The animal's scrotal perimeter increased proportionally to its development, along with semen production and its quality, with a good spermatozoa profile at 16 months old, which shows the race's precocity.

Keywords: Bos Taurus. Scrotal circumference. Reproduction. Semen.

Introdução

A raça Senepol (cruzamento de Red Poll e N'Dama), é uma raça taurina que chegou ao Brasil há pouco mais de 15 anos e é muito adaptada ao clima tropical, apresentando ótima rusticidade, docilidade, dominância genética e qualidade de carcaça (PAULA, 2014).

Apesar do grande avanço da pecuária brasileira, ela ainda apresenta baixos índices de produtividade e reprodutivos. Os machos possuem alta responsabilidade, já que em torno de 90% das vacas e novilhas do rebanho de corte em condições de reprodução são servidas pela monta natural. Assim, é de grande importância à avaliação do potencial reprodutivo dos reprodutores, principalmente dos machos jovens, com o objetivo de selecionar aqueles que sejam capazes de imprimir características econômicas desejáveis à sua prole como fertilidade, precocidade, capacidade de ganho rápido de peso e musculabilidade (FONSECA, 2009).

As características físicas do animal e de seu sêmen são a base para avaliação da fertilidade de um macho. O exame clínico do indivíduo, incluindo a medida dos testículos, aliado ao espermiograma, onde se avaliam as características físicas e as morfológicas do sêmen são à base da seleção reprodutiva (CHENOWETH, 2011). Ainda há poucos dados existentes na literatura sobre a reprodução na raça Senepol. Assim, este estudo teve por objetivo conhecer as características reprodutivas dos machos jovens da raça Senepol.

¹ Universidade Federal de Uberlândia, 38408-100, Uberlândia, Minas Gerais.

Material e Métodos

Foram utilizados 11 animais da raça Senepol (*Bos taurus taurus*), com nove meses de idade criados extensivamente em uma fazenda no estado de Goiás. As análises clínica geral e do sistema reprodutivo, medida do perímetro escrotal, pesagem dos animais e coleta do sêmen, foram realizadas dos 9 aos 16 meses de idade, com intervalo de 30 dias entre as mesmas. Todos os animais foram mantidos sob o mesmo regime de manejo e alimentação, em pastagem de boa qualidade, com mineralização balanceada, mantendo o escore de condição corporal de 3 a 4 (escala de 0-5). As coletas de sêmen foram feitas em todos os animais no mesmo dia, utilizando o método de eletroejaculação. Para as análises físicas de motilidade (porcentagem) e vigor (escala de 0-5) do sêmen, utilizou-se uma gota de sêmen sobre a lâmina de vidro recoberta com lamínula e observada em microscópio óptico. Para dosar a concentração de células/mL utilizou-se a câmara de Neubauer e a morfologia espermática foi avaliada pelo método de preparação úmida sob microscopia de contraste de fase, verificando a porcentagem total de anormalidades dos espermatozoides (CBRA, 2013). A análise estatística foi realizada pelo Windows SAS®, usando os procedimentos GLIMMIX e o teste LS Means.

Resultados e Discussão

Tabela 1. Médias \pm desvio-padrão obtidas de peso, perímetro escrotal, motilidade, vigor, patologias espermáticas e concentração de sêmen dos animais da raça Senepol dos 9 aos 16 meses de idade. MOT – motilidade; CONC – concentração; PAT – patologias espermáticas totais; MOT – motilidade; CONC – concentração; PAT – patologias espermáticas totais.

IDADE (MESES)	PESO (KG)	PE (CM)	MOT (%)	VIGOR (0-5)	PAT (%)	CONC (MILHÕES)
9	221,2 \pm 10,2	22,3 \pm 0,4	----	----	----	----
10	286,6 \pm 11,1	25,3 \pm 0,3	20,0 \pm 5,7	1,0 \pm 0,0	71,3 \pm 10,8	0,9 \pm 0,3
11	291,1 \pm 11,6	27,0 \pm 0,4	33,3 \pm 5,0	1,5 \pm 0,2	64,7 \pm 3,4	23,0 \pm 11,3
12	320,1 \pm 9,5	29,2 \pm 0,4	44,1 \pm 1,9	2,1 \pm 0,1	59,3 \pm 4,3	34,1 \pm 8,9
13	328,2 \pm 10,8	30,1 \pm 0,4	45,8 \pm 3,4	2,3 \pm 0,1	53,9 \pm 3,3	55,8 \pm 23,6
14	343,8 \pm 10,8	30,9 \pm 0,4	62,8 \pm 2,8	2,5 \pm 0,1	38,5 \pm 4,6	54,2 \pm 13,2
15	370,1 \pm 11,7	31,7 \pm 0,4	61,3 \pm 2,6	3,0 \pm 0,0	33,0 \pm 3,6	122,5 \pm 30,8
16	380,2 \pm 12,1	32,4 \pm 0,3	65,9 \pm 2,8	3,0 \pm 0,0	25,3 \pm 1,6	114,3 \pm 30,2

Fonte: Elaborado pelos autores.

Observa-se na tabela 1, que as características de peso, perímetro escrotal, vigor e motilidade do sêmen tiveram um crescimento linear dos 9 aos 16 meses e o total de patologias decresceu de acordo com o aumento da idade, resultado semelhante aos de Chenoweth et al. (1996), Quirino et al. (1999) e Assumpção et al. (2013). O ganho de peso dos animais foi de aproximadamente 662 gramas/dia, valores próximos ao observado por Moraes (2012) na mesma raça (641 g). O crescimento médio mensal do perímetro escrotal foi de 1,26 cm ao longo de 8 meses, maior que o verificado por Moraes (2012) na mesma raça (0,89 cm) e semelhante ao observado por Assumpção et al. (2013) na raça Nelore (1,11 cm) na mesma faixa de idade.

Os animais iniciaram sua produção de sêmen a partir dos 10 meses de idade (tabela 1), mostrando sua precocidade, porém a qualidade do sêmen só foi melhorada com o avançar da idade, sendo que a partir dos 13 meses a motilidade foi superior a 50%, o vigor acima de dois. A patologia espermática abaixo dos 30% só foi atingida aos 15 meses, atingindo assim qualidade seminal recomendada para bovinos (CBRA, 2013). Os parâmetros seminais destes animais foram mais precoces quando comparados com animais da raça Nelore que só atingiram valores semelhantes aos 20 meses (ASSUMPÇÃO et al., 2013).

A concentração do sêmen teve crescimento progressivo em relação à idade ($p=0,75$), o que era esperado devido maturação testicular, porém a coleta de sêmen foi realizada por eletroejaculação, o que pode trazer uma grande variação na concentração espermática, pois depende da resposta individual do animal, sendo a repetibilidade baixa.

As patologias espermáticas decresceram de forma linear, as quais após 15 meses estavam abaixo de 30%, resultado semelhante aos de Assumpção et al. (2013), onde foi encontrada uma média abaixo de 30% de patologia após os 17 meses na raça Nelore. Já Moraes (2012) verificaram patologias muito mais elevadas que os desta pesquisa, sendo observado aos 12 meses um total de 90% e reduzindo para 45% aos 16 meses.

Os coeficientes de determinação para as diversas características analisadas foram: idade é determinante sobre o peso em 57%, sobre o perímetro escrotal em 76% e sobre a motilidade e o vigor com índice de 55% e 51%, respectivamente. Também o vigor é determinante sobre a motilidade progressiva das células com índice de 64%. Para as demais características não encontramos determinação significativa.

Conclusões

O perímetro escrotal em animais da raça Senepol aumentou proporcionalmente com sua idade, peso, produção e qualidade do sêmen, atingindo padrões recomendados para bovinos aos 16 meses, mostrando a precocidade da raça.

Referências

- ASSUMPÇÃO, T. I. de; SOUZA, M. de A.; ALBERTON, A.; PALLAORO, R.; KITAGAWA, C.; SILVA, N. A. M. Características reprodutivas de machos bovinos da raça Nelore da fase pré-púbere à maturidade sexual. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 148-154, 2013.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- CHENOWETH, P. J. Reproductive selection of males: current and future perspectives. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 133-138, 2011.
- CHENOWETH, P. J.; CHASE JUNIOR, C. C.; THATCHER, M. J. D.; WILCOX, C. J.; LARSEN, R. E. Breed and other effects on reproductive traits and breeding soundness categorization in young beef bulls in Florida. **Theriogenology**, v. 46, n. 7, p. 1159-1170, 1996.
- FONSECA, V. O. da. Avaliação reprodutiva de touros para a monta a campo: análise crítica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, MG, v. 6, p. 36-41, 2009.
- MORAES, G. P. de. **Puberdade e maturidade sexual de tourinhos Senepol, criados semi-extensivamente na região do Triângulo Mineiro, MG**. 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PAULA, D. F. de. **Senepol: feito para o Brasil**. 1. ed. Campo Grande, MS: ABCB Senepol, 2014. 161 p.
- QUIRINO, C. R.; BERGMANN, J. A. G.; VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J.; PEREIRA, J. C. C. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nelore bulls. **Theriogenology**, v. 52, n. 1, p. 25-34, 1999.

Características seminais de touros jovens da raça Nelore classificados para baixo e alto consumo alimentar residual

Guilherme Fazan Rossi^{1*}, Gisele Zoccal Mingoti², Erika Aline Ribeiro Dias³, Natália Marins Bastos¹, Dayane Priscila Virsman¹, Naiara Nantes Rodrigues¹, Roberta Vantini¹, Joaquim Mansano Garcia¹, Flávia Fernanda Simil³, Fabio Morato Monteiro³

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de avaliar as características seminais de machos jovens da raça Nelore classificados com baixo e alto consumo alimentar residual (CAR). Foram utilizados um total de 48 touros jovens com $14,3 \pm 0,13$ meses de idade inicial e um peso de $389,5 \pm 5,43$ kg, sendo 24 em baixo CAR e 24 em alto CAR. As avaliações andrológicas foram realizadas a cada 28 dias, dos 14 aos 24 meses de idade, totalizando 12 colheitas. A coleta de sêmen foi submetida à Análise Computadorizada da Cinética Espermática (CASA). Os parâmetros foram: MT (%), MP (%), VCL ($\mu\text{m} / \text{s}$), VSL ($\mu\text{m} / \text{s}$), VAP ($\mu\text{m} / \text{s}$), ALH (μm), BCF (Hz), LIN (%), STR (%) e RAP (%). Os dados foram analisados pelo procedimento PROC MIXED do SAS. As análises da avaliação andrológica não apresentaram diferença entre CAR baixa e alta. Assim, a utilização de touros da raça Nelore sob o CAR não teve nenhum prejuízo nas características seminais.

Palavras-chave: Eficiência alimentar. Maturidade. Sêmen.

Seminal characteristics of young bulls of the Nelore breed classified for low and high residual feed intake

Abstract: The aim of the present study to evaluate the seminal characteristics of young bulls Nelore classified for low and high residual feed intake (RFI). A total of 48 young males were used with a 14.3 ± 0.13 months of age initial and a weight of 389.5 ± 5.43 kg, being 24 animals low RFI and 24 high RFI. The andrological evaluations were performed every 28 days, from 14 to 24 months of age, totaling 12 evaluations. The semen collection was submitted to the CASA. The parameters were: MT (%), MP (%), VCL ($\mu\text{m}/\text{s}$), VSL ($\mu\text{m}/\text{s}$), VAP ($\mu\text{m}/\text{s}$), ALH (μm), BCF (Hz), LIN (%), STR (%) and RAP (%). The data were analyzed by the SAS procedure PROC MIXED. The analyzes of andrological evaluation did not show any difference between low and high RFI. Thus, the use of Nelore bulls under RFI did not show any damage in seminal characteristics.

Keywords: Feed intake. Maturity. Semen.

Introdução

A maturidade sexual é considerada quando o touro atingir todas as potencialidades espermáticas, ponderais e comportamentais que propiciem a habilidade de realizar a cópula e promover a fecundação (BRITO et al., 2004). Em bovinos de corte, ocorre uma grande preocupação em selecionar animais precoces sexualmente e com melhor eficiência alimentar. Pesquisas têm sido realizadas para estudar o consumo alimentar residual (CAR), que tem se revelado uma ferramenta importante no melhoramento genético de bovinos (MERCADANTE; RAZOOK, 2010). O CAR é calculado como a diferença entre o consumo alimentar observado menos o consumo estimado. Alguns estudos indicaram relação inversa entre melhor eficiência alimentar e índices de fertilidade em bovinos jovens (ARTHUR et al., 2005; BASARAB et al., 2007), tais como pior motilidade espermática em touros jovens com melhor eficiência alimentar (AWDA et al., 2013). Assim, o objetivo foi avaliar as características seminais de machos jovens da raça Nelore classificados para baixo e alto CAR.

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo.

² Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, 16050-680, Araçatuba, São Paulo.

³ Instituto de Zootecnia, 13460-000, Nova Odessa, São Paulo.

* guilhermemedvet@yahoo.com.br

Material e Métodos

Foram utilizados 48 touros jovens da raça Nelore. Os animais são provenientes de linhas de seleção do Instituto de Zootecnia (IZ), cujos machos jovens, após o desmame aos sete meses de idade, permanecem em confinamento em teste de desempenho para determinação do CAR. Ao final do teste de desempenho, os animais são classificados em baixo CAR ($< \text{média} - 0,5 \text{ Diferença Esperada da Progênie} - \text{DEP}$) e alto CAR ($> \text{média} + 0,5 \text{ DEP}$) (MERCADANTE; RAZOOK, 2010). Após a classificação do CAR os animais foram divididos em 24 baixo CAR e 24 alto CAR. Os touros tinham $14,3 \pm 0,13$ meses de idade no início do experimento e atingiram $24,6 \pm 0,13$ meses de idade ao término e peso corporal inicial de $389,5 \pm 5,43$ kg. Estes foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv Marandu, acoplados com bebedouros e cocho de sal mineral ad libitum. As avaliações andrológicas foram realizadas a cada 28 dias, totalizando 12 colheitas. O perímetro escrotal (PE) foi efetuado com auxílio de uma fita milimétrica. As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de eletroejaculador. Logo após as colheitas foram avaliados em microscopia: o vigor espermático (numa escala de 0 - células paradas a 5 - movimento vigoroso e de alta velocidade); a concentração espermática (nos espermatozoides totais do ejaculado/mL, câmara de Neubauer - diluição 1:100); morfologia espermática (solução formol salina tamponada - defeitos espermáticos maiores, menores e totais) (CBRA, 2013). Adicionalmente, o sêmen in natura foi diluído em meio Botubov (sem glicerol; BotuFarma®) para concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. Após a diluição, as amostras foram submetidas à análise computadorizada da cinética espermática (CASA; Hamilton Thorne Research, IVOS-14, EUA). Foram avaliados os parâmetros: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade rápida (RAP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvelínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos cruzados (BCF; Hz), progressividade (STR; %) e linearidade (LIN; %). 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 análises de avaliação andrológica e dinâmica espermática não apresentaram diferença entre as classificações de CAR (Tabela 1). No entanto, foi observado diferença entre as características seminais entre os meses do ano de acordo com a idade dos animais. A figura 1 apresenta correlação inversa entre motilidade e concentração espermática com os defeitos maiores e totais ($P < 0,001$).

Tabela 1. Características seminais de 48 touros jovens da raça Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR). *EPM = erro padrão da média. 1 PE = perímetro escrotal; Vigor espermático; Conc = concentração espermática; Def. maiores = defeitos maiores; Def. totais = defeitos totais; MT = motilidade espermática total; MP = motilidade progressiva; RAP = velocidade espermática rápida; VAP = velocidade de trajeto; VSL = velocidade em linha reta; VCL = velocidade curvilinear; ALH = amplitude do deslocamento lateral de cabeça; BCF = frequência de batimentos cruzados, STR = retilinearidade; LIN = linearidade de movimento. 2 CAR = valor de P entre alto e baixo CAR; TEMP = valor de P entre as repetições a cada 28 dias; CAR*TEMP = valor de P entre as interações CAR e TEMP.

Variáveis ¹	CAR		EPM*	P-valor		
	Alto	Baixo		CAR	TEMP	CAR*TEMP
PE (cm)	30,4	31,4	0,42	0,10	<0,001	0,69
Vigor (1-5)	2,70	2,70	0,06	0,47	<0,001	0,80
Conc (x 10 ⁶ /mL)	310,2	383,5	40,3	0,20	<0,001	0,77
Def. maiores (%)	28,6	24,9	3,57	0,47	<0,001	0,80
Def. totais (%)	38,4	34,8	2,85	0,37	<0,001	0,82
MT (%)	71,5	76,2	2,18	0,12	<0,001	0,23
MP (%)	58,4	55,4	2,04	0,30	<0,001	0,23
RAP (%)	67,5	71,6	2,22	0,19	<0,001	0,21
VAP (µm/s)	86,9	87,6	1,58	0,75	<0,001	0,13
VSL (µm/s)	72,6	73,5	1,28	0,65	<0,001	0,10
VCL (µm/s)	137,5	138,4	3,51	0,83	<0,001	0,09
ALH (µm)	5,40	5,50	0,17	0,59	<0,001	0,19
BCF (Hz)	32,6	33,4	0,44	0,18	<0,001	0,11
STR (%)	83,7	84,1	0,40	0,61	<0,001	0,06
LIN (%)	56,6	56,9	0,87	0,80	<0,001	0,09

Fonte: Elaborado pelos autores.

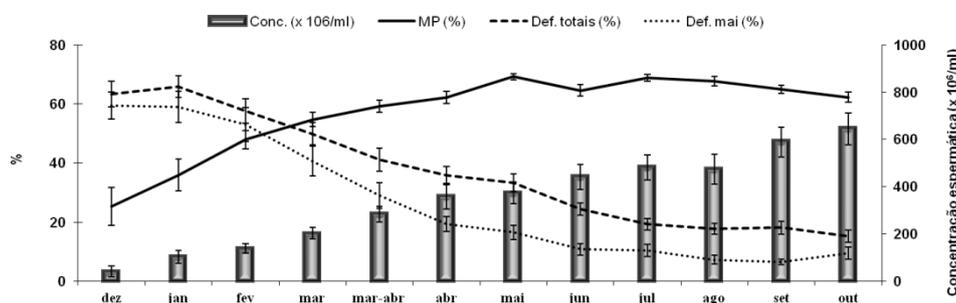


Figura 1. Motilidade progressiva, defeitos maiores, defeitos totais e concentração espermática mensais de touros jovens Nelore em pastejo classificados para consumo alimentar residual (CAR) suplementados ou não com fonte de ácidos graxos. Conc = concentração; Mot = motilidade; Def. totais = defeitos totais; Def mai = defeitos maiores. Fonte: Elaborado pelos autores

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 (BRITO et al., 2004). De acordo com CBRA (2013) as características seminais desejáveis para sêmen fresco são: motilidade $\geq 60\%$, concentração $\geq 350 \times 10^6$ espermatozoides/mL, defeitos maiores $\leq 10\%$ e totais $\leq 30\%$. No presente estudo, essas características foram observadas a partir do mês junho (Figura 1), no qual os animais apresentavam média de idade de 21 meses. Assim como essas variáveis, o PE, no presente estudo, apresentou correlação positiva com a idade dos touros, fato que já é conhecido tanto para os zebuínos, como para os taurinos (AHMAD et al., 2011).

Awda et al. (2013), avaliando touros de diferentes eficiências alimentares, observaram que animais baixo CAR tiveram diminuição da motilidade espermática progressiva. Segundo Wang et al. (2012), houve uma tendência ($P=0,07$) para uma maior proporção de touros jovens (1 ano de idade), baixo CAR, não cumprirem o mínimo de 60% exigido para motilidade espermática do que touros alto CAR. No entanto, Fox et al. (2004) não relataram diferença no PE, concentração do sêmen, motilidade e anormalidades espermáticas em touros Bonsmara classificados para alto, médio e baixo CAR. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, no qual não foi observada diferença entre os animais alto e baixo CAR para as características seminais.

Conclusões

A utilização de touros da raça Nelore classificados para baixo CAR é de suma importância para programas de melhoramento genético, pois além de apresentar melhor eficiência alimentar não tiveram prejuízos nas características seminais avaliadas dos 14 aos 24 meses de idade.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Referências

- AHMAD, E.; AHMAD, N.; NASEER, Z.; ALEEM, M.; KHAN, M. S.; 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, n. 1, p. 159-164, 2011.
- ARTHUR, P. F.; HERD, R. M.; WILKINS, J. F.; ARCHER, J. A. Maternal productivity of Angus cows divergently selected for post-weaning residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 45, n. 8, p. 985-993, 2005.
- AWDA, B. J.; MILLER, S. P.; MONTANHOLI, Y. R.; VANDER VOORT, G.; CALDWELL, T.; BUHR, M. M.; SWANSON, K. C. The relationship between feed efficiency traits and fertility in young beef bulls. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 93, n. 2, p. 185-192, 2013.
- BASARAB, J. A.; MCCARTNEY, D.; OKINE, E. K.; BARON, V. S. Relationships between progeny residual feed intake and dam productivity traits. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 87, n. 4, p. 489-502, 2007.
- BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; UNANIAN, M. M.; DOBE, M. A. N.; BARBOSA, R. T.; KASTELIC, J. P. Sexual development in early-and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1198-1217, 2004.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.
- FOX, J. T.; CARSTENS, G. E.; BROWN, E. G.; WHITE, M. B.; WOODS, S. A.; WELSH JUNIOR, T. H.; HOLLOWAY, J. W.; WARRINGTON, B. G.; RANDEL, R. D.; FORREST, D. W.; LUNT, D. K. Net feed intake of growing bulls and relationships with performance, fertility and ultrasound composition traits. **Beef Cattle Research in Texas**, p. 117-120, 2004.
- MERCADANTE, M. E. Z.; RAZOOK, A. G. Programa de melhoramento genético do Instituto de Zootecnia, Sertãozinho, SP. In: PIRES, A. V. **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010. p. 847-860. v. 2. cap. 44.
- WANG, Z.; COLAZO, M. G.; BASARAB, J. A.; GOONEWARDENE, L. A.; AMBROSE, D. J.; MARQUES, E.; PLASTOW, G.; MILLER, S. P.; MOORE, S. S. Impact of selection for residual feed intake on breeding soundness and reproductive performance of bulls on pasture-based multisire mating. **Journal of animal science**, v. 90, n. 9, p. 2963-2969, 2012.

Caracterização da cinética espermática, antes e após Percoll®, no sêmen de touros de alto e baixo desempenho na produção *in vitro* de embriões

Luana de Cássia Bicudo^{1*}, Adriano Felipe Perez Siqueira¹, Letícia Signori de Castro¹, Vivian da Silva Cardoso Pinto¹, Camilla Mota Mendes¹, Daniel de Souza Ramos Angrimani¹, Thais Rose dos Santos Hamilton¹, Tamie Guibu de Almeida¹, Marcílio Nichi¹, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção¹

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de estabelecer parâmetros preditivos de touros, avaliando os parâmetros de cinética espermática, antes e após a seleção do sêmen, pela centrifugação em gradiente de Percoll® em touros que apresentaram altas e baixas taxas de blastocisto. A partir do banco de dados de 3 anos, obtida pelo laboratório comercial de produção *in vitro* (PIVE), foram selecionados 5 touros dentre os 10 que apresentaram as baixas taxas de produção de blastocistos (Grupo BB) e 5 touros entre os 10 que apresentaram altas taxas (Grupo AB). As amostras de sêmen congelados de cada touro foram avaliadas pelo Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA) imediatamente após a descongelação e o gradiente Percoll® (45% / 90%). O grupo AB apresentou maiores valores de VCL (velocidade curvilínea) e ALH (amplitude lateral da cabeça) e valores mais baixos de STR (retilinearidade) e LIN (linearidade) nos momentos avaliados e valores mais baixos antes do Percoll®, enquanto o grupo BB tinha maiores valores de motilidade progressiva após Percoll®. Amostras seminais de touros com alto desempenho para a taxa de blastocisto na fertilização *in vitro*, mostraram características de cinética na hiperativação antes e após a seleção espermática no gradiente Percoll®, sendo um possível preditor do desempenho dos touros nesta biotecnologia reprodutiva.

Palavras-chave: Bovino. Fertilidade. PIVE.

Characterization of spermatic kinetics, before and after Percoll®, the semen of bulls of high and low performance *in vitro* embryos production

Abstract: The objective of this study was to establish a bull performance predictor by evaluating sperm kinetic parameters before and after sperm selection by Percoll® gradient centrifugation from bulls that had presented high and low blastocyst rates. From the 3 year database obtained by a commercial laboratory of *in vitro* fertilization (IVF), 5 bulls were selected from among the 10 that presented the lowest mean rates of blastocyst production (Group BB) and 5 bulls among the 10 that presented the highest mean (Group AB). Samples of frozen semen from each bull were evaluated by CASA immediately after thawing and after Percoll® gradient (45%/90%). The AB group presented higher values of VCL (curvilinear velocity) and ALH (lateral head displacement amplitude) and lower values of STR (progressivity) and LIN (linearity) in both evaluated moments and lower BCF values before Percoll®, while the group BB had higher progressive motility values after Percoll®. Seminal samples of bulls with high performance for the blastocyst rate in the IVF, show kinetics characteristic of hyperactivation before and after the sperm selection in the Percoll® gradient, being a possible predictor of the performance of bulls in this reproductive biotechnology.

Keywords: Bovine. Fertility. IVF.

¹ Universidade de São Paulo, 05508-270, São Paulo, São Paulo.

* luanacbicudo@gmail.com

Introdução

A cinética espermática é considerada um dos atributos mais importantes na avaliação da qualidade seminal, pois reflete a viabilidade e a integridade estrutural dos espermatozoides (KATHIRAVAN et al., 2011). O sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) permite a constatação objetiva de diversos parâmetros de forma mais acurada e precisa (VERSTEGEN et al., 2002; AMANN; KATZ, 2004). Apesar da influência da cinética espermática sobre a performance reprodutiva ser amplamente estudada (KATHIRAVAN et al., 2011; BUDWORTH et al., 1987; DEL OMO et al., 2013), não há um consenso sobre qual padrão de cinética é característico de touros com alto desempenho na produção in vitro de embriões (PIVE) (SUZUKI et al., 2003; KATHIRAVAN et al., 2008). O objetivo deste trabalho foi diferenciar touros de alto e baixo desempenho na PIVE, considerado pela taxa de blastocisto, por meio dos parâmetros de cinética espermática em CASA, antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll®, a fim de se estabelecer parâmetros preditivos para a seleção de touros com maior eficiência nesta biotecnologia.

Material e Métodos

A partir do banco de dados obtidos em um período de três anos da empresa In Vitro Brasil, foram detectados 100 touros que haviam sido utilizados em pelo menos 5 procedimentos e com mais de 10 oócitos/procedimento. As médias das taxas de blastocisto foram ranqueadas de forma crescente e, de acordo com a disponibilidade comercial. Foram selecionados 5 touros dentre os 10 que apresentaram as maiores médias e 5 touros dentre os 10 que apresentaram as menores médias. Assim, estabeleceram-se dois grupos experimentais: Grupo de touros que resultou em baixa taxa de blastocisto (BB) e Grupo de touros que resultou em alta taxa de blastocisto (AB). Amostras de sêmen de cada touro de ambos os grupos foram descongeladas e analisadas no CASA (Hamilton Thorne IVOS, v.12.2.), logo após a descongelação (Pré-Percoll®) e depois da seleção espermática por centrifugação em gradiente de Percoll® 45% e 90% (Pós-Percoll®). Os dados foram avaliados utilizando-se o SAS para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Diferenças entre os grupos (BB x AB) e os momentos foram analisadas por meio de testes paramétricos (Teste t) e não paramétricos (Wilcoxon). Os resultados foram descritos como média e erro padrão, utilizando-se nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A comparação dos resultados dos parâmetros de cinética espermática avaliados por CASA entre os grupos BB e AB, logo após a descongelação do sêmen e após a centrifugação em gradiente de Percoll®, estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Média ± erro padrão dos parâmetros de cinética espermática avaliados em sistema computadorizado (CASA), no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de blastocisto Baixa (BB) e Alta (AB), antes da centrifugação em gradiente de Percoll® (Pré-Percoll®). MT – Motilidade Total; MP – Motilidade Progressiva; VAP – Velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade; Rapid - Espermatozoides com velocidade rápida, Medium - Espermatozoides com velocidade média; Slow - Espermatozoides com velocidade lenta; Static - Espermatozoides estáticos.

Parâmetro	Sêmen descongelado Pré-Percoll®		
	Grupo BB	Grupo AB	P
MT (%)	50,2 ± 4,4	46,3 ± 4,9	0,5560
MP (%)	40,9 ± 4,4	29,9 ± 3,5	0,0607
VAP (µm/s)	103,2 ± 3,0	110,1 ± 3,1	0,1045
VSL (µm/s)	88,1 ± 3,4	83,9 ± 3,1	0,3661
VCL (µm/s)	178,1 ± 7,1	211,2 ± 7,5	0,0033
ALH (µm)	6,8 ± 0,4	8,4 ± 0,3	0,0043
BCF (Hz)	37,3 ± 1,3	33,0 ± 1,0	0,0198
STR (%)	85,0 ± 1,7	77,1 ± 1,5	0,0016
LIN (%)	52,7 ± 2,3	43,3 ± 1,8	0,0030
Rapid (%)	46,9 ± 4,4	42,5 ± 4,6	0,4884
Medium (%)	3,0 ± 0,5	3,7 ± 0,7	0,4773
Slow (%)	14,9 ± 2,2	19,0 ± 2,5	0,2378
Static (%)	34,9 ± 4,2	34,7 ± 4,7	0,9834

Fonte: Elaborado pelos autores.

Tabela 2. Média \pm erro padrão dos parâmetros de cinética espermática avaliados em sistema computadorizado (CASA), no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de blastocisto Baixa (BB) e Alta (AB), após a centrifugação em gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®). MT – Motilidade Total; MP – Motilidade Progressiva; VAP – Velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva; VCL – Velocidade curvilinear; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade; Rapid - Espermatozoides com velocidade rápida, Medium - Espermatozoides com velocidade média; Slow - Espermatozoides com velocidade lenta; Static - Espermatozoides estáticos.

Parâmetro	Sêmen descongelado Pós- Percoll®		
	Grupo BB	Grupo AB	P
MT (%)	60,3 \pm 2,8	54,5 \pm 3,2	0,1831
MP (%)	47,6 \pm 3,3	34,7 \pm 2,7	0,0050
VAP (μ m/s)	104,9 \pm 4,3	107,4 \pm 3,7	0,6724
VSL (μ m/s)	88,0 \pm 4,4	81,1 \pm 3,1	0,2119
VCL (μ m/s)	197,0 \pm 6,0	224,4 \pm 8,5	0,0139
ALH (μ m)	7,9 \pm 0,3	9,3 \pm 0,4	0,0190
BCF (Hz)	35,7 \pm 1,6	33,4 \pm 1,2	0,2606
STR (%)	82,9 \pm 1,3	75,4 \pm 1,4	0,0004
LIN (%)	46,6 \pm 1,4	38,6 \pm 1,5	0,0007
Rapid (%)	56,2 \pm 3,2	50,7 \pm 3,3	0,2418
Medium (%)	4,1 \pm 0,6	3,8 \pm 0,6	0,7107
Slow (%)	11,3 \pm 1,6	10,4 \pm 1,7	0,7381
Static (%)	28,2 \pm 1,6	35,0 \pm 3,1	0,0664

Fonte: Elaborado pelos autores.

As diferenças obtidas nos parâmetros de cinética espermática entre os grupos de touros que resultaram em baixa e alta taxa de blastocisto reafirmam a influência deste atributo no desempenho reprodutivo (DEL OMO et al., 2013; SUZUKI et al., 2003; KATHIRAVAN et al., 2008). Os valores mais altos nos parâmetros de VCL e ALH e mais baixos de LIN, encontrados no grupo AB, tanto antes quanto após a seleção em gradiente de Percoll® sugerem que estas células apresentam cinética característica de hiperativação (MORTIMER, 1997). Uma vez que a motilidade hiperativada é um indicio de capacitação (KATHIRAVAN et al., 2011), hipotetizou-se que uma maior proporção de espermatozoides de touros com alto desempenho na PIVE passa pelo processo de capacitação mais rapidamente, o que reflete em benefícios à fecundação e posteriormente ao desenvolvimento embrionário. Esta capacitação precoce pode ser desejável no procedimento de fecundação *in vitro* (BLOTTNER et al., 1990), uma vez que nesta biotécnica os espermatozoides são depositados ao meio juntamente com os oócitos e devem passar pelo processo de capacitação e fecundação tão logo quanto possível, não sendo necessária a manutenção da viabilidade espermática por longos períodos (HARRISON, 1996). A superioridade no valor de motilidade progressiva encontrada no grupo BB pós-Percoll® também foi relatada por Tanghe et al. (2002), que demonstraram que este método de seleção espermática foi capaz de aumentar a motilidade total e progressiva, principalmente em amostras seminais de touros de baixa fertilidade *in vitro*. Entretanto, o Percoll® não é capaz de aumentar a fertilidade *in vitro* (SUZUKI et al., 2003).

Conclusões

Amostras seminais de touros que resultam em alta taxa de blastocisto na PIVE apresentam características de cinética no CASA, típica de hiperativação, tanto antes quanto após a seleção espermática por centrifugação em gradiente de Percoll®, podendo esta condição ser um possível preditor do desempenho *in vitro* de touros.

Agradecimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Referências

- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Andrology lab corner: reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.
- BLOTTNER, S.; NEHRING, H.; TORNER, H. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin *in vitro*: relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, p. 619-628, 1990.
- BUDWORTH, P. R.; AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity of bull sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 9, p. 1927-1936, 1987.
- DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; MAROTO-MORALES, A.; GARCIA-ALVAREZ, O.; RAMON, M.; JIMENEZ-RABADAN, P.; MARTINEZ-PASTOR, F.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J.; FERNANDEZ-SANTOS, M. R. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 1, p. 102-109, 2013.
- HARRISON, R. A. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 4, p. 581-594, 1996.
- KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M. J.; VEERAPANDIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with *in vitro* fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 1, p. 9-17, 2008.
- KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.; KARDIVEL, G. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 165-172, 2011.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.
- SUZUKI, K.; GESHI, M.; YAMAUCHI, N.; NAGAI, T. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. **Animal Reproduction Science**, v. 77, n. 3, p. 157-172, 2003.
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; STERCKX, V.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 3, p. 127-132, 2002.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

Categorização computadorizada da motilidade de espermatozoides criopreservados de touros compostos após desafio térmico *in vitro*

Daniela Botta^{1*}, Rubens Paes de Arruda², Carla Patrícia Teodoro de Carvalho², Narian Romanello¹, Messy Hannear de Andrade Pantoja¹, Andrea do Nascimento Barreto¹, Amanda Prudêncio Lemes³, Alessandro Giro¹, Ana Beatriz Moura⁴, Alexandre Rossetto Garcia⁵

Resumo: As amostras de sêmen criopreservado de 5 touros foram descongelados e submetidos a desafio térmico usando incubação a 38,0°C (Tratamento 1) e 39,5°C (Tratamento 2). As amostras foram analisadas imediatamente após a descongelação (M0) e após 1 hora de incubação (M1). As seguintes variáveis foram determinadas: motilidade total, porcentagem de espermatozoides com movimento rápido, médio ou lento e porcentagem de espermatozoides estáticos. As análises foram feitas usando o Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA). Os dados foram submetidos à análise de variância e os meios foram comparados utilizando o teste de Tukey ($P < 0,05$). A incubação do sêmen coletado a 38,0°C não influenciou a motilidade total, e a porcentagem de espermatozoides com movimento rápido, médio, lento. Não foi observada diferença significativa entre M0 e M1 a 38,0°C. Sob 39,5°C, todas as variáveis responderam de forma semelhante, com diferença significativa entre os tempos de avaliação. Assim, a incubação de 1 hora a 38°C, não afetou a motilidade total e suas categorizações, enquanto a incubação a 39,5°C por 1 hora reduziu significativamente os padrões de motilidade.

Palavras-chave: Canchim. CASA. Estresse térmico.

Computerized categorization of motility of cryopreserved spermatozoa of composite bulls after *in vitro* thermal challenge

Abstract: Samples of cryopreserved semen of 5 composite bulls were thawed and subjected to thermal challenge using incubation at 38.0°C (Treatment 1) and 39.5°C (Treatment 2). Samples were evaluated immediately after thawing (M0) and after 1 hour of incubation (M1). The following variables were determined: total motility, percentage of spermatozoa showing fast, medium or slow movement, and percentage of static spermatozoa. Analyses were done using Computerized System of Semen Analysis (CASA). Data were submitted to analysis of variance and means were compared using Tukey test ($P < 0.05$). Despite the semen donor, incubation at 38.0 °C did not influence the total motility, the percentage of fast, medium, slow and percentage of static spermatozoa. No significant difference was observed between M0 and M1 at 38.0°C. Under 39.5°C all variables responded similarly, with significant difference between the evaluation times. Thus, incubation for 1 hour at 38°C did not affect the total motility and their categorizations, while incubation at 39.5°C for 1 hour significantly reduced the motility patterns.

Keywords: Canchim. CASA. Thermal stress.

Introdução

É indiscutível que a criopreservação do sêmen de maneira adequada é essencial para o avanço do uso de diversas biotécnicas de reprodução assistida (PAPA et al., 2000) e para o melhoramento animal em diferentes espécies. Quando comparado com o sêmen a fresco ou refrigerado, o sêmen criopreservado apresenta índices de fertilidade menores. Este fato pode ser explicado pelos desafios enfrentados pela célula durante os processos de congelamento e descongelamento (WATSON, 2000). Os padrões de motilidade expressos no sêmen são influenciados pelas

¹ Universidade Federal do Pará, Caixa Postal, 68746-360, Castanhal, Pará.

² Universidade de São Paulo, Caixa Postal, 13635-900, Pirassununga, São Paulo.

³ Universidade Estadual Paulista, Caixa Postal, 14884-900 Jaboticabal, São Paulo.

⁴ Universidade Federal Fluminense, Caixa Postal, 24220-900, Niterói, Rio de Janeiro.

⁵ Embrapa Pecuária Sudeste, Caixa Postal 339, 13560-970, São Carlos, São Paulo

* dani_botta@hotmail.com

características individuais dos espermatozoides, sendo estas células passíveis de serem classificadas em subpopulações, de acordo com a categorização da motilidade apresentada. Cada subpopulação tem a capacidade de responder de forma distinta aos desafios enfrentados naturalmente ou induzidos no ambiente (FAROOQ et al., 2017). Considerando a importância dessa variável como indicador de potencial fertilidade, o objetivo do trabalho foi avaliar de modo automatizado as categorias de motilidade dos espermatozoides do sêmen criopreservado de diferentes touros compostos, após desafio térmico realizado in vitro.

Material e Métodos

Sêmen de 5 touros da raça Canchim (*Bos taurus* x *Bos indicus*) foi coletado por vagina artificial, diluído em citrato-gema e criopreservado (ABUD et al., 2014) em palhetas plásticas de 0,5 mL. Foram criopreservados 4 ejaculados por touro, totalizando 20 ejaculados. As amostras seminais foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos, sendo posteriormente transferidas para microtubos previamente aquecidos. O sêmen foi incubado em laboratório, sob duas temperaturas distintas, que compuseram os tratamentos: incubação a 38,0°C (Tratamento 1) ou a 39,5°C (Tratamento 2). O tempo total de incubação foi de 1 hora. As amostras passaram por avaliação logo após a descongelação (Momento 0 = M0) e após a incubação (Momento 1 = M1). Foram realizadas avaliações de motilidade por meio do Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA), realizadas com o equipamento HTM-IVOS (versão 12.3, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, Massachusetts, EUA). Foram analisadas a motilidade total (%) e determinadas as subpopulações de espermatozoides com movimento rápido, médio, lento e estático (%). O set up adotado foi previamente ajustado para a espécie bovina. Para a realização das análises, a concentração espermática foi previamente ajustada para 40 milhões de espermatozoides/mL por diluição em meio Talp, sendo posteriormente depositada uma gota de 10µL de sêmen em câmara de leitura (Makler Counting Chamber, SEFI Medical Instruments LTD, Haifa, Israel). Em cada amostra, foram selecionados 5 campos para a leitura e análise. A análise estatística foi realizada de modo descritivo, e compreendeu também as análises de normalidade dos resíduos, análise de variância e teste de comparação de médias (Teste de Tukey). O nível de significância previamente adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão

Os resultados de motilidade total estão apresentados na (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre touros no mesmo momento de avaliação. A temperatura de 38,0°C não determinou diferença significativa ao longo do tempo de incubação, independentemente de touro. Para a temperatura de 39,5°C houve diferença significativa após a incubação, para todos os touros. Nesta temperatura, houve decréscimo da motilidade para valores iguais ou próximos a 0 após a incubação. A queda acentuada na motilidade total após a incubação à temperatura de 39,5°C pode ser decorrente da perda de componentes intracelulares ou de lesões estruturais ocorridas na cauda dos espermatozoides (HARRISON; VICKERS, 1990). A motilidade espermática é dependente das concentrações de ATP, pois o processo de movimentação flagelar requer uma grande demanda de energia. Desta forma, o aumento da temperatura e consequentes lesões em mitocôndrias e axonema pode diminuir a produção de ATP e a motilidade espermática (RODRIGUES-MARTINEZ et al., 1997).

Tabela 1. Médias e desvios-padrão da porcentagem de motilidade total de sêmen criopreservado observada em diferentes touros após a descongelação (M0) e após a incubação por 1 hora (M1) nas temperaturas de 38,0°C e 39,5°C. (a,b) letras minúsculas distintas indicam diferença significativa nas linhas e (A,B) letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa nas colunas (P<0,05).

Touro	38,0°C		39,5°C	
	M0	M1	M0	M1
I	49.0 ± 12.5 ^{Aa}	34.3 ± 10.9 ^{Aa}	44.3 ± 15.5 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
II	55.3 ± 4.9 ^{Aa}	45.0 ± 15.4 ^{Aa}	54.0 ± 1.8 ^{Aa}	0.8 ± 1.5 ^{Ab}
III	54.0 ± 4.8 ^{Aa}	54.8 ± 5.9 ^{Aa}	57.8 ± 8.3 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
IV	53.5 ± 12.7 ^{Aa}	39.8 ± 26.5 ^{Aa}	50.5 ± 12.8 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
V	53.3 ± 6.7 ^{Aa}	42.3 ± 15.7 ^{Aa}	58.3 ± 11.4 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}

Fonte: Elaborado pelos autores.

A categorização da motilidade total está apresentada na Tabela 2. Não houve diferença entre touros para as variáveis estudadas. Sob temperatura de 38,0°C a porcentagem de espermatozoides com movimento rápido após a incubação apresentou diferença significativa para um único touro (Touro I), com diminuição da porcentagem no M1. Para os demais touros, não houve diferença significativa entre M0 e M1. A subpopulação de espermatozoides com movimentos médio, lento e estático não apresentou diferença significativa após a incubação na temperatura de

38,0°C. Quando o sêmen foi incubado na temperatura de 39,5°C houve diferença significativa em todas as subpopulações de todos os ejaculados estudados.

Neste estudo, a motilidade total do sêmen e as subpopulações espermáticas comportaram-se de maneira semelhante, independentemente dos touros avaliados. O tratamento com temperatura mais alta foi capaz de afetar com maior intensidade essas variáveis, prejudicando as características de motilidade de cada touro após a incubação. Os resultados diferem dos apresentados por Muiño et al. (2008), que observaram que temperatura mais alta na descongelação (50,0°C/15seg) favoreceu, após a incubação por 2 horas a 37,0°C, a subpopulação de espermatozoides com movimento rápido e progressivo. Este fato sugere que os danos causados ao espermatozoide são potencializados não somente pelo estresse térmico ao qual o espermatozoide é submetido, mas também pelo tempo em que a célula é mantida sob condição de estresse.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão da porcentagem de espermatozoides com movimentos rápido, médio, lento e estáticos, observados em sêmen de diferentes touros após descongelação (M0) e incubação por 1 hora nas temperaturas de 38,0°C ou 39,5°C. A, B letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa nas colunas (P<0,05). a, b letras minúsculas distintas indicam diferença significativa nas linhas (P<0,05).

Touro	38,0°C		39,5°C	
	M0	M1	M0	M1
Movimento Rápido				
I	39.3 ± 11.4 ^{Aa}	22.8 ± 6.7 ^{Ab}	37.8 ± 14.2 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
II	48.8 ± 6.1 ^{Aa}	31.8 ± 21.6 ^{Aa}	49.3 ± 2.2 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
III	46.3 ± 1.5 ^{Aa}	48.3 ± 7.9 ^{Aa}	52.5 ± 7.5 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
IV	47.5 ± 13.0 ^{Aa}	31.0 ± 26.6 ^{Aa}	46.0 ± 13.0 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
V	49.8 ± 5.4 ^{Aa}	38.5 ± 15.6 ^{Aa}	55.3 ± 10.9 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
Movimento Médio				
I	10.3 ± 5.6 ^{Aa}	11.8 ± 5.9 ^{Aa}	6.3 ± 3.9 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
II	6.5 ± 2.6 ^{Aa}	13.3 ± 8.1 ^{Aa}	4.8 ± 1.3 ^{Aa}	0.8 ± 1.5 ^{Ab}
III	7.8 ± 3.6 ^{Aa}	6.5 ± 4.4 ^{Aa}	5.3 ± 2.1 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
IV	6.0 ± 2.7 ^{Aa}	8.8 ± 3.0 ^{Aa}	4.3 ± 1.3 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
V	3.5 ± 1.9 ^{Aa}	3.8 ± 1.0 ^{Aa}	2.5 ± 0.6 ^{Aa}	0.0 ± 0.0 ^{Ab}
Movimento Lento				
I	37.8 ± 5.4 ^{Aa}	36.0 ± 8.6 ^{Aa}	33.0 ± 9.9 ^{Aa}	0.8 ± 1.0 ^{Ab}
II	32.5 ± 8.2 ^{Aa}	24.3 ± 7.2 ^{Aa}	30.0 ± 8.6 ^{Aa}	1.0 ± 1.4 ^{Ab}
III	35.5 ± 6.5 ^{Aa}	29.5 ± 8.3 ^{Aa}	30.8 ± 6.4 ^{Aa}	0.5 ± 1.0 ^{Ab}
IV	28.5 ± 7.8 ^{Aa}	27.5 ± 12.8 ^{Aa}	26.5 ± 8.7 ^{Aa}	0.5 ± 0.6 ^{Ab}
V	27.5 ± 4.8 ^{Aa}	26.5 ± 5.5 ^{Aa}	23.8 ± 5.7 ^{Aa}	1.0 ± 2.0 ^{Ab}
Estáticos				
I	13.3 ± 10.0 ^{Aa}	29.8 ± 19.4 ^{Aa}	22.8 ± 22.3 ^{Aa}	99.3 ± 1.0 ^{Ab}
II	12.3 ± 7.8 ^{Aa}	31.0 ± 21.6 ^{Aa}	16.0 ± 10.1 ^{Aa}	98.3 ± 1.5 ^{Ab}
III	10.0 ± 6.4 ^{Aa}	15.8 ± 4.1 ^{Aa}	11.8 ± 4.1 ^{Aa}	99.5 ± 1.0 ^{Ab}
IV	18.0 ± 16.8 ^{Aa}	33.0 ± 30.1 ^{Aa}	23.3 ± 15.2 ^{Aa}	99.5 ± 0.6 ^{Ab}
V	19.5 ± 5.4 ^{Aa}	31.3 ± 20.6 ^{Aa}	18.3 ± 10.6 ^{Aa}	99.0 ± 2.0 ^{Ab}

Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

A incubação do sêmen criopreservado na temperatura de 38,0°C, por 1 hora, manteve a motilidade total e a porcentagem de espermatozoides com movimento rápido, médio, lento e estáticos. Porém, a incubação a 39,5°C por 1 hora prejudicou intensamente a motilidade total dos ejaculados.

Referências

ABUD, C. O. G.; ABUD, L. J.; CARVALHO NETO, J. de O.; DODE, M. A. N.; SERENO, J. R. B.; MARTINS, C. F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 32-37, 2014.

FAROOQ, U.; MALECKI, I. A.; MAHMOOD, M.; MARTIN, G. B. Appraisal and standardization of curvilinear velocity (VCL) cut-off values for CASA analysis of Japanese quail (*Coturnix japonica*) sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 3, p. 389-396, 2017.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

MUINO, R.; RIVERA, M. M.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; PENA, A. I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1, p. 50-64, 2008.

PAPA, F. O.; GABALDI, S. H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n. 1, p. 39-43, 2000.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n. 3, p. 297-308, 1997.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

Centrifugação de sêmen em camada única de Percoll PLUS® antes do congelamento para seleção de espermatozoides bovinos

Alicio Martins Júnior^{1}, Fernanda Nunes Marqu², Tatiana Issa Uherara Berton³, Tairini Érica da Cruz², Diego Gouvêa de Souza⁴*

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de verificar os efeitos da centrifugação em camada única (CCU) com Percoll Plus® na qualidade do sêmen congelado/descongelado de touro. Os ejaculados de três touros (6 repetições) foram misturados antes de colocar 1 bilhão de espermatozoides diluídos (D; 1: 2 no “pool” de sêmen) ou sem diluição (ND) depositada no topo de uma coluna de 9 mL (90% ou 70%) para formar os grupos 70D, 70UD, 90D e 90UD. O grupo controle (C) não foi submetido a centrifugação. O sêmen descongelado foi analisado através de análise computadorizada da cinética espermática. Foi observada maior proporção de espermatozoides com motilidade progressiva ($P < 0,05$) no grupo 70D, do que no grupo C. Da mesma forma, 70D apresentou valores mais altos para VCL, VSL, VAP e ALH do que 90D, com resultados semelhantes entre os grupos para BCF, LIN e STR. Em conclusão, a SLC foi eficaz com maior proporção de espermatozoides com motilidade progressiva no grupo 70D, ao mesmo tempo que preservava os bons parâmetros espermáticos similares observados no grupo controle.

Palavras-chave: Colóide. Sêmen. CASA.

Single-layer semen centrifugation with Percoll PLUS® before freezing for selection of bull spermatozoa

Abstract: This study aimed to verify the effects of single-layer centrifugation (SLC) with Percoll Plus® on quality of frozen/thawed bull sperm. The ejaculates of three bulls (6 replicates) were mixed before placing 1 billion of spermatozoa either diluted (D; 1:2 in semen extender) or undiluted (UN) on top of 9-mL column of Percoll (90% or 70%) to form 70D, 70UD, 90D, and 90UD groups. The control (C) group was not subjected to centrifugation. Thawed sperm was assessed through computer assisted sperm analysis. Higher proportion of sperm with progressive motility ($P < 0.05$) was observed in 70D than in C group. Similarly, 70D showed higher values for VCL, VSL, VAP, and ALH than 90D with similar results among groups for BCF, LIN, and STR. In conclusion, SLC was effective in promoting higher proportion of progressively motile spermatozoa in the 70D group while preserving the similar good sperm parameters observed in the control group.

Keywords: Colloid. Semen. CASA.

Introdução

O sucesso na criopreservação de sêmen reside na manutenção de espermatozoides viáveis, com estrutura intacta e membrana plasmática funcional (JOHNSON et al., 2000). O estabelecimento de protocolo eficiente para a seleção de espermatozoides, pré-congelamento, é de grande importância para a obtenção de população espermática com maior viabilidade/qualidade para o congelamento, e subsequente pós-descongelamento.

A centrifugação de sêmen congelado em gradiente descontínuo de Percoll®, na PIVE de bovinos, recupera maior número de espermatozoides com motilidade superior (BERGER et al., 1985). Contudo, estudos sobre a seleção de espermatozoides através de centrifugação em camada única (CCU) de colóide, antes do congelamento, são raros, em bovinos (MARTINEZ-ALBORCIA et al., 2012), e foram realizados com Androcoll-B (HALLAP, 2011), exceção ao trabalho desenvolvido em nosso laboratório com o Percoll® (BRAGATO et al., 2015), o qual, devido ao seu efeito

¹ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, 16050-680, Araçatuba, São Paulo.

² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 18618-970, Botucatu, São Paulo.

³ Central de Congelamento de Sêmen Tairana, 19160-000, Presidente Prudente, São Paulo.

⁴ Master Fertility Reprodução Animal Ltda, 16015-515, Araçatuba, São Paulo.

* amartins@fmva.unesp.br

tóxico, tem sido substituído por outros coloides, como o iodixanol e o coloide de sílica recoberta por glicerolpropilsilano (silano).

Apesar de o Percoll PLUS® ser à base de silano, nenhum relato foi encontrado na literatura sobre seu emprego de para seleção de espermatozoides de touro através de CCU. Assim, este experimento foi delineado com o objetivo de verificar os efeitos da centrifugação de sêmen de touro em camada única de Percoll PLUS®, em duas diferentes concentrações, com ou sem prévia diluição do ejaculado, pré-congelamento, sobre os parâmetros de motilidade e de movimento espermáticos pós-descongelamento.

Material e Métodos

Três touros da raça Nelore, com idades entre 24 e 38 meses, mantidos em regime de colheita de sêmen, na Central de Congelamento de Sêmen Tairana (Presidente Prudente-SP), foram utilizados no experimento. Somente ejaculados (seis/colheitas/animal) com motilidade $\geq 60\%$, vigor ≥ 3 , concentração $\geq 700 \times 10^6$ e células normais $\geq 70\%$ (sendo no máximo 30% de defeitos totais e 10% de defeitos maiores) foram utilizados no experimento. A seguir, três amostras de cada touro foram misturadas para formar um “pool” de sêmen e 1 bilhão de espermatozoides, sem diluição (SD) ou diluído (D; 1:2) em meio de congelamento base (MCB; TRIS, ácido cítrico, frutose, gema e antibióticos), foi depositada no topo de uma coluna de 9 mL de Percoll PLUS® (GE Healthcare, Suécia), em tubos cônicos de 15 mL, nas concentrações de 70% e 90%, para formar os grupos 70D, 70SD, 90D e 90SD. O sêmen do grupo controle não foi centrifugado.

Após a centrifugação (700 x g/13 min), o sobrenadante foi removido, as amostras (“pellets”) diluídas em MCB (acrescido de 7% de glicerol), refrigeradas por 5 horas (5°C), e então, envasadas em palhetas de 0,5 mL para posterior congelamento. Decorridos 30 dias, as amostras (duas/colheita/grupo) foram descongeladas e submetidas à análise computadorizada (MMC Sperm, São Petersburgo, Rússia), sendo avaliados os parâmetros de motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VAP ($\mu\text{m/s}$), LIN (%), STR (%), ALH (μm) e BCF (Hz). ANOVA e teste de Tukey foram utilizados para verificar diferenças estatísticas, adotando-se diferenças de $P < 0,05$ como significativas.

Resultados e Discussão

De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo relatando o emprego de centrifugação de sêmen de touro em camada única com Percoll PLUS®, antes do congelamento, visando à obtenção de população de espermatozoides com maior viabilidade/ qualidade para o congelamento. Assim, maior proporção de espermatozoides com MP ($P < 0,05$) foi observada no grupo 70D (49%) do que no grupo C (29%), com valores similares entre os demais grupos submetidos à CCU e o grupo C. Em relação aos parâmetros de velocidade espermática, maiores valores ($P < 0,05$) foram obtidos no grupo 70D do que nos grupos 90SD (VSL e VAP) e 90D (VCL, VSL e VAP), sendo estes similares àqueles observados nos grupos 70SD e C, embora nestes, as médias não tenham diferido daquelas dos grupos 90SD e 90D. Para a variável ALH, diferença significativa ($P < 0,05$) ocorreu entre C e 70D em comparação com os grupos 90SD e 90D. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos para as características espermáticas BCF, LIN e STR (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos da centrifugação do sêmen de touro em camada única de Percoll PLUS® sobre as características de motilidade e de movimento de espermatozoides, pós-descongelamento, segundo a concentração de coloide (70% ou 90%) e sêmen diluído (D) ou não diluído (SD) em meio de congelamento base. Médias seguidas de letras diferentes, na linha, diferem entre si ($P < 0,05$).

Variável	Controle	70SD	70D	90SD	90D
	Média (\pm DP)	Média (\pm DP)	Média (\pm DP)	Média (\pm DP)	Média (\pm DP)
M	55,6 \pm 12	61,2 \pm 8,1	64,1 \pm 14,8	57,0 \pm 5,4	56,4 \pm 11,0
MP	29,0 \pm 5,5 b	44,9 \pm 5,8 ab	49,0 \pm 12 a	43,1 \pm 7,2 ab	41,5 \pm 9,3 ab
VCL	126,0 \pm 21 a	120,8 \pm 4,6 ab	123,2 \pm 6,2 a	101,5 \pm 7,9 ab	92,5 \pm 20,9 b
VSL	54,6 \pm 7,0 ab	57,9 \pm 1,2 ab	59,5 \pm 3,1 a	51,0 \pm 6,6 b	50,3 \pm 5,3 b
VAP	79,0 \pm 12,1 ab	80,8 \pm 2,0 ab	82,9 \pm 4,2 a	68,7 \pm 7,7 b	69,2 \pm 8,0 b
ALH	1,9 \pm 0,2 a	1,7 \pm 0,14 ab	1,8 \pm 0,10 a	1,4 \pm 0,05 c	1,4 \pm 0,7 bc
BCF	6,1 \pm 0,4	6,1 \pm 0,40	6,1 \pm 0,34	5,8 \pm 0,2	6,2 \pm 0,6
LIN	40,0 \pm 0,02	48,0 \pm 0,01	47,0 \pm 0,04	49,0 \pm 0,03	49,0 \pm 0,04
STR	70,0 \pm 0,02	71,0 \pm 0,01	70,0 \pm 0,02	71,0 \pm 0,02	71,0 \pm 0,03

Fonte: Elaborado pelos autores.

Nossos achados para a MP estão em concordância com os achados de Hallap (2011), o qual relatou melhores taxas de MP em relação ao grupo controle (sem CCU), quando a seleção espermática foi realizada através de CCU com Androcoll-B, antes do congelamento, o mesmo sendo observado por Bragato et al. (2015), utilizando o Percoll® como coloide. Outros achados de literatura preconizam que a MP contribui mais significativamente para prever a taxa de não retorno ao cio do que os parâmetros espermáticos cinéticos. Embora, ainda, não tenhamos realizado as análises utilizando citometria de fluxo, menor dano de cromatina foi relatado no grupo de espermatozoides selecionados através de CCU, com Androcoll-B, em comparação ao grupo submetido à centrifugação (GOODLA et al., 2014). Da mesma forma, a CCU com Androcoll-B foi eficaz ao selecionar suficiente número de espermatozoides normais, a partir de ejaculados com alta incidência de espermatozoides polimórficos (MORRELL et al., 2014). No entanto, investigação comparativa entre Percoll PLUS® e Androcoll-B não foi possível, pois o mesmo não é comercializado no Brasil.

Assim, dados do presente experimento, aliado às outras avaliações em progresso, como citometria de fluxo para integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de mitocôndria, peroxidação lipídica, ROS intracelular e fragmentação de DNA, além de FIV e IATF, poderão contribuir para validação da metodologia adotada, uma vez que a análise da qualidade espermática, pós-descongelamento, através de técnica computadorizada e citometria de fluxo, pode resultar em predição confiável da fertilidade de sêmen de touro (SELLEM et al., 2015).

Conclusões

Efeito benéfico da CCU com Percoll PLUS® foi observado no grupo 70D, como constatado através de maior proporção de espermatozoides com motilidade progressiva, assim como de valores médios similares aos encontrados no grupo controle para a motilidade total e demais características de movimento espermático. Contudo, outras avaliações em andamento, como análise espermática em citômetro de fluxo, FIV e IATF, poderão efetivamente validar a CCU de Percoll PLUS® como o método de seleção de espermatozoides de touro, antes do congelamento, com possível reflexo sobre a qualidade de amostras descongeladas.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, processo no 2015/20986-3; Central de Congelamento de Sêmen Tairana; Masterfertility Reprodução Animal Ltda.

Referências

- BERGER, T.; MARRS, R. P.; MOYER, D. L. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 43, n. 2, p. 268-273, 1985.
- BRAGATO, J. P.; MARQUI, F. N.; BERTON, T. I.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; SILVA-JUNIOR, E. R.; SOUZA, D. G.; SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; POLIZEL, F. F.; MARTINS JUNIOR, A. Efeitos da seleção espermática em camada única de percoll®, antes da congelação, sobre as características cinéticas de espermatozoides bovinos pós-descongelamento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 29., 2015, Gramado, RS. **Anais...** Gramado, RS: SBTE, 2015. p. 335.
- GOODLA, L.; MORRELL, J. M.; YUSNIZAR, Y.; STALHAMMAR, H.; JOHANNISSON, A. Quality of bull spermatozoa after preparation by single-layer centrifugation. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2204-2212, 2014.
- HALLAP, T. Large volumes of bull semen separated by slc with a species-specific colloid, Androcoll (TM)-B. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR DOMESTIC ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2011, Antalya, Turkey. **Proceedings...** Antalya, Turkey: Reproduction in Domestic Animals, 2011. v. 46, n. 3, p. 112.
- JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1, p. 143-172, 2000.
- MARTINEZ-ALBORCIA, M. J.; MORRELL, J. M.; PARRILLA, I.; BARRANCO, I.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J. Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid centrifugation prior freezing. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 1117-1125, 2012.
- MORRELL, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ANDERSSON, M. Colloid centrifugation selects normal spermatozoa from polymorphic bull ejaculates: a case study. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 2, p. 281-284, 2014.
- SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E. P. C. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, v. 84, n. 9, p. 1447-1454, 2015.

Coleta farmacológica de sêmen de onças-pardas (*Puma concolor*)

Gediendson Ribeiro de Araujo^{1*}, Tarcízio Antônio Rego de Paula², Thyara de Deco-Souza³, Letícia Bergo Coelho Ferreira², Leanes Cruz da Silva², Pedro Nacib Jorge Neto⁴

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de avaliar a metodologia de coleta farmacológica de sêmen com sondagem uretral em onças pardas mantidas em cativeiro. Para a coleta farmacológica foi utilizada Medetomidina para induzir a liberação de sêmen na uretra e sonda uretral para gatos, sem janela lateral, para coleta do sêmen por capilaridade. O método foi eficaz em todos os animais utilizados. Com esta técnica, amostras com menor volume (106,7 µL) e maior concentração (524,1 x 10⁶ espermatozoides/mL) foram coletadas. As avaliações de vigor, motilidade e patologia espermática demonstraram que a técnica não afeta a qualidade do sêmen. Desta forma, a metodologia proposta consiste em uma técnica mais prática e eficiente na coleta de sêmen com boa qualidade dispensando o eletroejaculador.

Palavras-chave: Medetomidina. Reprodução assistida. *Puma concolor*.

Pharmacological collection of puma semen (*Puma concolor*)

Abstract: The objective of this study was to evaluate the methodology of pharmacological collection of semen with urethral catheter in pumas kept in captivity. For the pharmacological collection Medetomidine was used to induce the release of semen in the urethra and urethral catheter for cats without lateral window to collect the semen by capillarity. The method was effective in all animals used. With this technique, samples with lower volume (106.7 µL) and higher concentration (524.1 x 10⁶ spermatozoa/mL) were collected. The evaluations of vigor, motility and spermatoc pathology have demonstrated that the technique does not affect semen quality. In this way, the proposed methodology consists of a more practical and efficient technique in the collection of semen with good quality dispensing the electroejaculator.

Keywords: Medetomidine. Assisted reproduction. *Puma concolor*.

Introdução

A onça parda (*Puma concolor*) vem sofrendo grandes pressões antrópicas que tem resultado na diminuição das populações de vida livre. Uma das estratégias de conservação de animais ameaçados de extinção acontece por meio de programas de reprodução assistida, que visam a manutenção de uma população geneticamente viável (Plano Nacional de Conservação da Onça Parda - PAN Onça Parda, Portaria MMA nº 76 / 2014). Apesar do progresso nos estudos para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas em felinos silvestres, os entraves em desenvolver tais tecnologias iniciam na dificuldade em se obter amostras representativas de sêmen. A eletroejaculação é a técnica de escolha para coleta de sêmen em felinos silvestres, porém por exigir equipamentos específicos, operador treinado e, principalmente, resultar em amostras de sêmen muito diluídas e por vezes contaminadas com urina, torna-se uma técnica pouco viável para animais de vida livre (ZAMBELLI et al., 2008; LUEDERS et al., 2012). Além disso, a estimulação elétrica inerente à eletroejaculação excita o animal, exigindo doses anestésicas maiores para garantir a analgesia e a segurança da equipe ao manipular um grande felino. Uma nova possibilidade para coleta de sêmen de felinos surgiu com o trabalho de Zambelli et al. (2008) que desenvolveram um método farmacológico de coleta de sêmen em gato usando a medetomidina. A medetomidina é um α -2-agonista que provoca a contração dos ductos deferentes auxiliando a ejaculação (TURNER et al., 1995), e até o momento foi testado em gatos e leões africanos, possibilitando a obtenção de amostras concentradas de sêmen nestes animais anestesiados, dispensando o eletroejaculador e conseqüentemente sem perda da qualidade espermática, sendo assim uma técnica promissora a ser aplicada nas demais espécies de felinos (ZAMBELLI et al., 2008; LUEDERS et al., 2012). Dessa forma, o objetivo

¹ Projeto Onças do Rio Negro, Fazenda Barranco Alto, 79200-000, Aquidauana, Mato Grosso do Sul.

² Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais.

³ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

⁴ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 05508-270, São Paulo, São Paulo.

* gediendson@gmail.com.

do presente estudo foi avaliar a metodologia de coleta farmacológica de sêmen com sondagem uretral após aplicação da medetomidina em onças pardas mantidas em cativeiro.

Material e Métodos

Foram utilizadas três onças pardas mantidas em cativeiro pela ONG Mata Ciliar (SP) e pelo Zoológico de Paulínia (SP), sendo realizado uma coleta por animal. Os animais eram mantidos em recintos individuais com água ad libitum e dieta a base de carne bovina e suína. A coleta farmacológica de sêmen por cateterização uretral foi realizada após jejum alimentar (12h), sendo os animais anestesiados com associação de Medetomidina (0,08-0,1 mg/kg) e Ketamina (5 mg/kg), sendo esta revertida, após os procedimentos, com Atipamezole (0,25 mg/kg) via IM. A sondagem uretral foi realizada entre 20 e 40 minutos após a aplicação do anestésico a fim de permitir a ação da medetomidina sobre a ejaculação. O pênis foi exposto para facilitar a sondagem da uretra, e foi previamente limpo com soro fisiológico e gazes. Foi utilizada uma sonda uretral estéril para gatos (tom cat), de 14 cm de comprimento, descartável, semi flexível e sem janela lateral para a coleta, lubrificada com soro fisiológico estéril e inserida cuidadosamente, evitando lesões a mucosa da uretra. Em seguida, foi acoplada uma seringa de 1 ml à sonda para a coleta do sêmen. Após retirada da sonda, o sêmen foi acondicionado em tubo graduado mantido a 37°C em banho maria para avaliação e processamento. O sêmen foi avaliado fisicamente em relação à coloração e classificado como: leitosa (coloração esperada), aquosa (amostra muito diluída), amarelada (contaminação por urina) ou avermelhada (contaminação por sangue). Na sequência, o sêmen foi diluído na proporção 2:1 em meio de manutenção (MM; 24g/L de TRIS, 14 g/L de ácido cítrico, 8 g/L de glicose, 2 g/L de amicanina, 200 g/L de gema de ovo; Nutricell®, SP-Brasil). Para aferição do volume, foi utilizada uma micropipeta de volume ajustável. O sêmen foi avaliado quanto ao vigor e motilidade espermática. A avaliação subjetiva foi expressa em porcentagem para a motilidade, e escores de zero (ausência de movimento) a cinco (movimento retilíneo progressivo intenso). A concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer. A morfologia espermática foi realizada com uma alíquota de sêmen fixada em formol salino tamponado (1:10). Foram contadas 200 células em preparação úmida utilizando um microscópio de contraste de fase e classificadas em normais ou quanto aos tipos de defeitos maiores e menores. Os dados obtidos nas análises do sêmen fresco foram expressos em média e desvio padrão. Usou-se o teste de Lillifors para verificar distribuição normal ou não das variáveis. A homogeneidade das variâncias foi avaliada por meio do teste de Cochran Bartlett. Para variáveis que não permitiram análise paramétrica e para o dado qualitativo vigor, foi usado o teste não paramétrico de Wilcoxon a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Por meio da coleta farmacológica utilizando a medetomidina, o sêmen foi coletado com a introdução da sonda uretral, em média 12 cm, e por meio de uma leve pressão negativa na seringa, sendo possível coletar sêmen em todos os animais, no entanto, um animal (Pc3) só ejaculou líquido seminal. A coloração observada nos ejaculados foi leitosa, com exceção apenas do animal Pc3 que foi translúcida. Este estudo apresenta a primeira descrição das características de sêmen de onças pardas coletado por sondagem uretral após aplicação da medetomidina, um sedativo da classe dos α -2-adrenérgicos (α -2A) com maior seletividade para os receptores alfa-2, e consequentemente, maior eficácia dentre os sedativos da categoria. A medetomidina não causou ereção e nem a ejaculação nos pumas, mas promoveu a liberação dos espermatozoides na uretra. Esta liberação possivelmente está relacionada à estimulação dos receptores α -2A que promovem a contração dos ductos deferentes, do triângulo vesical e do esfíncter da bexiga durante a ejaculação (TURNER et al., 1995). Foram obtidos ejaculados em todos os animais, no entanto um macho (Pc3), de 20 anos de vida, ejaculou apenas líquido seminal. Neste macho, a senilidade possivelmente está associada à azospermia e degeneração testicular, sendo os dados utilizados apenas para cálculo de volume de sêmen coletado. Por meio da coleta farmacológica foi possível obter amostras de sêmen concentradas (524,1 x 106 spz/mL) com menor volume em relação à eletroejaculação, sem prejuízo ao total de células coletadas, sendo os resultados semelhantes obtidos em gatos (ZAMBELLI et al., 2008) e em leões africanos (LUEDERS et al., 2012), utilizando o mesmo método de coleta farmacológica. O vigor (3) e motilidade (70%) foram superiores aos encontrados por Miller et al. (1990) e inferior aos descritos por Deco et al. (2010) e volume do ejaculado (106,7 μ L) foi inferior (em volume e quantidade total de células) ao descritos por Wild et al. (1988) e por Deco et al. (2010), sendo que todos estes estudos utilizaram a eletroejaculação, para a coleta. Devido ao reduzido número de machos avaliados neste trabalho, não é possível afirmar que o resultado inferior do total de espermatozoides coletados é um reflexo da metodologia aplicada, podendo estar relacionado as características dos indivíduos. Apesar do volume testicular ainda não ter sido relacionado com produção espermática em felinos, os indivíduos Pc1 e Pc2 apresentaram volume testicular (3,2 mL no testículo direito e 2,7 mL no testículo esquerdo) muito inferior ao descrito por Deco et al. (2010) (7,59 mL no testículo direito e 7,49 mL no testículo esquerdo), podendo explicar a diferença obtida entre duas pesquisas. A média de espermatozoides morfologicamente anormais foi de 59,5%. As principais patologias encontradas na categoria de defeitos maiores foram cauda fortemente dobrada e cauda fortemente enrolada, enquanto que na categoria de defeitos menores foi observado maior quantidade de cauda dobrada. Na família Felidae

é comum uma alta porcentagem de patologias espermáticas, no entanto, a etiologia das anormalidades específicas assim como seu impacto sobre a fertilidade ainda é controversa. A metodologia de coleta de sêmen proposta facilitou a logística do trabalho, permitindo a coleta de amostras com alta concentração de espermatozoides e baixa concentração de líquido prostático, dispensando o uso da centrifuga, e principalmente, por se tratar de um procedimento muito mais rápido e prático que a metodologia da eletroejaculação. Outra vantagem foi a reversão imediata dos efeitos da medetomidina após aplicação do atipamezole, diminuindo substancialmente o tempo despendido no manejo do animal capturado. Desta forma, a metodologia proposta permite a coleta de amostras de sêmen com concentração superior à eletroejaculação sem perda da qualidade de movimentação ou mesmo sem influência sobre a morfologia espermática dispensando o uso do eletroejaculador e utilizando um protocolo de contenção química seguro e eficaz.

Conclusões

A metodologia proposta mostrou-se eficiente para a coleta de sêmen com qualidade em onças pardas, dispensando o uso da eletroejaculação, podendo ser utilizada em programas de inseminação artificial e criopreservação espermática nessas espécies. Por ser uma técnica simples, prática e segura, a sondagem uretral após administração da medetomidina é passível de ser utilizada em procedimentos com animais de vida livre.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq, Fapemig e Fundect pelo apoio financeiro.

Referências

- DECO, S. T.; PAULA, T. A. R.; COSTA, D. S.; ARAUJO, G. R.; GARAY, R. M.; VASCONCELOS, G. S. C.; CSERMAK JUNIOR, A. C.; SILVA, L. C.; BARROS, J. B. G. Collection and semen evaluation of captive adult cougars (*Puma concolor* Linnaeus, 1771). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 252-259, 2010.
- 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**, v. 78, n. 3, p. 696-701, 2012.
- MILLER, A. M.; ROELKE, M. E.; GOODROWE, K. L.; HOWARD, J. G.; WILDT, D. E. Oocyte recovery, maturation and fertilization in vitro in the puma (*Felis concolor*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 249-258, 1990.
- 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 206, n. 12, p. 1906-1908, 1995.
- WILDT, D. E.; PHILLIPS, L. G.; SIMMONS, L. G.; CHAKRABORTY, P. K.; BROWN, J. L.; HOWARD, J. G.; TEARE, A.; BUSH, M. A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard, and puma. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 2, p. 245-255, 1988.
- 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**, v. 69, n. 4, p. 485-490, 2008.

Comparação de perímetro escrotal, avaliação seminal e ecogenicidade testicular em touros Caracu e Nelore: dados preliminares

Naiara Nantes Rodrigues^{1}, Guilherme Fazan Rossi¹, Dayane Priscila Vrisman¹, Mariana Furtado Zorzetto², Anielly de Paula Freitas³, Sergio Brasil Garcia Pimenta Neves Pereira Lima², Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima¹, Fabio Morato Monteiro², Maria Emilia Franco Oliveira¹*

Resumo: Este estudo compara características do perímetro escrotal, através de dados obtidos pela medição de testículos com fita métrica, da ecogenicidade e ecotextura, obtidos pelas imagens de ultrassonografia da análise computadorizada e expressas por meio de pixels e desvio padrão de pixels, respectivamente, e da avaliação seminal. Um total de 30 animais foram utilizados e divididos igualmente em dois grupos de acordo com a raça, os animais do grupo 1 Caracu e o grupo 2 Nelore. Houve diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos nas variáveis de perímetro escrotal ($35,63 \pm 0,65$ e $32,93 \pm 0,65$) e a média de pixels ($74,24 \pm 2,65$ e $83,54 \pm 2,65$) do grupo 1 e do grupo 2, respectivamente. No entanto, as variáveis de desvio padrão de pixels ($12,98 \pm 0,36$ e $13,68 \pm 0,36$), motilidade total ($81,40 \pm 4,80$ e $70,53 \pm 4,80$), motilidade progressiva ($64,13 \pm 3,94$ e $53,40 \pm 3,94$), vigor ($2,26 \pm 0,02$ e $2,26 \pm 0,02$), defeitos maiores ($10,06 \pm 0,03$ e $9,30 \pm 0,03$), defeitos menores ($6,76 \pm 0,03$ e $7,80 \pm 0,03$), defeitos totais ($16,83 \pm 0,01$ e $17,11 \pm 0,01$) e a distribuição de espermatozóides rápidos ($76,46 \pm 5,01$ e $66,80 \pm 5,01$) manteve-se sem diferenças significativas entre os grupos 1 e 2, respectivamente.

Palavras-chave: Sêmen. Ultrassom. Andrológico.

Comparison of scrotal circumference, seminal evaluation and testicular echogenicity in Caracu and Nelore bulls: preliminary data

Abstract: This study compares characteristics such as scrotal perimeter, data obtained by measuring testicles with tape measure, echogenicity and ecotexture, obtained by the computerized analysis of the ultrasonographic images and expressed by mean of pixels and standard deviation of pixels, respectively, and seminal evaluation. A total of 30 animals were used and equally divided into two groups according to breed, the animals of group 1 Caracu and group 2 Nelore. There were significant differences ($P < 0.05$) between the groups in the scrotal circumference variables (35.63 ± 0.65 and 32.93 ± 0.65) and mean of pixels (74.24 ± 2.65 and 83.54 ± 2.65) group 1 and group 2, respectively. However, the variables standard deviation of pixels (12.98 ± 0.36 and 13.68 ± 0.36), total motility (81.40 ± 4.80 and 70.53 ± 4.80), progressive motility (64.13 ± 3.94 and 53.40 ± 3.94), vigor (2.26 ± 0.02 and 2.26 ± 0.02), concentration (342.93 ± 0.0008 and 402.26 ± 0.0008), major defects (10.06 ± 0.03 and 9.30 ± 0.03), minor defects (6.76 ± 0.03 and 7.80 ± 0.03), total defects (16.83 ± 0.01 and 17.11 ± 0.01) and distribution of fast spermatozoids (76.46 ± 5.01 and 66.80 ± 5.01) remained without significant differences between group 1 and 2, respectively.

Keywords: Semen; Ultrasound. Andrological.

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo.

² Centro APTA Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, 14160-900, Sertãozinho, São Paulo.

³ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo.

* naiara_nantes@hotmail.com

Introdução

O exame andrológico é a forma correta de fazer a avaliação reprodutiva de um touro. A ultrassonografia dos testículos combinada com a análise de imagem assistida por computador permite a avaliação de sua ecotextura e ecogenicidade, possibilitando a identificação de alterações histofisiológicas do parênquima testicular (AHMADI et al., 2013). Nos métodos laboratoriais é possível determinar a concentração do sêmen, indicando a quantidade de espermatozoides presentes no volume do ejaculado, e a motilidade é um índice que demonstra a proporção em porcentagem do número total de espermatozoides móveis. O vigor demonstra a intensidade do movimento dos espermatozoides (LOPES et al., 2009). O espermograma avalia alterações morfológicas dos espermatozoides em estruturas como cabeça, acrossomo, peça intermediária e cauda e os classifica em defeitos maiores ou menores (GONÇALVES et al., 2008). Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar, por ultrassonografia Modo-B, os testículos e comparar as diferenças nos padrões de perímetro escrotal, ecogenicidade, ecotextura testicular e parâmetros seminais em touros Caracu e Nelore.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Instituto de Zootecnia, localizado no município de Sertãozinho, SP, no período de outubro de 2016 a janeiro de 2017. Os touros foram agrupados de acordo com a raça: (1) animais Caracu com idade $24,33 \pm 0,12$ meses ($n=15$, $529,26 \pm 8,60$ Kg); (2) animais Nelore com idade $23,66 \pm 0,15$ meses ($n=15$, $500,73 \pm 9,57$ Kg). A avaliação ultrassonográfica Modo-B dos testículos foi realizada utilizando o aparelho de ultrassonografia Mindray Z5® (Shenzhen, China) com transdutor transretal linear multifrequencial (7,5 MHz). Foram realizadas imagens determinando ecogenicidade e ecotextura do tecido. As imagens foram analisadas pelo software Image Pro Plus 7.0TM (Media Cybernetics Inc., San Diego, CA, USA), determinando os valores numéricos de pixels (ecogenicidade) e heterogeneidade de pixels (desvio padrão dos valores médios de pixel). O valor do perímetro escrotal (PE) foi obtido com auxílio de fita métrica. Por meio do sistema de Análise Computadorizada do Movimento Espermático (CASA) foi avaliado a motilidade total (%; MT); motilidade progressiva (%; MP) e velocidade de distribuição rápida (RAP). O vigor foi avaliado em uma gota de sêmen colocada sobre a lâmina de vidro previamente aquecida (37°C) e com uma laminula na parte superior. A concentração espermática ($\times 10^6$ espermatozóides/mL) foi obtida por espermiodensímetro (Minitub®, Alemanha). A morfologia espermática foi avaliada quanto às alterações de conformação dos espermatozoides, classificando-as em defeitos maiores (Def.Maior), menores (Def.Menor) e totais (Def.Total), segundo CBRA (2013). A avaliação foi realizada pela técnica de câmara úmida sob microscopia óptica sendo avaliado um total de 200 espermatozóides por amostra. Para a análise estatística das características média de pixels (MédiaP), PE, %MT, %MP e RAP foi utilizado o procedimento GLM, pois as mesmas seguem distribuição normal, já para as características vigor (VIG), concentração (CONC), Def.Maior, Def.Menor e Def.Total foi utilizado o procedimento GENMOD, pois a distribuição Gamma foi a que melhor se ajustou aos dados. O nível de significância foi de 5% ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

De acordo com Silva et al. (1997) a ecogenicidade do parênquima testicular de bovinos da raça Nelore diminui com o passar da idade, assim Cardilli (2008) afirmaram que essa mesma raça possui parênquima testicular homogêneo e de baixa ecogenicidade. Em contrapartida, o parênquima testicular de taurinos adultos se apresenta homogêneo e moderadamente ecogênico, pois há aumento na ecogenicidade com o decorrer da idade (ABDEL-RAZEK; ALI, 2005), esses resultados contrariam os do presente estudo, uma vez que animais Nelore apresentaram maior ecogenicidade ($83,54 \pm 2,65$) que Caracu ($74,24 \pm 2,65$). Pinho (2010) trabalhando com touros Nelore de 21 a 25,9 meses observou uma intensidade de pixels de $104,7 \pm 13,1$, valor acima do encontrado no presente estudo ($83,54 \pm 2,65$), o que pode ser explicado pelo fato dos animais do estudo terem sido submetidos a regime alimentar intensivo, o que determina ecogenicidade testicular reduzida (LEATHEM, 1975). No presente estudo foi observado que o PE de touros Caracu foi maior ($35,63 \pm 0,65$), o que pode ser justificado pelo formato testicular, pois animais zebuínos possuem testículos alongados quando comparado a *Bos taurus taurus* da mesma idade (SILVA et al., 2011). Em termos de melhoramento genético do rebanho, o PE é um parâmetro importante na seleção de touros Nelore sendo observado correlação positiva com aspectos físicos e morfológicos do ejaculado (SILVEIRA et al., 2010). Touros da raça Nelore entre 24 e 35 meses de idade são considerados excelentes se apresentarem 32 cm de PE (FONSECA et al., 1989), o que está em conformidade com o presente estudo já que animais Nelore apresentaram PE de $32,93 \pm 0,65$ cm. Apesar de haver diferenças entre as raças no PE e média de pixels, as características seminais não apresentaram diferenças entre Caracu e Nelore. No entanto, Monteiro et al. (2011) em estudo com essas mesmas raças encontraram diferenças ($P < 0,05$) em vigor ($2,9 \pm 0,6$ e $3,2 \pm 0,6$) e defeitos menores ($7,4 \pm 7,6$ e $4,8 \pm 5,8$), já as características motilidade ($63,7 \pm 10,7$ e $66,9 \pm 10,1$), defeitos maiores ($15,1 \pm 14,2$ e $14,5 \pm 14,3$), e defeitos totais ($22,5 \pm 16,6$ e $19,3 \pm 15,5$), respectivamente, permaneceram sem diferenças entre as raças.

No presente estudo foi observado diferença ($P < 0,05$) entre raças nas variáveis média de pixels (MédiaP) e PE (Tabela 1).

Tabela 1. Ultrassonografia testicular, perímetro escrotal (PE) e características seminais de touros Caracu e Nelore. 1 MédiaP = média de pixels; DPP = desvio padrão de pixels; PE = perímetro escrotal; MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VIG = vigor; CONC = concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL); Def.Maior = defeito maior; Def.Menor = defeito menor; Def.Total = defeito total; RAP = porcentagem de espermatozoides rápidos. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença ($P < 0,05$).

Variáveis ¹	Caracu N = 15	Nelore N=15	Erro padrão	P<0,05
MédiaP	74,24 ^b	83,54 ^a	2,65	0,0197
DPP	12,98	13,68	0,36	0,1809
PE	35,63 ^a	32,93 ^b	0,65	0,0066
MT	81,40	70,53	4,80	0,1207
MP	64,13	53,40	3,94	0,0649
RAP	76,46	66,80	5,01	0,1837
VIG	2,26	2,26	0,03	10000
CONC	342,93	402,26	0,0008	0,5893
Def.Maior	10,06	9,30	0,03	0,8204
Def.Menor	6,76	7,80	0,03	0,5901
Def.Total	16,83	17,11	0,01	0,9451

Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

O parênquima testicular de touros Nelore apresentou maior ecogenicidade, porém o perímetro escrotal foi maior na raça Caracu. As características seminais não apresentaram diferenças entre as raças estudadas.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Centro APTA Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia.

Referências

- ABDEL-RAZEK, A.; ALI, A. Developmental changes of bull (*Bos taurus*) genitalia as evaluated by caliper and ultrasonography. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 1, p. 23-27, 2005.
- AHMADI, B.; MIRSHAHI, A.; GIFFIN, J.; OLIVEIRA, M. E. F.; GAO, L.; HAHNEL, A.; BARTLEWSKI, P. M. Preliminary assessment of the quantitative relationships between testicular tissue composition and ultrasonographic image attributes in the ram. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 282-285, 2013.
- CARDILLI, D. J. **Análise quantitativa da imagem ultra-sonográfica de testículos de bovinos jovens da raça Nelore**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus Jaboticabal, Jaboticabal.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.

FONSECA, V. O.; CRUDELI, G. O.; SILVA, E. V. C.; HERMANY, A. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base na biometria testicular e características morfo-físicas do sêmen: uma nova proposição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, p. 187, 1989.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2008.

LEATHERN, J. H. Nutritional influences on testicular composition and function in mammals. **Handbook of Physiology**, v. 5, p. 225-232, 1975.

LOPES, F. G.; GUIMARAES, J. D.; COSTA, E. P. da; CARVALHO, G. R. de; MIRANDA NETO, T. Avaliação andrológica por pontos e comportamento sexual em touros da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 6, p. 1018-1025, 2009.

MONTEIRO, F. M.; OLIVEIRA, L. Z.; OLIVEIRA, C. S.; TETZNER, T. A. D.; MERCADANTE, M. E. Z.; BRANCO, R. H.; GARCIA, J. M. Avaliação andrológica de touros jovens de diferentes raças selecionados para peso pós-desmama. **Boletim de Indústria Animal**, v. 68, n. 1, p. 37-43, 2011.

PINHO, R. O. **Ultrassonografia testicular na avaliação andrológica de touros da raça nelore e composto montana tropical**. 2010. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVA, A. E. D. F.; KASTELIC, J. P.; UNANIAN, M. M.; FREITAS, A. R.; COOK, R. B. Ultra-sonografia de machos Nelore na fase peri-puberal. **Revista brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 2, p. 34-36, 1997.

SILVA, M. R.; PEDROSA, V. B.; SILVA, J. C. B.; ELER, J. P.; GUIMARAES, J. D.; ALBUQUERQUE, L. G. Testicular traits as selection criteria for young Nelore bulls. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 7, p. 2061-2067, 2011.

SILVEIRA, T. da S.; SIQUEIRA, J. B.; GUIMARAES, S. E. F.; PAULA, T. A. R. de; MIRANDA NETO, T.; GUIMARAES, J. D. Maturação sexual e parâmetros reprodutivos em touros da raça Nelore criados em sistema extensivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 3, p. 503-511, 2010.

Comparação dos efeitos da contaminação do ejaculado canino com urina e incubação sob 37°C e 5°C e posterior lavagem utilizando centrifugação e filtração

José Leonardo Gualberto Ramos¹, Gabriel José Silva Uza², Eduardo Shimoda³, Isabel Candia Nunes da Cunha^{1}*

Resumo: A contaminação por urina pode reduzir drasticamente a motilidade do esperma, e esse efeito está associado à sua hiperosmolaridade quando comparada à ejaculação. No presente estudo, a amostra de sêmen contaminada com urina foi incubada sob duas temperaturas diferentes (37°C e 5°C) e avaliada a cada 15 minutos durante 1 h. Observou-se que o efeito deletério da urina é mais intenso após 30 minutos de incubação nas duas temperaturas (aquecida e refrigerada). Em um segundo momento foram testadas duas técnicas de descontaminação (centrifugação e filtração) e os resultados mostraram que ambas podem ser utilizadas sem apresentar diferenças nas variáveis avaliadas, sendo alternativas razoáveis para lavagem das amostras seminais contaminadas com urina.

Palavras-chave: Cão. Osmolaridade. Sêmen.

Comparison of the effects of contamination of canine ejaculate with urine and incubation at 37°C and 5°C and subsequent washing using centrifugation and filtration

Abstract: Urine contamination can dramatically reduce sperm motility, and this effect is associated with its hyperosmolarity when compared to ejaculate. In the present study, semen sample contaminated with urine was incubated under two different temperatures (37°C and 5°C) and evaluated every 15 minutes during 1 h. It was observed that the deleterious effect of urine is more intense after 30 min incubation in both temperatures (heated and cooled). In a second moment two techniques for decontamination (centrifugation and filtration) were tested and the results showed that both can be used without presenting differences in the evaluated variables, being reasonable alternatives to wash seminal samples contaminated with urine.

Keywords: Dog. Osmolarity. Semen.

Introdução

A inseminação artificial (IA) na espécie canina tem sido bastante utilizada na atualidade, contudo são necessários maiores conhecimentos e controle dos fatores que podem influenciar seu sucesso. Assim, diversos estudos são conduzidos visando encontrar metodologias de preservação de gametas, que permitam uma perda mínima da qualidade do sêmen, maior eficácia na determinação do momento ideal para a inseminação e utilização de uma via de inseminação eficiente e de menor risco ao animal (HORI et al., 2011; HAYASHI et al., 2013). Cada espécie tem sua particularidade quanto à obtenção e congelamento de gametas. Nos canídeos é relatada a contaminação por urina, seja pela emissão de urina junto com o sêmen (urospermia), ou pela ejaculação em direção a bexiga (ejaculação retrógrada), que pode ocorrer tanto na monta natural, na coleta por estimulação peniana ou durante a eletro-ejaculação (SANTOS et al., 2011). Quando os espermatozoides são submetidos a um ambiente contaminado por urina, a primeira alteração a ser percebida é a redução na motilidade (SANTOS et al., 2011; GRIGGERS et al., 2001).

Técnicas para contornar os efeitos deletérios da urina sobre o espermatozoide podem ser pré ou pós-ejaculatórias. Uma das técnicas pós-ejaculatórias já descritas é centrifugação do sêmen contaminado por urina (SANTOS et al., 2011; GRIGGERS et al., 2001; NICOLAS et al., 2011) utilizando-se diluidores que reduzem as perdas da viabilidade

¹ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 28035-200, Goytacazes, Rio de Janeiro.

² Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910, Vitória, Espírito Santo.

³ Universidade Candido Mendes, 28040-320, Goytacazes, Rio de Janeiro.

* cunhaicn@gmail.com

espermática, como o meio Cheng em humanos, que contém NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃ e glicose (TSAI et al., 1990), ou pelo uso de diluidor à base de leite, em equinos (GRIGGERS et al., 2001).

No processamento de material genético de animais em via de extinção, toda amostra colhida deve ser aproveitada, desta forma, objetivamos com esse trabalho avaliar o efeito da urina sobre espermatozóide em diferentes tempos (0, 15, 30, 45 e 60 min) e sob diferentes temperaturas de armazenamento (37°C e 5°C) e ainda, a comparação de centrifugação e filtração como técnicas de lavagem do sêmen contaminado com urina.

Material e Métodos

Em uma primeira etapa, 200µL da fração rica do ejaculado de 10 cães foram contaminados com 1800 µL de urina autóloga e incubados durante 1h sob as temperaturas de 37°C e 5°C e foram avaliados em intervalos de 15 min nos momentos: 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. As variáveis avaliadas foram: a motilidade espermática e vigor, por método subjetivo sob microscopia de contraste de fase, a integridade de membranas, por meio do teste hiposmótico e a morfologia espermática, método de câmara úmida.

Na segunda etapa, 200µL da fração rica do ejaculado de 10 cães foram contaminados com 1800 µL de urina autóloga e foram imediatamente incubados por: 0, 15 e 30 minutos sob as temperaturas de 37°C e 5°C e submetidos a duas técnicas de lavagem: centrifugação (800xg por 5 min) e filtração (Filtro de Sêmen Sperm Filter Botupharma®). Após uso das técnicas de lavagem e descarte do sobrenadante as amostras foram ressuspensas no diluidor BotuTurbo® na proporção de 1:1 e foram avaliadas: a motilidade espermática, a integridade de membrana e a morfologia espermática.

Após análise de variância, os tratamentos que mostraram diferença significativa, sendo $\alpha=0,05$, foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Todos os dados foram processados pelo programa SAEG versão 9.0.

Resultados e Discussão

Durante a incubação do sêmen com urina sob as duas temperaturas propostas (37°C e 5°C), a motilidade, vigor e integridade de membranas espermáticas apresentaram padrão decrescente com o avanço do tempo; a morfologia espermática não sofreu alteração nos tempos e métodos de incubação avaliados (Tabela 1).

As alterações observadas com o decréscimo da motilidade e vigor até zero após 1h de incubação demonstram o efeito deletério progressivo que a urina produz sobre as células espermáticas, resultados semelhantes aos observados por Santos et al. (2011) e Griggers et al. (2001), porém neste estudo verificamos que esse efeito é progressivo e sua reversibilidade depende do tempo de contato das amostras seminais com a solução hiperosmótica, que neste caso, foi a urina. Verificamos que após os 30 minutos de incubação os efeitos deletérios se acentuaram, provavelmente, devido a exposição prolongada ao ambiente hiperosmótico provocado pela urina. A osmolaridade média das amostras seminais foi de: 327,31±30,1 Osmol/L; e da urina foi de: 1098,25±90,62 mOsmol/L ($P<0,05$). A morfologia espermática não apresentou diferença no decorrer do tempo de incubação, fato já descrito por diferentes autores trabalhando com o mesmo tema (SANTOS et al., 2011; GRIGGERS et al., 2001).

O efeito causado pelos métodos de lavagem testados (centrifugação ou filtração) foram similares (tabela 2), não acentuando o efeito deletério provocado pela incubação com solução hiperosmótica, como já observado no uso de centrifugação em sêmen de cão (CUNHA; LOPES, 2009) e uso do Sperm Filter® em outras espécies como equinos e bovinos (PESSOA, 2016).

Tabela 1. Valores médio e desvio padrão da motilidade (%), membrana plasmática íntegra (%), morfologia normal (%) e vigor (escore de 0 a 5) de espermatozoides caninos incubados com urina sob diferentes temperaturas. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, dentro de cada método de incubação, indicam diferença estatística com 5% de significância.

Variáveis	Aquecido 37 °C					Refrigerado 5°C				
	0"	15"	30"	45"	60"	0"	15"	30"	45"	60"
Motilidade	85,6±6 ^a	48,3±9 ^b	16,4±8 ^c	8,4±11 ^c	0 ^d	86,4±7 ^a	43,6±10 ^b	26,5±9 ^b	10,2±12 ^c	0 ^d
Vigor	4,5±0,4 ^a	2,8±0,5 ^b	2±0,8 ^b	0,8±0,5 ^c	0 ^d	4,2±0,3 ^a	3,1±0,3 ^a	2,4±0,6 ^{ab}	1,2±0,5 ^{bc}	0 ^d
Integridade membrana	93,4±8 ^a	80,1±5 ^a	43,2±10 ^b	14,2±15 ^c	5,1±16 ^c	94,2±6 ^a	85,2±8 ^a	55,2±11 ^{ab}	20,1±10 ^{bc}	8,1±14 ^c
Morfologia	91,6±5 ^a	91,5±8 ^a	88,5±8 ^a	85,2±11 ^a	82,3±14 ^a	92,6±4 ^a	90,2±6 ^a	90,3±6 ^a	90,2±7 ^a	87,2±8 ^a

Fonte: Elaborado pelos autores.

Tabela 2. Valores médio e desvio padrão da motilidade (%), membrana plasmática íntegra (%), morfologia normal (%) e vigor (escore de 0 a 5) de espermatozoides caninos incubados com urina sob diferentes temperaturas e após o uso de duas técnicas de lavagem: centrifugação e filtragem. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, dentro de cada método de lavagem, sob cada temperatura de incubação, indicam diferença estatística com 5% de significância.

Técnica	Centrifugação						Filtragem					
	Aquecido 37°C			Resfriado 5°C			Aquecido 37°C			Resfriado 5°C		
	0"	15"	30"	0"	15"	30"	0"	15"	30"	0"	15"	30"
Motilidade	87,4±5 ^a	50,2±10 ^b	28,8±14 ^b	88,6±8 ^a	58,7±12 ^b	35,4±16 ^b	87,4±5 ^a	48,4±8 ^b	26,5±10 ^c	88,6±8 ^a	48,4±10 ^b	30,4±10 ^b
Vigor	4,0±0,4 ^a	3,0±0,5 ^a	2,6±0,6 ^a	3,8±0,4 ^a	3,6±0,5 ^a	2,8±0,5 ^a	4,0±0,4 ^a	2,8±0,4 ^a	2,5±0,3 ^a	3,8±0,4 ^a	3,0±0,4 ^a	2,8±0,5 ^a
Integridade membrana	91,4±6 ^a	83,2±6 ^a	48,4±14 ^b	92,3±8 ^a	82,7±10 ^a	55,2±11 ^b	91,4±6 ^a	81,3±4 ^a	44,2±9 ^b	92,3±8 ^a	80,2±12 ^a	55,2±11 ^b
Morfologia	90,2±6 ^a	90,4±3 ^a	87,7±9 ^a	89,4±8 ^a	90,6±4 ^a	90,3±6 ^a	90,2±6 ^a	87,5±6 ^a	86,6±8 ^a	89,4±8 ^a	87,1±8 ^a	82,4±6 ^a

Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

Concluimos que o efeito deletério da urina sobre as células espermáticas se evidencia após os 30 minutos de incubação e que a temperatura de armazenamento (37°C ou 5°C) não produz diferença na qualidade espermática. Concluimos ainda, que o uso da filtragem no processamento do ejaculado não apresenta alterações quando comparado com a técnica de eleição (centrifugação) sendo mais uma alternativa a ser empregada para a lavagem das amostras seminais contaminadas com urina.

Agradecimentos

A FAPERJ, pelo financiamento e UENF e UFES, pela execução do trabalho.

Referências

- CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D. Efeito da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 104-109, 2009.
- GRIGGERS, S.; PACCAMONTI, D. L.; THOMPSON, R. A.; EILTS, B. E. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 613-622, 2001.
- HAYASHI, K.; MORITA, R.; ASO, T.; ONO, M.; OHTAKI, T.; TANEMURA, K.; WATARI, T.; TSUMAGARI, S. Evaluation of transcervical insemination using frozen semen by flexible endoscope in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 3, p. 315-318, 2013.
- HORI, T.; MATSUDA, Y.; KOBAYASHI, M.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Comparison of fertility on intrauterine insemination between cryopreserved ejaculated and cauda epididymal sperm in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 12, p. 1685-1688, 2011.
- NICOLAS, M.; ALVAREZ, M.; GOMES-ALVES, S.; MATA-CAMPUZANO, M.; BORRAGAN, S.; MARTINEZ-PASTOR, F.; PAZ, P de; ANEL, L. Effects on brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa freezability of different extender and dilution ratios used for pre-freezing centrifugation. **European Journal of Wildlife Research**, v. 57, n. 2, p. 259-266, 2011.
- PESSOA, G. A. **Separação espermática pré refrigeração do sêmen equino**. 2016. 100 f. Tese (Doutorado em Medicina Animal) - Faculdade de medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SANTOS, I. P.; CUNHA, I. C. N.; MELO, E. J. T. Effects of urine and NaCl solutions of different osmolarities on canine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 8, n. 3-4, p. 73-76, 2011.
- TSAI, T. C.; LIN, M. C.; CHENG, C. J. A new sperm collection method for treatment of retrograde ejaculation. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 89, n. 6, p. 484-486, 1990.

Comparação entre dois métodos de congelamento na qualidade seminal *in vitro*

Fabio Morato Monteiro^{1*}, Guilherme Fazan Ross², Érika Aline Dias Ribeiro¹, Suzane Peres Campanhol², Camila de Paula Freitas Dell'Aqua³, José Antonio Dell'Aqua Junior³, Frederico Ozanan Papa³, Mariana Furtado Zorzetto³, Letícia Zoccolaro Oliveira⁴, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante¹

Resumo: O objetivo deste estudo foi comparar um sistema de congelamento automatizado com um sistema de congelamento utilizando uma caixa de isopor (45 litros) em uma geladeira doméstica para refrigeração. Foram utilizados trinta e oito ejaculados coletados por eletroejaculador de 12 touros Nelore. Os touros apresentaram $4,02 \pm 0,5$ anos, 631 ± 119 kg de peso corporal e $33,8 \pm 1,89$ cm de perímetro escrotal. Todas as amostras foram diluídas no diluidor de sêmen BotuBov® (Botupharma®, Botucatu, Brasil) até uma concentração final de 50×10^6 spz/mL. Após a diluição, as doses de sêmen foram envazadas em palhetas de 0,5 mL e simultaneamente criopreservadas usando dois sistemas. Para o sistema 1 (automatizado), uma máquina de congelamento TK 4000® (Tetakon®, Uberaba, Brasil) foi programada para realizar uma curva de congelamento $-15^\circ\text{C}/\text{min}$, 5°C a -80°C , após -20°C a -140°C . Para o sistema 2 (caixa de isopor), o sêmen foi colocado a 3 cm acima de N_2L durante 20 min e depois submergido em N_2L . A cinética espermática foi avaliada pela Análise Computadorizada da Cinética Espermática (CASA - IVOS® versão 14) e os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade total (TM%), motilidade progressiva (PM%), células rápidas (RAP%), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m}/\text{s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m}/\text{s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m}/\text{s}$), deslocamento lateral da cabeça do esperma (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR%) e linearidade (LIN%). A citometria de fluxo foi utilizada para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e H_2O_2 intracelular. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento MIXED do SAS com significância de $P < 0,05$. O Sistema 1 (automático) foi superior ao sistema 2 (caixa de isopor) em relação a TM, PM, RAP, VAP, VSL, VCL e ALH e apresentou STR e LIN reduzidos. Não foram observadas diferenças entre os dois sistemas testados quanto à integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e H_2O_2 intracelular. Concluiu-se que o sistema automatizado, apresentando curva de congelamento mais lenta e controlada, demonstrou melhores parâmetros cinéticos de sêmen em comparação com o sistema de congelamento convencional (caixa de isopor).

Palavras-chave: CASA. Nelore. Qualidade seminal.

Comparison between two methods of freezing in seminal quality *in vitro*

Abstract: The aim of this study was to compare an automated freezing system with a styrofoam box for freezing (45 liters) system using domestic refrigerator for cooling. Thirty eight batches collected by electroejaculator from 12 Nelore bulls were used. The bulls presented 4.02 ± 0.5 years old, 631 ± 119 kg of body weight and 33.8 ± 1.89 cm of scrotal circumference. All samples were diluted in BotuBov® (Botupharma®, Botucatu, Brazil) semen extender to a final concentration of 50×10^6 spz/mL. After dilution, semen doses were loaded in 0.5 mL straws and simultaneously cryopreserved using two systems. For system 1 (automated), a TK 4000® (Tetakon®, Uberaba, Brazil) freeze machine was programmed to perform a freezing curve $-15^\circ\text{C}/\text{min}$, 5°C to -80°C , after -20°C to -140°C . For system 2 (styrofoam box), the semen was placed at 3 cm above N_2L during 20 min and then submerged in N_2L . Sperm kinetics was assessed by CASA (computer assisted semen analysis - IVOS® version 14) and the following parameters were evaluated: total motility (TM%), progressive motility (PM%), rapid cells (RAP%), path velocity (VAP, $\mu\text{m}/\text{s}$), straight velocity (VSL, $\mu\text{m}/\text{s}$), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m}/\text{s}$), lateral displacement of sperm head (ALH, μm), beat frequency (BCF, Hz), straightness (STR%) and linearity (LIN%). Flow cytometry was used for assessment of plasma membrane and acrosome integrity, mitochondrial potential and Intracellular H_2O_2 . The data were submitted to analysis of variance by SAS proc MIXED with significance of $P < 0.05$. System 1 (automatic) was superior to system 2 (styrofoam box) regarding to TM, PM, RAP, VAP, VSL, VCL, and ALH and presented reduced STR and LIN. No differences were

¹ Centro APTA Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, 14160-900, Sertãozinho, São Paulo.

² Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo.

³ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 18618-970, Botucatu, São Paulo.

⁴ Universidade Federal Fluminense, 24210-510, Niterói, Rio de Janeiro.

* monteiro@iz.sp.gov.br

observed between the two tested systems regarding to plasma and acrosome membrane integrity, mitochondrial potencial and Intracellular H₂O₂. It was concluded that automated system presenting slower and controlled freezing curve demonstrated better sperm kinetics parameters compared to the conventional freezing system (styrofoam box).

Keywords: CASA. Nelore. Seminal quality.

Introdução

A compreensão sobre o impacto da refrigeração e congelação podem ajudar a melhorar os protocolos de criopreservação (SIEME et al., 2016). A metodologia utilizada para congelação do sêmen, pouco se alterou nos últimos anos. Técnicos a campo normalmente trabalham com materiais simples para realização da curva de refrigeração e congelação, como caixas de isopor com acréscimo de gelo para a curva de refrigeração e nitrogênio líquido para a curva de congelação. Apesar de apresentarem menor custo, o problema destes sistemas é falta de padronização da curva de refrigeração e de congelação, devido à grande variação no tamanho e condições de uso da caixa de isopor, o que resulta em variação nos resultados obtidos com a criopreservação (ABUD et al., 2014). De forma mais recente, foram desenvolvidos equipamentos programáveis de criopreservação de sêmen que permitem a seleção da curva de refrigeração e congelação desejada. Apesar da facilidade de aquisição desses equipamentos, o custo ainda é muito elevado quando comparado com técnicas de criopreservação mais simples e baratas que são utilizadas a campo (ABUD et al., 2014). Na busca por melhorar a sobrevivência espermática pós-descongelação, o objetivo do trabalho foi comparar dois sistemas de congelação (equipamento de criopreservação programável com curva de congelação de -15°C/min. vs caixa de isopor com nitrogênio líquido), com relação aos seus efeitos sobre a qualidade in vitro do sêmen bovino congelado.

Material e Métodos

Foram utilizados 12 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com idade entre três e seis anos, pertencentes ao Centro APTA Bovinos de Corte, unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia, localizado em Sertãozinho, SP, Brasil. Foi realizada a colheita de dois a quatro ejaculados por touro com o eletroejaculador Autojac® (Neovet®, Uberaba, Brasil), totalizando 38 ejaculados no total. Após avaliação inicial, os ejaculados obtidos foram diluídos de modo convencional, utilizando diluidor de fração única BotuBov® (BotuFarma®, Botucatu, Brasil), que contém 7% de glicerol, para concentração final de 50x10⁶ espermatozoides/mL. Após a diluição, foram envazadas 20 palhetas de 0,5 mL e colocadas em refrigerador doméstico comum por 4 horas a temperatura de 5°C. Após esse período, metade das amostras (10 palhetas) foram congeladas em um equipamento programável de congelação de sêmen portátil (S1; TK 4000®, Uberaba, Brasil), programado para realizar curva de congelação de -15°C/min, partindo de 5°C até -80°C. Após atingir esta temperatura, a taxa passou a ser de -20°C/min até -140°C. E outra metade (10 palhetas) em uma caixa de isopor de 45 litros (S2; dimensões internas de 36 cm de altura x 40 cm de comprimento x 31 cm de largura x 4,5 cm de espessura da parede), onde as palhetas foram colocadas a 3 cm do nitrogênio líquido (coluna de 2 cm), e a taxa de congelação foi de -19°C/min. Para as análises pós-descongelação foram utilizadas duas palhetas de cada sistema (S1 e S2) de cada ejaculado, retirando assim o efeito palheta. Após a descongelação foram realizadas as seguintes avaliações: análise da cinética espermática por sistema computadorizado (CASA) e análise de integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e H₂O₂ intracelular, por citometria de fluxo.

Resultados e Discussão

A busca por melhores taxas de refrigeração/congelação e descongelação das células espermáticas é motivo de estudos em diversas espécies animais (ABUD et al., 2014). A faixa de temperatura mais crítica para a refrigeração do espermatozoide está entre 15°C e 5°C, que determina o choque frio, temperatura de maior sensibilidade, especialmente para os espermatozoides bovinos (WATSON, 2000). Com relação aos sistemas de congelação, foi possível observar que o sistema S1 apresentou maiores valores de cinética espermática na maioria dos parâmetros analisados pós-descongelação em relação ao S2 (com exceção para os parâmetros BCF e LIN).

Tabela 1. Avaliação espermática do sêmen congelado em dois diferentes sistemas de congelação. Motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), células rápidas (RAP; %), velocidade do trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimento (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %) e linearidade (LIN; %). MPAI: membranas plasmática e acrossomal íntegras; HMP: alto potencial mitocondrial; LMP: baixo potencial mitocondrial; CI H₂O₂: células íntegras positivas para H₂O₂. EPM: erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas (P<0,05).

Variáveis	S1	S2	ERRO PADRÃO	P
MT%	37,6 ^a	30,9 ^b	1,1	<,0001
MP%	29,5 ^a	24,8 ^b	0,8	<,0001
RAP%	35,1 ^a	28,4 ^b	1,0	<,0001
VAP $\mu\text{m/s}$	78,8 ^a	74,6 ^b	0,5	0,01
VSL $\mu\text{m/s}$	66,3 ^a	64,5 ^b	0,4	0,02
VCL $\mu\text{m/s}$	131,2 ^a	121,2 ^b	1,1	0,01
ALH μm	5,4 ^a	4,9 ^b	0,05	<,0001
BCF Hz	29,4 ^b	31,2 ^a	0,3	<,0001
STR%	86,2 ^a	84,0 ^b	0,4	0,02
LIN%	53,7 ^b	56,5 ^a	0,4	0,01
MPAI (%)	36,2	35,4	0,8	0,23
HPMP (%)	48,7	47,0	1,0	0,48
LMP (%)	51,3	53,0	1,0	0,51
CIH ₂ O ₂ (%)	31,5	35,5	1,8	0,21

Fonte: Elaborado pelos autores.

Nas análises por citometria de fluxo não houve diferença entre os sistemas S1 e S2. É possível perceber que o S1 apresentou melhores resultados na cinética espermática pós-descongelação que o S2 (caixa de isopor) e esses resultados possivelmente refletem a variação existente entre as curvas de congelação entre os dois sistemas. O sistema S1 apresentou uma curva de congelação inicial mais lenta em relação ao sistema S2. Quando a curva de congelação é muito rápida, não ocorre a adequada desidratação de todas as células, levando a formação de cristais de gelo intracelular, que geram danos aos espermatozoides, reduzindo sua viabilidade pós-congelação (SIEME et al., 2016; WATSON, 2000). Uma adequada taxa de congelação é aquela que é suficientemente lenta para permitir a devida desidratação da célula, evitando a formação de cristais de gelo intracelulares, mas suficientemente rápida para evitar a exposição prolongada dos espermatozoides a soluções hipertônicas do ambiente extracelular ou tensão mecânica causada devido a um encolhimento muito rápido (MORRIS et al., 2007). Diferentemente do presente estudo, Forero-Gonzalez et al. (2012) não observaram diferença na cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial quando utilizaram o sistema programável de criopreservação espermática (refrigeração a -0,23°C/min. e congelação a -15°C/min.) e o convencional com a caixa de isopor e nitrogênio líquido (refrigeração a -0,55°C/min. e congelação a -19,1°C/min.). É importante ressaltar que diferentes fatores isolados ou associados, como a quantidade de solutos (crioprotetores no meio de congelação), tipo de envase, tempo e altura em relação ao nível do nitrogênio líquido em caixa de isopor e a taxa de congelação em máquinas programáveis, alteram a velocidade de congelação e a viabilidade espermática pós-descongelação (CLULOW et al., 2008).

Conclusões

A congelação realizada com sistema programável apresentou melhores resultados de cinética espermática que a congelação com caixa de isopor. Futuros estudos que avaliem o efeito dos diferentes sistemas de congelação sobre a fertilidade *in vivo* em bovinos ainda são necessários.

Agradecimentos

A Fapesp projeto 2014/11304-3.

Referências

- ABUD, C. O. G.; ABUD, L. J.; CARVALHO NETO, J. de O.; DODE, M. A. N.; SERENO, J. R. B.; MARTINS, C. F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 32-37, 2014.
- CLULOW, J. R.; MANSFIELD, L. J.; MORRIS, L. H. A.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 3, p. 298-308, 2008.
- FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; BRESSAN, F. F.; ARRUDA, R. P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Andrologia**, v. 44, n. 1, p. 154-159, 2012.
- 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**, v. 68, n. 5, p. 804-812, 2007.
- SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 2-5, 2016.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

Comportamento copulatório de onça pintada (*Panthera onca*)

Pedro Nacib Jorge Neto^{1*}, Cristiane Schilbach Pizzutto¹, Gediendson Ribeiro de Araujo², Thyara de Deco-Souza³

Resumo: Poucos artigos descrevem a fisiologia reprodutiva da onça pintada fêmea, e o comportamento copulatório foi descrito apenas por duas obras da década de 1970. Avaliamos 229 vídeos que mostraram o comportamento sexual de casais desta espécie, sendo avaliados os comportamentos da tentativa de copulação. Os resultados foram comparados com os descritos por Lanier e Dewsbury (1976). É essencial conhecer o comportamento reprodutivo do maior predador brasileiro, precisando intensificar a pesquisa nesta esfera.

Palavras-chave: Comportamento copulatório. Onça pintada. *Panthera onca*.

Distribution copulatory behavior of jaguar (*Panthera onca*)

Abstract: Few papers describe the reproductive physiology of the jaguar female, and copulatory behavior was described only by two works of the 1970s. We evaluated 229 videos that showed the sexual behavior of couples of this species, being evaluated the behaviors from the attempt to the copulation. The results were compared with those described by Lanier & Dewsbury (1976). It is essential to know the reproductive behavior of the largest Brazilian predator, needing to intensify research in this sphere.

Keywords: Copulatory behaviour. Jaguar. *Panthera onca*.

Introdução

Devido ao comportamento reservado e discreto dos grandes felinos e a dificuldade em se obter observações visuais, pouco sabe-se sobre seus parâmetros reprodutivos básicos (OWEN et al., 2010). Apesar de diversos trabalhos descreverem a fisiologia reprodutiva do macho de onça pintada, existem poucas publicações descrevendo sobre a da fêmea. O comportamento copulatório da onça pintada foi relatado por Stehlik (1971) no Zoológico em Ostrava (República Checa), porém foi descrito em apenas em 1976 por Lanier e Dewsbury (1976). Contudo, estes trabalhos são pouco conhecidos e diversos autores citam nunca haver sido publicado o comportamento desta espécie, informando que aparentam ser similar aos gatos domésticos ou a outras *Pantheras*. Lanier e Dewsbury (1976) estudaram e descreveram tecnicamente o comportamento de cópula de quatro espécies de *Panthera* (*P. pardus*, *P. uncia*, *P. tigris* e *P. onca*), concluindo que os padrões comportamentais foram qualitativamente similares entre estas, havendo pouca variação. Avaliaram cópulas de onça pintada e descrevem que a sequência inicia com a aproximação do macho junto à fêmea, podendo esta vocalizar antes da abordagem do macho, talvez indicando receptividade. Em seguida, a fêmea deita-se em decúbito ventral, desviando a cauda para o lado e expondo a região ano-genital ao macho. Os membros anteriores da fêmea ficam, em geral, alongados e os posteriores flexionados junto ao corpo. O macho monta por trás e sobre a fêmea, com esta entre suas patas dianteiras. Ele então aproxima sua região genital à da fêmea, agachando-se com os membros posteriores. A fêmea então desvia a cauda e o macho inicia o impulso pélvico extra-vaginal, que aparenta funcionar para a detecção do orifício vaginal. O macho demonstra um impulso pélvico quando ocorre a inserção do pênis. Durante a inserção, o macho mordisca três ou quatro vezes na nuca da fêmea. Esta, muitas vezes emite um rosnado baixo. No final da cópula, o macho emite um rugido, presumivelmente indicando a ejaculação. Após a cópula, geralmente a fêmea se volta para o macho. Lanier e Dewsbury (1976) informam que as onças-pintadas não demonstraram o rolamento em decúbito dorsal pós-cópula. Já Hancock (2000), indicou que em leopardos o rugido pós-copulatório é uma indicação de que a cópula ocorreu. Os rugidos pós-copulatórios são provavelmente emitidos durante a ejaculação, uma vez que não são emitidos durante cópulas falsas (quando o macho monta a fêmea sem penetração). Este trabalho visa avaliar filmagens de cópulas de onça pintada na tentativa de descrever o comportamento copulatório desta espécie.

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 05508-270, São Paulo, São Paulo.

² Projeto Onças do Rio Negro, Fazenda Barranco Alto, 79200-000, Aquidauana, Mato Grosso do Sul.

³ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

* pepovet@usp.br

Material e Métodos

Para a realização deste estudo foram utilizados 229 vídeos (sendo 19 oriundos de internet, no website youtube e 210 de gravações realizadas no Projeto Onças do Rio Negro, Rio Negro-MS), que mostravam o comportamento sócio sexual de casais de onça pintada, desde a tentativa até efetivação da cópula propriamente dita. Praticamente toda a metodologia de avaliação do comportamento utilizada foi baseada na classificação descrita por Lanier e Dewsbury (1976), assim sendo:

- Abordagem do macho: quando o macho aproxima-se da fêmea e inicia interação que leva à cópula;
- Vocalização pré-copulatória da fêmea: quando a fêmea vocaliza antes da monta;
- Proceptividade da fêmea: quando a fêmea solicita o macho, tipicamente voltando-se a ele, levando a região ano-genital próxima a ele;
- Agachamento da fêmea: quando a fêmea agacha-se em decúbito ventral, em postura de receptividade sexual;
- Vocalização do macho: quando o macho vocaliza durante a cópula;
- Balanceiro da fêmea: quando a fêmea, pós-cópula, vira-se e bate no macho com uma pata;
- Rolar da fêmea: rolamento em decúbito dorsal em até um minuto pós-cópula;
- Mordida ou lambedura do macho na nuca da fêmea: quando o macho lambe ou morde a nuca da fêmea no momento da cópula;

Além destes comportamentos avaliamos o comportamento do coito com movimentos pélvicos e introdução do pênis, os quais são sucedidos, quase sempre, pela ejaculação, e os com movimento pélvico, porém sem introdução peniana.

Resultados e Discussão

Verifica-se Apesar dos trabalhos de Lanier e Dewsbury (1976) e Stehlik (1971), não apontarem dados quantitativos quanto aos eventos comportamentais que compreendem a cópula da onça pintada, pudemos perceber que a descrição dos mesmos ainda pode ser considerada como uma referência para esta espécie.

Após a análise dos vídeos, pudemos constatar que o percentual de abordagem do macho na fêmea corresponde exatamente ao percentual de proceptividade que estas apresentavam, mostrando que a sinalização da fêmea para uma receptividade próxima é efetiva na atratividade do macho. Apenas em 58% dos comportamentos copulatórios ocorreu a penetração peniana durante o coito, apesar das fêmeas estarem proceptivas em 90% das observações. Este índice relativamente baixo pode justificar a intensa frequência de cópulas que ocorrem durante o cio das fêmeas, na tentativa de que a penetração ocorra com sucesso de ejaculação.

Assim como descrito por Hancock (2000) para leopardos, e por Lanier e Dewsbury (1976) para onça pintada, o rugido do macho durante a cópula foi constatado na totalidade de observações onde houve cópula com penetração peniana, sinalizando o sucesso da ejaculação.

Todo o posicionamento da fêmea, descrito por Lanier e Dewsbury (1976), como agachamento (membros anteriores alongados e os posteriores flexionados junto ao corpo) e balanceio da fêmea pôde ser constatado em nossas observações.

Lanier e Dewsbury (1976) afirmam não haver rolamento em decúbito dorsal da fêmea e não relatam nada sobre o rolamento lateral, comportamento este encontrado em quase a totalidade das nossas observações.

A chegada do macho por trás da fêmea, aproximando-se da região genital da mesma, em quase todos os episódios foi acompanhada de mordidas leves no pescoço ou lambeduras na nuca.

Conclusões

A necessidade de se conhecer comportamentos reprodutivos básicos é extremamente importante para o entendimento da fecundidade de uma espécie e todo o papel que ela representa dentro do seu ecossistema. Toda a relevância que onça pintada tem para a fauna brasileira é incompatível com a ausência de literatura sobre seu comportamento reprodutivo, mostrando que precisamos cada vez mais intensificar as pesquisas nesta esfera.

Referências

HANCOCK, D. **A time with leopards**. Cape Town, South Africa: Black Eagle Publishing, 2000.

LANIER, D. L.; DEWSBURY, D. A. A quantitative study of copulatory behaviour of large Felidae. **Behavioural Processes**, v. 1, n. 4, p. 327-333, 1976.

OWEN, C.; NIEMANN, S.; SLOTOW, R. Copulatory parameters and reproductive success of wild leopards in South Africa. **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 5, p. 1178-1187, 2010.

STEHLIK, J. Breeding jaguars at Ostrava Zoo. **International Zoo Yearbook**, v. 11, n. 1, p. 116-118, 1971.

Correlação entre a viabilidade espermática *in vitro* e a fertilidade *in vivo* em ovinos submetidos à inseminação artificial com sêmen criopreservado

Kárita da Mata Fuchs¹, Rodrigo Freitas Bittencourt^{1*}, Carmo Emanuel Almeida Biscarde¹, Mariana Alves de Andrade Silva¹, Kauã Carvalho dos Santos Moura¹, Adrielle da Silva Lima¹

Resumo: Houve correlações positivas entre testes de viabilidade espermática realizados *in vitro* e sua fertilidade *in vivo* utilizando 44 amostras de sêmen criopreservado que foram submetidos à avaliação através da associação de sondas fluorescentes: iodeto de propionato (IMP, integridade da membrana plasmática), JC-1 (PMM, potencial de membrana mitocondrial) e PSA (IAC, integridade acrossomal), além do teste supravital, corante de eosina (SV), com uso *in vivo* em cento e setenta (n = 170) ovelhas, em um protocolo de inseminação artificial. Com exceção de PMM e IAC, foi encontrada uma correlação positiva entre todos os parâmetros de integridade da membrana espermática, cujas interações evidenciadas entre IAC e SV e IAC e IMP foram altamente positivas. No entanto, não foi encontrada correlação significativa entre os testes de viabilidade espermática e a fertilidade *in vivo*, evidenciando as dificuldades no estabelecimento de preditores de fertilidade, apesar dos avanços crescentes nas técnicas de avaliação espermática.

Palavras-chave: Sondas fluorescentes. Integridade de membrana. Prenhez.

Correlation of *in vitro* sperm viability and *in vivo* fertility in sheep submitted to artificial insemination with cryopreserved semen

Abstract: There were positive correlations between sperm viability tests performed *in vitro* and their fertility *in vivo* using 44 samples of cryopreserved semen submitted to thawing and *in vitro* sperm evaluation through the association of fluorescent probes: Propionate iodide (IMP, plasma membrane integrity), JC-1 (PMM, mitochondrial membrane potential) and PSA (IAC, acrosomal integrity), in addition to the supravital test, dye eosin (SV), with *in vivo* use in one hundred and seventy (n = 170) sheep in artificial insemination protocol. With the exception of PMM and IAC, a positive correlation was found between all sperm membrane integrity parameters, whose interactions evidenced between IAC and SV and IAC and IMP were highly positive. However, no significant correlation was found between the sperm viability tests and *in vivo* fertility, evidencing the difficulties in establishing fertility predictors despite the increasing advances in sperm evaluation techniques.

Keywords: Fluorescent probes. Membrane integrity. Pregnancy.

Introdução

Um dos maiores desafios na andrologia consiste em estimar a fertilidade do reprodutor ou do sêmen criopreservado a partir de avaliações da célula espermática. Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática (número total de espermatozoides móveis, motilidade progressiva e morfologia) têm se mostrado limitados quanto à capacidade de prever o potencial de fertilidade do sêmen. Um único teste é pouco eficaz pelo fato de que cada espermatozoide apresenta múltiplos compartimentos subcelulares com diferentes funções a serem avaliadas (SANTOS, 2003). Desse modo, alguns testes complementares foram desenvolvidos (JANUSKAUSKAS et al., 2000). A taxa de concepção depende, portanto, da probabilidade de os espermatozoides ejaculados passarem por completa modificação morfológica, bioquímica e biofísica, capacitando-se e permitindo a reação acrossômica quando em contato com a zona pelúcida do ovócito. No entanto, poucos parâmetros espermáticos únicos mostram uma correlação significativa com a fertilidade *in vivo* para amostras de sêmen dentro de intervalos aceitáveis de normalidade (KOVAC et al., 2013). Nesse contexto, o presente estudo tem por objetivo avaliar as correlações entre

¹ Universidade Federal da Bahia, 40170-115, Salvador, Bahia.

* rfb@ufbal.br

viabilidade espermática *in vitro* e a fertilidade *in vivo* em ovinos submetidos à inseminação artificial com sêmen criopreservado.

Material e Métodos

Utilizou-se 44 amostras (n=44) de sêmen criopreservadas submetidas à descongelação e avaliações espermáticas *in vitro* com posterior utilização *in vivo* em cento e setenta fêmeas (n=170) ovinas em um programa de inseminação artificial em tempo fixo (IA).

As amostras de sêmen foram coletadas com o auxílio de vaina artificial com água aquecida entre 42 a 50°C, tendo como manequim uma fêmea em estro natural. Após isso, a amostra foi encaminhada para o laboratório e avaliada quanto aos padrões espermáticos preconizados por Henry e Neves (1998). O teste supravital com corante eosina foi realizado para a avaliação da integridade da membrana plasmática do sêmen *in natura*.

As amostras foram descongeladas em banho-maria à 38°C por 50 segundos com trinta a noventa dias após congelamento. Após descongelamento, uma alíquota da amostra foi retirada para as avaliações *in vitro*. Procedeu-se com o teste supravital da mesma forma como realizado no sêmen *in natura*.

Para a avaliação da integridade das membranas espermáticas foi empregada a associação das sondas fluorescentes iodeto de potássio – IP (MARTINEZ-PASTOR et al., 2004) (IMP, integridade de membrana plasmática), iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-110 (PMM, potencial de membrana mitocondrial) e aglutinina de Pisum sativum conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA11 (IAC, integridade da membrana acrossomal). A avaliação da alíquota foi feita através de microscópio epifluorescente e a classificação das células se baseou na técnica descrita por (CELEGHINI, 2005). A integridade do DNA foi avaliada pelo teste do Cometa (TINT- Intensidade de brilho da cauda formada pelos fragmentos de DNA e TMOM- Comprimento da cauda).

As inseminações em tempo fixo, com o sêmen descongelado foram realizadas por laparoscopia, em cento e setenta fêmeas ovinas.

A análise descritiva das variáveis (médias e desvio-padrão) e correlações foram obtidas através do procedimento MEANS e CORR, respectivamente, com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Foi observado correlações altamente positivas ($P < 0,001$) entre a taxa de integridade da membrana plasmática, obtida pelo teste supravital com corante eosina (SV) e os parâmetros de integridade da membrana espermática (IMP, IAC, PMM), demonstrando eficácia para a avaliação da integridade estrutural da célula e sua importância para estimar a viabilidade espermática nas atividades de rotina de campo e pesquisa. O teste SV não apresentou correlação positiva com o TINT (parâmetro que avalia níveis de lesão no DNA espermático associada ao TMOM), mas apresentou tendência ($P = 0,08$) como observado na Tabela 1, o que o qualifica ainda mais para análise de qualidade espermática.

Tabela 1. Coeficientes de correlações observados entre os parâmetros de cinética espermática e os de integridade das membranas espermáticas e DNA. Coeficientes de correlação obtidos pelo teste de correlação linear de Pearson. Integridade da membrana plasmática pelo teste supravital eosina (SV), integridade da membrana plasmática (IMP) e acrossomal (IAC) e alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), observados pela associação das sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1 (1000X). Tail intensity (TINT, intensidade do DNA contido na cauda do cometa), tail moment (TMOM, produto da porcentagem de DNA presente na cauda e o comprimento da mesma a partir do centro de gravidade da cabeça do cometa) e taxa de prenhez das fêmeas inseminadas. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$.

	SV	IMP	IAC	PMM	MPH	TINT	TMOM	TP
SV	1,00	-	-	-	-	-	-	-
IMP	0,82***	1,00	-	-	-	-	-	-
IAC	0,71***	0,76***	1,00	-	-	-	-	-
PMM	0,36*	0,34*	0,16	1,00	-	-	-	-
TINT	0,27	0,34*	0,41**	0,09	0,24	1,00	-	-
TMOM	0,07	0,35*	0,30	0,12	0,08	0,65***	1,00	-
TP	0,17	0,17	0,23	0,01	0,01	-0,06	0,09	1,00

Fonte: Elaborado pelos autores.

O mesmo padrão de interação entre SV e IMP, IAC e PMM foi verificado para IMP que, além disso, demonstrou correlação positiva entre os parâmetros que avaliaram os níveis de lesão no DNA espermático, TINT ($r=0,34$; $P<0,05$) e TMOM ($r=0,35$; $P<0,05$). A IAC, assim como a IMP também demonstrou interação positiva com TINT ($r=0,41$; $P<0,01$) e tendência com TMOM ($r=0,30$; $P=0,06$).

A correlação dos parâmetros de integridade das membranas espermáticas e a avaliação de níveis de lesão do DNA espermático, está de acordo ao achado por Peris et al. (2004), que observaram em ovinos a existência de correlação entre a viabilidade espermática e lesões de DNA. Isto sugere que os mecanismos que desencadeiam alterações estejam envolvidos e ocorram de forma sinérgica, reduzindo a capacidade fertilizante da célula espermática.

Ainda, o PMM apresentou correlação ($P<0,05$) com os parâmetros relacionados à integridade da membrana plasmática (SV e IMP). O mesmo foi observado por Gonzalez (2004) e Bollwein et al. (2008) quando avaliaram as correlações entre PMM e IMP, ao contrário de Martinez-Pastor et al. (2004), que reportaram ausência de correlação.

Pode-se verificar que todos os parâmetros de integridade da membrana plasmática correlacionaram-se entre si de forma positiva ($P<0,05$), exceto PMM e IAC. E as interações foram altamente positivas e significantes entre IAC e SV e IAC e IMP ($r=0,71$ e $r=0,76$, respectivamente; $P<0,0001$). A correlação entre IAC e IMP, pode estar ligada à relação entre os mecanismos de ocorrência das alterações acrossomais e da membrana plasmática, de forma que estão relacionadas às injúrias diretas provocadas pelo processo de criopreservação (variação osmótica, desidratação e formação de macrocristais intracelulares) ou pelo processo cronológico de degradação celular (GREEN; WATSON, 2001).

Nenhum dos parâmetros estudados apresentou correlação significativa com a fertilidade das fêmeas inseminadas.

Conclusões

O teste supra vital com corante de eosina apresentou aplicabilidade na área da pesquisa, devido a sua praticidade e correlação positiva com a integridade das membranas espermáticas obtidas através da fluorescência. Por outro lado, não foi possível confirmar correlação significativa entre os testes de viabilidade espermática analisados e a fertilidade *in vivo*, mostrando a grande dificuldade em se estabelecer testes preditores de fertilidade, apesar do crescente avanço nas técnicas de avaliação espermática.

Agradecimentos

A CNPq e FAPESB.

Referências

- BOLLWEIN, H.; FUCHS, I.; KOESS, C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 2, p. 189-195, 2008.
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. 2004. 92 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.
- GREEN, C. E.; WATSON, P. F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 889-898, 2001.
- HENRY, M.; NEVES, J. P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49 p.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**, v. 53, n. 4, p. 859-875, 2000.

KOVAC, J. R.; PASTUSZAK, A. W.; LAMB, D. J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 4, p. 998-1007, 2013.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1, p. 121-133, 2004.

PERIS, S. I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, p. 224-233, 2004.

SANTOS, G. C. J. **Viabilidade de sêmen eqüino congelado em meios diluidores de diferentes composições**. 2003. 58 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas gerais, Belo Horizonte.

Criptorquidismo abdominal completo bilateral em equino: relato de caso

Catharina de Albuquerque Vieira¹, Rodrigo Freitas Bittencourt^{1}, Marcus Vinícius Galvão Loiola¹, Larissa Rodrigues Santana¹, Morgana Duarte Felix¹, Alessandro Bittencourt Nascimento¹, Anderson Luiz de Araújo¹, Maristela de Cassia Seudo Lopes¹, Marcela Próspero Rodrigues Pinto¹*

Resumo: O criptorquidismo é uma condição reprodutiva comum em cavalos. Pode ser classificado de acordo com a localização do testículo e a prevalência de retenção à direita ou à esquerda estando diretamente relacionada ao processo de descida testicular no feto equino. Em casos bilaterais, causa infertilidade. É uma condição hereditária, e é por isso que a castração de criptorquidas unilaterais deve ser realizada. Os cavalos criptorquidas podem apresentar um comportamento agressivo, situação que dificulta o tratamento. Os métodos de diagnósticos incluem uma história confiável, palpação inguinal, palpação transretal e ultra-sonografia, e testes endócrinos. Existem várias técnicas descritas para a remoção do testículo retido. O objetivo deste estudo foi descrever o caso de um cavalo com criptorquidismo abdominal bilateral submetido à criptorquiectomia parainguinal para resolver esta condição clínica.

Palavras-chave: Cavalo. Criptorquida. Testículos.

Bilateral complete abdominal cryptorchidism in equine: case report

Abstract: Cryptorchidism is a common reproductive condition in horses. It can be classified according to the location of the testicle and the prevalence of retention on the right or left is directly related to the process of testicular descent in the equine fetus. In bilateral cases it causes infertility. It is a hereditary condition, which is why castration of unilateral cryptorchids should be performed. Cryptorchid equines may present aggressive behavior, a situation that makes their handling difficult. Diagnostic methods include a reliable history, inguinal palpation, transrectal palpation and ultrasonography and endocrine tests. There are several techniques described for the removal of the retained testicle. The objective of this study was to describe the case of a bilateral complete abdominal cryptorchid equine that underwent para-inguinal cryptorchidectomy to resolve this clinical condition.

Keywords: Cryptorchid. Horse. Testis.

Introdução

A palavra criptorquida deriva do grego “kriptos” que significa oculto e “orquis”, testículos. O termo se refere à retenção de um ou ambos os testículos ao longo da trajetória de descenso à bolsa escrotal. Devido à temperatura, o epitélio tubular do testículo retido não se desenvolve completamente e perde a função exócrina (DENES et al., 2008; ARIGHI et al., 1988; GUYTON, 1991). Sendo assim, cavalos criptorquidas unilaterais são normalmente férteis, enquanto criptorquidas bilaterais são estéreis. No entanto, a função endócrina das gônadas retidas está mantida, as células de Leydig continuam a produzir testosterona (GENETZKY et al., 1984).

O processo de migração dos testículos é mediado pela testosterona e ocorre pela ação de dois fatores: o gubernáculo, estrutura anatômica que conecta o testículo ao peritônio e invagina para o interior do canal inguinal, tracionando o testículo para dentro da bolsa escrotal; e pelos órgãos abdominais que pressionam o testículo para o escroto em formação (HAFEZ, E. S.; HAFEZ, B., 2004). Na espécie equina, as gônadas progressivamente aumentam de volume até o oitavo mês fetal e, em seguida, sofrem redução de cerca de 40% do seu tamanho por influência de hormônios maternos (COLLIER, 1980; COX, 1982; DYCE et al., 1997).

Se o testículo ficou retido no canal inguinal, caracteriza um criptorquidismo inguinal e deve ser diferenciado de um testículo móvel, que pode ser direcionado por palpação do escroto ao canal inguinal e deve perder a mobilidade à puberdade. Se o testículo está no subcutâneo e não pode ser deslocado manualmente à bolsa escrotal é chamado de testículo ectópico. Um equino pode ser denominado um criptorquida abdominal completo quando testículos e epidídimos estão retidos no abdômen. Quando os testículos estão no abdômen, porém uma porção do epidídimo

¹ Universidade Federal da Bahia, 40170-115, Salvador, Bahia.

* rfb@ufbal.br

encontra-se no canal inguinal, denomina-se um criptorquidismo abdominal parcial ou incompleto (BRINSKO et al., 2010).

O criptorquidismo é hereditário em várias espécies de mamíferos, incluindo suínos, cães, ovinos, caprinos e equinos. A base genética na espécie equina ainda não está completamente clara, porém alguns estudos sugerem uma herança dominante (HAYES, 1986; JONES; BOGART, 1971). Esta suposta herdabilidade é um fator importante para não se indicar a reprodução dos animais afetados (LU, 2005).

O diagnóstico é baseado no detalhado exame físico. Ultrassonografia transretal e testes endocrinológicos como testosterona basal, sulfato de estrona e gonadotropina coriônica humana são auxiliares no diagnóstico (LU, 2005). O tratamento é exclusivamente cirúrgico e as opções mais tradicionais incluem acesso inguinal, parainguinal, suprapúbico paramediano e acesso pelo flanco. Mais recentemente, a criptorquidectomia tem sido descrita com a utilização de técnicas laparoscópicas, em decúbito ou estação (SEARLE et al., 1999).

O presente trabalho visa descrever um caso de criptorquidismo abdominal bilateral em um equino atendido no Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, no qual se realizou a técnica de criptorquidectomia parainguinal para a resolução da condição clínica que cursava com agressividade, dificultando o manejo do animal.

Material e Métodos

Um equino, macho, mestiço, cinco anos, foi admitido ao Setor de Clínica e Cirurgia de Grandes Animal do Hospital de Medicina Veterinária Prof. Renato R. de Medeiros Neto – Universidade Federal da Bahia, com histórico de agressividade, dificuldade de ganho de peso e ausência, desde sempre, de ambos os testículos na bolsa escrotal. Foi relatado que o animal já cobriu uma égua, sem gerar concepção.

Ao exame clínico geral, apresentava atitude alerta, baixo escore corporal, sem alterações nos parâmetros fisiológicos para a espécie. Ao exame clínico específico, não apresentava os testículos em topografia escrotal e não se observou estruturas testiculares à palpação inguinal profunda bilateral. Devido ao temperamento do animal, não foi possível a realização do exame de palpação e ultrassonografia transretal para busca dos testículos em cavidade abdominal. Frente à impossibilidade de se realizar testes diagnósticos adicionais, optou-se por realizar laparotomia para pesquisa das gônadas na cavidade peritoneal.

No pré-operatório foram administrados Acepromazina (0,08mg/kg), Butorfanol (0,04mg/kg) e Detomidina (3µg/kg). Para indução anestésica utilizou-se Cetamina (2,2mg/kg) + Midazolam (0,02mg/kg/min) e para manutenção utilizou-se Isoflurano (dose-efeito). Realizou-se infusão de Dobutamina (5µg/kg/min) durante o trans-operatório.

Com o animal em decúbito dorsal, o acesso à cavidade abdominal foi feito por meio de incisões (10 cm) para-inguinais bilaterais realizadas nas fâscias dos músculos oblíquos abdominais externos e internos até chegar ao peritônio, por onde se acessou a cavidade manualmente, palpou-se o canal inguinal e localizou-se cada testículo em região retrovesical. Efetuou-se criptorquidectomia com ligadura dos vasos, ductos deferentes e músculo cremaster com fio PDS nº0. A síntese da musculatura foi realizada com fio Prolene nº2, padrão Sultan. Redução de espaço morto do tecido subcutâneo com Poliglactina nº0, seguida pela dermorrafia com nylon 0 no padrão Donatti.

Resultados e Discussão

Verifica-se O criptorquidismo ocorre com elevada frequência e é uma das afecções testiculares congênitas mais comuns nos equinos (LEIPOLD et al., 1986). Segundo alguns autores, a raça de maior ocorrência é a Quarto de Milha (STICKLE; FESSLER, 1978) e nos cavalos Árabes e Puro Sangue Inglês há uma baixa incidência da alteração (LU, 2005). O equino do presente estudo é um mestiço de Quarto de Milha e PSI, acredita-se que a ocorrência maior em determinadas raças esteja relacionada à casuística da região estudada.

A idade de ocorrência varia com o tempo que se leva até o diagnóstico definitivo (SMITH, 1994). A faixa etária de maior ocorrência varia entre os quatro e seis anos (45%) (CATTELAN et al., 2004). O equino relatado se encontrava na faixa etária citada, idade em que a maioria dos animais começa a ser posta para trabalho/esporte.

A retenção testicular não é obrigatoriamente simétrica, a criptorquidia unilateral é mais comum que a bilateral (ARIGHI et al., 1988; ACKLAND, 2001). Em equinos, o testículo direito tende a ficar retido a nível inguinal, enquanto o esquerdo tende a permanecer na cavidade abdominal. Este achado está de acordo com observações de que durante a descida testicular no feto equino, o testículo direito adentra o canal inguinal mais cedo do que o esquerdo (BERGIN et al., 1970; COX et al., 1979). O equino do presente caso apresentou a retenção à nível abdominal dos dois testículos, condição não muito frequente para a espécie. Um levantamento com 500 animais que padeciam da afecção encontrou apenas 5,8% de criptorquidas abdominais completos bilaterais (COX et al., 1979).

O animal do estudo era muito bravo, não se deixava domar, concordando com a teoria de que cavalos criptorquídios geralmente são mais nervosos do que garanhões normais, tendo a libido aumentada e mostrando-se mais agressivos, devido à produção elevada de andrógenos no testículo retido (THOMASSIAN, 2005). A literatura relata que testículos retidos são hipoplásicos, menos consistentes à palpação, apesar de apresentarem alterações fibróticas (THOMASSIAN, 2005), tais alterações macroscópicas foram observadas nos testículos do caso em questão. Microscopicamente, observaram-se achados compatíveis com degeneração testicular, compatível com achados descritos anteriormente (CATTELAN et al., 2004).

Conclusões

Animais criptorquídios costumam ter comportamento que dificulta a sua doma. A criptorquiectomia é indicada tanto para casos bilaterais, para facilitar o manejo do animal, como para os casos unilaterais, para evitar a propagação da característica nas linhagens de equinos. Sem intercorrências no trans e pós-cirúrgico, a resolução do caso foi bem-sucedida.

Referências

- ACKLAND, H. M. Reproductive system: male. In: MACGAVIN, M. D.; CARLTON, W. W.; ZACHARY, J. F. **Thomson's special veterinary pathology**. 3rd ed. Saint Louis: Mosby, 2001. p. 635-652.
- ARIGHI, M.; HORNEY, J. D.; BOSU, W. T. K. Noninvasive inguinal approach for cryptorchidectomy in thirty-eight stallions. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 29, n. 4, p. 346-349, 1988.
- BERGIN, W. C.; GIER, H. T.; MARION, G. B.; COFFMAN, J. R. A developmental concept of equine cryptorchism. **Biology of Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 82-92, 1970.
- BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. **Manual of equine reproduction**. 3rd ed. Missouri, USA: ELSEVIER, 2010.
- CATTELAN, J. W.; MACORIS, D. G.; BARNABE, P. A.; URBINATI, E. C.; MALHEIROS, E. B. Criptorquismo em equinos: aspectos clínico-cirúrgicos e determinação da testosterona sérica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 150-156, 2004.
- COLLIER, M. A. Equine cryptorchidectomy: surgical considerations and approaches. **Modern Veterinary Practice**, v. 61, n. 6, p. 511-517, 1980.
- COX, J. E. Factors affecting testis weight in normal and cryptorchid horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 129-134, 1982.
- COX, J. E.; EDWARDS, G. B.; NEAL, P. A. An analysis of 500 cases of equine cryptorchidism. **Equine Veterinary Journal**, v. 11, n. 2, p. 113-116, 1979.
- DENES, F. T.; SAITO, F. J.; SILVA, F. A.; GIRON, A. M.; MACHADO, M.; SROUGI, M. Laparoscopic diagnosis and treatment of nonpalpable testis. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 34, n. 3, p. 329-335, 2008.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 720 p.
- GENETZKY, R. M.; SHIRA, M. J.; SCHNEIDER, E. J.; EASLEY, J. K. Equine cryptorchidism: pathogenesis, diagnosis, and treatment. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 6, p. 577-582, 1984.
- GUYTON, A. C. **Textbook of medical physiology**. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1991. 889 p.
- HAFEZ, E. S.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo, SP: Manole, 2004. 513 p.
- HAYES, H. M. Epidemiological features of 5009 cases of equine cryptorchism. **Equine veterinary Journal**, v. 18, n. 6, p. 467-471, 1986.
- JONES, W. E.; BOGART, R. **Genetics of the horse**. EAST LANSING, USA: CABALLUS PUBLISHERS, 1971.
- LEIPOLD, H. W.; DEBOWES, R. M.; BENNETT, S.; COX, J. H.; CLEM, M. F. Cryptorchidism in the horse: genetic implications. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 31., 1986, Toronto, USA. **Proceedings...** Toronto, USA: AAEP, 1986. p. 579-589.
- LU, K. G. Clinical diagnosis of the cryptorchid stallion. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 4, n. 3, p. 250-256, 2005.

SEARLE, D.; DART, A. J.; DART, C. M.; HODGSON, D. R. Equine castration: review of anatomy, approaches, techniques and complications in normal, cryptorchid and monorchid horses. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 7, p. 428-434, 1999.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1994. 150 p.

STICKLE, R. L.; FESSLER, J. F. Retrospective study of 350 cases of equine cryptorchidism. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 3, p. 343-346, 1978.

THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos cavalos**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2005. 320 p.

Descrição de coleta de sêmen em *Leopardus guttulus* pelo método de cateterismo uretral

Regina Celia Rodrigues da Paz^{1*}, Cristina Harumi Adania², Jéssica da Silva Paulino², Gabriella Accardi Iglesias¹, Lindsey Vansandt³, Willian Frederick Swanson³

Resumo: O gato-do-mato-pequeno é um felino neotropical que ocorre em todo o Brasil e atualmente está listado como vulnerável pela Lista Vermelha de Animais Ameaçados da União Internacional para a Conservação da Natureza (PAYAN; OLIVEIRA, 2016). O método mais utilizado para a coleta de sêmen em animais selvagens é a eletroejaculação, pois pode ser realizada em animais anestesiados. No entanto, existe o risco de contaminação do sêmen por urina e a necessidade de equipamentos, que dificultam as coletas em animais de vida livre. A fim de facilitar a coleta de sêmen em gatos selvagens livres, o método de cateterismo uretral oferece uma alternativa fácil, econômica e eficiente para a obtenção de sêmen. O objetivo deste estudo foi comparar a metodologia de coleta de sêmen por cateterismo uretral em gatos-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*) utilizando dois protocolos anestésicos distintos.

Palavras-chave: Anestesia. Felídeos. Reprodução.

Description of *Leopardus guttulus* semen collection using urethral catheterization method

Abstract: The Tigrinus is a small Neotropical Feline that occurs throughout the Brazil and currently listed as vulnerable at the International Union for Conservation of Nature Endangered Animals Red List of Threatened Species (PAYAN; OLIVEIRA, 2016). The most widely used method for semen collection in wild animals is electroejaculation, because can be performed in anesthetized animals. However, there is a risk of semen contamination by urine and the need for equipment, making the free-living animals collections limited. In order to facilitate the collection of semen in free wild cats, the urethral catheterization method offers an alternative easy, cheap and efficient to obtaining semen. The aim of this study was to compare the methodology of semen collection for urethral catheterization in Tigrinus (*Leopardus guttulus*) using two different anesthetic protocols.

Keywords: Anesthesia. Felides. Reproduction.

Introdução

O gato-do-mato-pequeno é um felino Neotropical que ocorre em todo o Brasil e atualmente está listado como vulnerável pela Lista Vermelha de Animais Ameaçados da União Internacional para Conservação da Natureza (PAYAN; OLIVEIRA, 2016). Análises genéticas encontraram um nível de divergência entre *L. tigrinus* da Costa Rica (*L. tigrinus*) e da região central (*L. tigrinus tigrinus*) e do sul do Brasil (*L. guttulus*) comparável entre espécies no grupo *Leopardus*, sugerindo que estas populações foram isoladas, talvez pelo rio Amazonas, há aproximadamente 3,7 milhões de anos, no entanto, mais análises de particionamento geográfico serão necessárias para confirmar se este táxon deve ser dividido em duas espécies (TRIGO et al., 2008). Frente a isso, o armazenamento de sêmen dessas diferentes subespécies, que futuramente poderão figurar como espécies distintas, será muito importante em um futuro próximo, visando o manejo reprodutivo adequado dos animais. A eletroejaculação é o método mais utilizado em animais selvagens, pelo fato de poder ser realizado em animais anestesiados. No entanto, existe o risco da contaminação do sêmen por urina, a probabilidade de não obtenção de sêmen e a necessidade de equipamentos, que dificultam as coletas em animais de vida livre. Com o intuito de facilitar a coleta de sêmen em felídeos em vida livre, o método da cateterização uretral vem oferecer uma alternativa fácil, barata e eficiente de obtenção de sêmen. O

¹ Universidade Federal de Mato Grosso, 78060-900, Cuiabá, Mato Grosso.

² Centro Brasileiro para Conservação de Felinos Neotropicais, Associação Mata Ciliar, 13212-010, Jundiá, São Paulo.

³ Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife, Cincinnati Zoo & Botanical Garden, Cincinnati, Ohio, USA.

* reginacrpaz@gmail.com

objetivo deste trabalho foi comparar a metodologia de coleta de sêmen por cateterismo uretral em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*) utilizando dois protocolos anestésicos: Cetamina/Midazolan e Cetamina/Detomidina.

Material e Métodos

Foram utilizados dois animais machos adultos (L1 e L2) pertencentes a Associação Mata Ciliar, localizada em Jundiá/SP. Os animais foram mantidos pareados em recintos separados, apresentando boas condições corporais. O animal L1 foi contido com puçá e recebeu injeção intramuscular contendo Cetamina (24mg) e Midazolan (2,4 mg), no entanto, para manipulação segura do animal foi necessária uma segunda dose de Cetamina (12 mg) e Midazolan (1,2 mg). Após decúbito, o animal foi transferido ao Laboratório onde foi mantido em anestesia inalatória com Isoflurano (1-2%) via máscara. O animal L2 foi contido com puçá e recebeu injeção intramuscular contendo Cetamina (15mg) e Detomidina (0,15mg). Após decúbito, foi transferido ao Laboratório onde foi mantido em anestesia inalatória com Isoflurano (1%) via máscara. Inicialmente, o pênis foi exposto higienizado com solução fisiológica e gaze. O cateter (Tomcat 3.5) foi inserido no pênis do animal atingindo aproximadamente 6 cm dentro da uretra, ligeiramente rolando e retirado. Esse procedimento foi realizado após o intervalo de aproximadamente 30 minutos da imobilização química dos animais. As amostras foram colocadas em microtubos com o auxílio de uma seringa de 1 mL conectada ao final do cateter, após sua retirada da uretra, e imediatamente analisadas quando ao volume (mL), pH, motilidade (%), vigor (0-5) e concentração ($\times 10^6$ / mL). Uma alíquota foi fixada para análise da morfologia e outra para avaliação de acrossoma utilizando a coloração Rosa Bengala/Fast Green (POPE et al., 1991).

Resultados e Discussão

O resultado das análises encontra-se na (Tabela 1). O presente estudo relata pela primeira vez a utilização da técnica de cateterização para coleta de sêmen em uma espécie de pequeno felino brasileiro, o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*). A técnica utilizada foi eficiente apenas no macho L2, que foi anestesiado com a associação Ketamina-Detomidina. No animal L1 anestesiado com Ketamina-Midazolan, não foi possível a obtenção de espermatozoides utilizando-se essa metodologia. Estudos anteriores afirmam que para utilização desta técnica há necessidade da administração de alfa2 agonistas para alcançar o efeito adrenérgico sobre os canais deferentes (ZAMBELLI et al., 2007; MACDONALD; MACGRATH, 1980) o que foi confirmado neste estudo. O diâmetro do cateter foi adequado para a espécie, sendo possível recuperar amostras em ambos os machos: L1 (0,018mL) e L2 (0,023mL), no entanto, o macho L1 não apresentou espermatozoides no fluido coletado. A análise imediata da amostra coletada do macho L2 apresentou motilidade (85%) superior à média de 18 ejaculados ($62,1\% \pm 5,7$) recuperados por eletroejaculação (MORAIS, 2001), assim como a concentração (1.370×10^6 /mL) quando comparada a média encontrada pelo mesmo autor ($78,5 \times 10^6$ /mL $\pm 28,1$) (MORAIS, 2001), sendo que a morfologia normal encontrada (31%) ficou próxima a média previamente descrita ($35,6\% \pm 6,0$) (MORAIS, 2001). No entanto, o volume foi inferior (0,023mL) quando comparado à média anteriormente encontrada de $0,11 \pm 0,02$ (MORAIS, 2001). Não temos dados comparativos quanto ao vigor e morfologia do acrossoma, mas os resultados encontrados neste experimento apresentam valores considerados muito bons, com 91% de acrossomas intactos e 4% de vigor. A técnica do cateterismo uretral foi utilizada pela primeira vez em gatos domésticos (ZAMBELLI et al., 2008), sendo posteriormente aplicada em animais selvagens como leões (*Panthera leo*) (LUEDERS et al., 2012) e jungle cat (*Felis chaus*) (KHEIRKHAH et al., 2017). Comparando-se as técnicas de colheita de sêmen por eletroejaculação e cateter uretral em gatos domésticos, pode-se afirmar que com o cateterismo os volumes ejaculados são menores, porém a concentração é mais alta (FILLIERS et al., 2010), o que também foi demonstrado em leões africanos (LUEDERS et al., 2012). Em nosso estudo, também verificamos um volume menor de sêmen com maior concentração, comparado aos dados obtidos por eletroejaculação por outro autor (MORAIS, 2001). Da mesma maneira, as demais variáveis analisadas apresentaram valores iguais ou superiores, demonstrando a boa qualidade do sêmen colhido por cateterismo.

Tabela 1. Análise seminal de *Leopardus guttulus* após colheita de sêmen por cateterismo uretral, Jundiá, SP, 2017.

(-) Dados não analisados.

Análises/Tratamento	L1 (Cetamina-Midazolam)	L2 (Cetamina-Detomidina)
Volume (mL)	0,018	0,023
pH	7,4	8,3
Motilidade (%)	-	85
Vigor (0-5)	-	4
Concentração ($\times 10^6$ /mL)	-	1370
Acrossoma intacto (%)	-	91
Morfologia normal (%)	-	31
Defeitos Primários (%)	-	10

Defeitos Secundários (%)

-

59

Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

Mais estudos com coletas seriadas e comparação das técnicas de eletroejaculação e cateterização serão necessárias para podermos afirmar qual a melhor técnica a ser usada, no entanto, as vantagens deste método como baixa contaminação por urina, facilidade e baixo custo nos fazem recomendar sua utilização, uma vez que, apresentaram resultados satisfatórios com relação à concentração espermática, motilidade, vigor e integridade de acrossoma, tornando-se uma técnica promissora para utilização em animais selvagens, principalmente aqueles ameaçadas de extinção.

Agradecimentos

Centro Brasileiro para Conservação de Felinos Neotropicais, Associação Mata Ciliar, Jundiá/SP e Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife, Cincinnati Zoo & Botanical Garden/ USA.

Referências

- 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**, v. 74, n. 1, p. 31-39, 2010.
- KHEIRKHAH, M. S.; MOLLAPOUR SISAKHT, M.; MOHAMMADSADDEGH, M.; MOSLEMI, H. R. Sperm evaluation of Jungle Cat (*Felis chaus*) obtained by urethral catheterization (CT) after medetomidine administration. **Theriogenology**, v. 91, p. 17-20, 2017.
- 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**, v. 78, n. 3, p. 696-701, 2012.
- MACDONALD, A.; MCGRATH, J. C. The distribution of adrenoceptors and other drug receptors between the two ends of the rat vas deferens as revealed by selective agonists and antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 445-458, 1980.
- MORAIS, R. N. Reproduction in small felid males. In: FOLWER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine, and surgery of south american wild animals**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 2001. p. 312-316.
- PAYAN, E.; OLIVEIRA, T. de. **Leopardus tigrinus**. The Iucn Red List of Threatened Species. Red list 2016. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/54012637/0>>. Acesso em: 25 abr. 2017.
- POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.
- TRIGO, T. C.; FREITAS, T. R. O.; KUNZLER, G.; CARDOSO, L.; SILVA, J. C. R.; JOHNSON, W. E.; OBRIEN, S. J.; BONATTO, S. L.; EIZIRIK, E. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 19, p. 4317-4333, 2008.
- 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**, v. 68, n. 5, p. 796-803, 2007.
- 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. 69, n. 4, p. 485-490, 2008.

Dietas ricas em grãos oleaginosos e qualidade seminal em bovinos confinados: dados parciais

Eduardo Antonio de Almeida Rossignolo^{1}, Fernanda Battistotti Barbosa¹, Camile Sanches Silva¹, Heitor Valeriano¹, Bruno Milan¹, Raiza Rocha Pereira¹, Luiz Carlos Cesar da Costa Filho¹, Luis Carlos Vinhas Itavo¹, Breno Fernandes Barreto Sampaio¹, Eliane Vianna da Costa e Silva¹*

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de analisar qual fonte de proteína vegetal seria mais adequada na alimentação de touros confinados para reprodução sem danificar os ejaculados, utilizando grãos disponíveis em Campo Grande, MS. Foram utilizados quatro tratamentos consistindo em um tratamento padrão com soja, girassol e semente de algodão. O conteúdo de proteína bruta (PB) foi de 15% e a energia total disponível (NDT) variou de 72 a 77%. O peso foi alterado de acordo com os tratamentos, mas os parâmetros reprodutivos não foram afetados. Assim, o critério econômico da escolha do grão pode ser usado.

Palavras-chave: Nutrição. Sêmen. Touros.

Diets rich in oilseeds and seminal quality in confined cattle: partial data

Abstract: The study aimed to analyze which source of vegetable protein would be most suitable for the confinement of bulls destined for breeding without damaging the ejaculates, using grains available in Campo Grande, MS. Four treatments consisting of a standard treatment, soybean, sunflower and cottonseed were used. PB content was 15% and NDT ranged from 72 to 77%. The weight was changed according to the treatments, but the reproductive parameters were not affected. So, the economic criterion of grain choice can be used.

Keywords: Nutrition. Semen. Bulls.

Introdução

O uso de dietas equilibradas quanto ao nível de proteína e energia tem demonstrado levar a um desenvolvimento sexual adequado e a uma boa qualidade seminal na vida adulta. Em excesso a proteína pode afetar touros destinados à venda ou a pista, em que ocorra alimentação excessiva podera afetar capacidade reprodutiva (SKINNER, 1981). Ainda que a disponibilidade dos grãos utilizados na composição da dieta, seja variável de acordo com a localização, dietas a base de farelo de milho e de soja são uma realidade para todos criadores.

O grão de soja pode ter de 38 a 39% de PB, bom alimento protéico, com altos níveis de proteína de boa qualidade, energia e palatabilidade (PERES, 2002). O grão de girassol apresenta teor de proteína bruto entre 12 e 15%, porém deficiente em lisina. O caroço de algodão tem moderado nível de proteína 20 a 27%, alta gordura, fibra e energia, rico em fósforo e pobre em lisina, triptofano, vitamina D e provitamina-A, possui boa palatabilidade (FRAGA, 2017). Os problemas provocados pelo uso de farelo de algodão e caroço são atribuídos ao gossipol e aos ácidos graxos ciclopropenóides. Nos machos, o gossipol provoca alterações morfológicas da célula espermática, aumento do parêquima testicular, podendo ser reversível com a mudança da dieta fornecida. Segundo análises bromatológicas dos grãos, ressalta-se a quantidade macro e micronutrientes que possuem, em que aminoácidos essenciais como isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina, em quantidade considerável. Além dos aminoácidos podemos destacar os óleos, em que o grão de soja possui 21%, o grão de algodão 19,6% e o grão de girassol 54,8% assim destaca-se o girassol (DARCE, 2016). A disponibilidade de selênio e zinco, associados a qualidade seminal e aspectos reprodutivos, apresenta-se em 0,13mg/kg e 43,95mg/kg respectivamente para soja, 0,0mg/kg e 61,55mg/kg, no girassol, sendo que o algodão possui apenas Zn 12,86mg/kg (VALADARES FILHO et al., 2016).

Esse estudo teve como objetivo comparar a qualidade de sêmen de bovinos alimentados com diferentes fontes proteicas oriundas de grãos oleaginosos.

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Material e Métodos

Utilizou-se 24 bovinos Nelore que iniciaram o experimento aos 22 meses, com peso médio de 311 kg, mantidos em confinamento, no município de Terenos-Ms, Fazenda Escola, FAMEZ/UFMS. Os animais foram agrupados aleatoriamente, em quatro tratamentos: Controle – recebeu uma dieta composta por 41,08% de milho e 17,42% de farelo de soja, com 15% de PB (proteína bruta), 74,59% de NDT (energia total disponível) e 2,47% de EE (estrato etéreo); Algodão- composto de 25,91% de milho, 7,35% de farelo de soja e 25,23 de caroço de algodão, também com 15% de PB, 73,6% de NDT e 7% de EE. Soja- composto de 33,92 % de milho, 24,22 de soja grão tostado e 0,36% de óleo de soja industrializado, fornecendo 15% de PB, 77,09 de NDT e 7% de EE. Girassol – composto de 18,07% de milho, 13,55 de farelo de soja e 26,88% de grão de girassol triturado, também com 15% de PB, 72,97 de NDT e com 7% de EE. Todos os tratamentos receberam ainda 60% da matéria natural fornecida para os animais, o volumoso utilizado foi a silagem de milho e água e sal mineral ad libitum. Os animais permaneceram nos tratamentos por 107 dias. O exame andrológico foi realizado ao final do experimento, adotando-se a metodologia sugerida por CBRA (2013). O ejaculado foi analisado quanto ao volume, motilidade progressiva, vigor estimados sob microscopia óptica de campo claro, sob aumento de X 200, utilizando lâmina coberta por lamínula, previamente aquecida e mantida a 37°C. Após as análises de campo, preparou-se amostras para concentração e morfologia espermática. Três animais de cada tratamento tiveram o ejaculado diluído em BOTUBOV®, na proporção 1:1 e acondicionado a 5°C nas caixas de transporte comerciais BOTUFLEX®. Os animais foram escolhidos aleatoriamente de acordo com a ordem de entrada no tronco de contenção: 1, 3 e 5. Após 8 horas de resfriamento, avaliou-se a cinética espermática por análise computadorizada utilizando-se o software SCA® (Sperm Class Analyzer), registrando-se: motilidade total (%; MOT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$; VCL), velocidade linear ($\mu\text{m/s}$; VSL), velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$; VAP), índice de linearidade (%; LIN) e índice de retilinearidade (%; STR). A integridade de membrana plasmática foi avaliada utilizando o diacetato de 6-carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP; corante fluorescente de afinidade pelo DNA), de acordo com Harrison e Vickers (1990). Realizou-se também o Teste hiposmótico como sugerido por CBRA (2013). Análise estatística - realizou-se análise de variância considerando efeito de tratamento sobre todas as variáveis, variáveis expressas em porcentagem foram transformadas em arco seno de $x/100$. As médias foram comparadas por teste de t de student, considerando significativo o valor de P em nível de 5%.

Resultados e Discussão

Os animais apresentaram peso médio final de 470 kg e ganho médio diário de peso de 1,470kg. Somente Peso apresentou variação significativa em função dos tratamentos. A soja proporcionou um peso de $507,8 \pm 16,08$, seguido do tratamento padrão com grãos mistos, algodão e girassol ($P < 0,05$), Tabela 1. Parâmetros como motilidade subjetiva, vigor, turbilhonamento, concentração e morfologia espermática, motilidade progressiva analisada por sistema computadorizado, assim como as variáveis de velocidade, motilidade e linearidade, incluindo a análise de qualidade da membrana espermática não apresentaram variação significativa em função das fontes de proteína adotadas em cada tratamento ($P > 0,05$).

Tabela 1. Peso vivo e variáveis seminais dos touros Nelore de acordo com a fonte de proteína oferecida para touros Nelore em confinamento. PE=perímetro escrotal; MOT= motilidade subjetiva; ConcTT = concentração total do ejaculado; MP= motilidade progressiva; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade linear; VAP= velocidade de trajeto; LIN=índice de linearidade e STR=índice de retilinearidade. Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa em nível de 5% pelo Teste de t de student.

Variáveis	Controle	Soja	Girassol	Algodão
Peso Vivo (KG)	499,50 \pm 37,5 ^{b,c}	507,80 \pm 16,08 ^a	456,33 \pm 33,29 ^d	497,33 \pm 22,67 ^c
PE (cm)	35,00 \pm 2,53	32,30 \pm 1,20	32,67 \pm 1,17	32,75 \pm 2,09
Volume (mL)	8,41 \pm 3,08	6,1 \pm 3,48	7,7 \pm 3,81	5,25 \pm 1,75
MOT (%)	51,70 \pm 14,71	42,00 \pm 19,23	42 \pm 21,67	40 \pm 25,95
Vigor (0-5)	2,50 \pm 0,83	2,20 \pm 1,30	2,4 \pm 0,89	2 \pm 1,75
Def Maiores (%)	7,80 \pm 5,07	14,20 \pm 12,55	6,4 \pm 6,54	7 \pm 5,00
Def Menores (%)	1,50 \pm 1,51	1,20 \pm 1,64	0,8 \pm 1,09	0,8 \pm 0,44
Def Totais (%)	20,33 \pm 21,59	22,40 \pm 11,78	10,70 \pm 7,98	11,20 \pm 7,89
ConcTT (sptz x10 ⁶ /ejac)	848,3 \pm 727,41	241,6 \pm 124,62	583,0 \pm 418,00	385,2 \pm 167,40
HOS (células integras, %)	49,00 \pm 9,85	53,67 \pm 9,45	49,57 \pm 9,07	57,00 \pm 13,00
Variáveis obtidas sob análise computadorizada				
MP (%)	85,7 \pm 8,41	48,3 \pm 34,48	50,4 \pm 39,40	62,8 \pm 25,95

VCL(µm/s)	104,0 ± 14,20	58,0 ± 38,46	73,9 ± 51,85	65,0 ± 33,24
VSL(µm/s)	60,0 ± 21,50	29,4 ± 18,88	46,8 ± 30,35	39,9 ± 24,66
VAP(µm/s)	80,5 ± 22,77	41,5 ± 26,71	58,5 ± 40,31	52,1 ± 28,25
LIN (%)	61,0 ± 15,69	51,1 ± 1,32	63,7 ± 10,88	59,3 ± 6,12
STR (%)	78,7 ± 5,30	71,1 ± 1,38	80,4 ± 8,99	74,8 ± 6,42

Fonte: Elaborado pelos autores.

Levando em consideração os resultados obtidos podemos afirmar que, embora o percentual de proteína nos tratamentos não seja o ideal, não causou efeitos danosos quando analisados os ejaculados, defeitos maiores e menores e concentração espermática. Resultados estes semelhantes ao que Castro (2002) obteve em que touros alimentados com dietas com 73% de NDT acima de 14% de PB, apresentaram um quadro degenerativo testicular. Colocando em discussão o ponto de degeneração testicular, os animais do presente estudo, mediante o exame andrológico não mostraram desvios na motilidade e patospermia característicos de degeneração testicular ainda que leve, porém apenas o histopatológico poderia afirmar categoricamente.

Conclusões

As fontes proteicas testadas neste experimento não afetaram a qualidade seminal de touros Nelore jovens. Dietas com 15% PB e NDT entre 72 e 77 %, podem ser usadas com segurança, permitindo que a escolha seja relacionada pelo custo.

Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento a pesquisa CNPq e Fundect.

Referências

- CASTRO, E. de L. C. **Efeito da suplementação protéica e energética sobre as características seminais de touros zebuínos (*Bos taurus indicus*)**. 2002. 56 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.
- DARCE, M. R. **Grãos e óleos vegetais: matérias-primas**. 2016. Disponível em: <<http://docplayer.com.br/27154298-Graos-e-oleos-vegetais-materias-primas-prof-marisa-a-b-regitano-d-arce.html>>. Acesso em: 15 maio 2017.
- FRAGA, A. C. **Semente de algodão: fonte de riqueza industrial**. 2017. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/cba6/palestras/1504.pdf>>. Acesso em: 16 maio 2017.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.
- PERES, J. R. **Fornecimento de soja grão para vacas em lactação**. 2002. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/RADAR-TECNICO/NUTRICA0/FORNECIMENTO-DE-SOJA-GRAO-PARA-VACAS-EM-LACTACAO-15913N.ASPX>>. Acesso em: 15 maio 2017.
- SKINNER, J. D. Fertility in pedigree bulls. In: GILMORE, D.; COOK, B. **Environmental factors in mammalian reproduction**. London: MacMillian Pub., 1981, p. 160-168.
- VALADARES FILHO, S. C., COSTA E SILVA, L. F., LOPES, S. A.; PRADOS, L. F.; CHIZZOTTI, M. L.; MACHADO, P. A. S.; BISSARO, L. Z.; FURTADO, T. **BR-CORTE 3.0**. Cálculo de exigências nutricionais, formulação de dietas e predição de desempenho de zebuínos puros e cruzados. 2016. Disponível em: <www.brcorte.com.br>. Acesso em: 15 maio 2017.

Dimetilacetamida e trealose para criopreservação de sêmen de ovinos

Rodrigo Freitas Bittencourt^{1*}, Carmo Emanuel Almeida Biscarde¹, Gabriel Felipe Oliveira de Menezes¹, Elisiane Sateles dos Santos¹, Mariana Alves de Andrade Silva¹, Luiz Di Paolo Maggitti Junior¹, Adrielle da Silva Lima¹, Marcus Vinicius Galvão Loiola¹, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho¹

Resumo: Foram criopreservadas vinte amostras de sêmen de carneiros com o objetivo de verificar o efeito da dimetilacetamida (DMA, 3% e 6%) em um extensor hiperosmótico com trealose (TRE, 100mOsmol) na viabilidade pós-descongelamento espermática. Em seguida, foram formados cinco grupos experimentais: GLY6% (controle com glicerol); DMA3%; DMA3% + TRE; DMA6%; DMA6% + TRE. Após o descongelamento, os parâmetros de esperma cinético foram analisados por sistema de análise de computador. A avaliação da viabilidade do esperma foi realizada utilizando a coloração dos parâmetros de esperma múltiplo com iodeto de propídio (PMI, integridade da membrana plasmática), JC-1 (MMP, potencial de membrana mitocondrial) e FITC-PSA (ACI, integridade acrosomal). Por fim, cento e setenta ovelhas foram inseminadas em horário fixo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS versão 5.0 (1996). O grupo de controle com glicerol foi o melhor protocolo para manter a integridade do esperma. As taxas de concepção não apresentaram diferença ($P > 0,05$) entre os grupos.

Palavras-chave: Ovino. Amida. Espermatozóide.

Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation

Abstract: Twenty semen samples of rams were cryopreserved with the objective of verifying the effect of the dimethylacetamide (DMA, 3% and 6%) in a hyperosmotic extender with trehalose (TRE, 100mOsmol) on the post-thaw sperm viability. Then, they were formed five experimental groups: GLY6% (control with glycerol); DMA3%; DMA3%+TRE; DMA6%; DMA6%+TRE. After the thawing the kinetic sperm parameters were analyzed by computer analyses system. The sperm viability evaluation was performed by using the multiple sperm parameter staining with propidium iodide (PMI, plasmatic membrane integrity), JC-1 (MMP, mitochondrial membrane potential) and FITC-PSA (ACI, acrosomal integrity). Finally, one hundred and seventy ewes were inseminated at fixed time. All the statistical analyses were performed using the SAS software version 5.0 (1996). The control group with glycerol was the best protocol for maintaining the sperm integrity. The conception rates did not present difference ($P > 0.05$) among the groups.

Keywords: Ovine. Amide. Sperm.

Introdução

Para a espécie ovina, dados sobre o uso de amidas como crioprotetores seminais são escassos. Moustacas et al. (2011) em trabalho com dimetilformamida e Silva et al. (2012) usando a acetamida, observaram importante efeito deletério sobre a motilidade espermática. Jerez et al. (2016) também observaram, duas horas após a descongelação, efeito negativo ($P < 0,001$) sobre os percentuais de motilidade e integridade acrossomal com diluidores contendo dimetilformamida.

Achados diferentes foram relatados por Graças et al. (2013), que avaliando a metilformamida em diferentes concentrações e o glicerol, obtiveram percentuais semelhantes de motilidade pós-descongelação, sugerindo que as amidas podem representar uma importante alternativa para a preservação espermática também da espécie ovina, embora estudos ainda sejam necessários para analisar a fertilidade *in vivo*.

Açúcares como a trealose também foram usadas em diluidores para criopreservação de sêmen ovino com bons resultados (AISEN et al., 2005; JAFAROGHLI et al., 2011), justificados pela sua atividade crioprotetora sobre a membrana plasmática, que tem a capacidade de compor pontes de hidrogênio com as cabeças polares dos fosfolipídios de membrana, substituindo as moléculas de água durante o processo de desidratação, o que inibe a formação de cristais de gelo intracelular durante a congelação (BAKAS; DISALVO, 1991). Nem o uso da dimetilacetamida como crioprotetor da célula espermática ovina, nem a sua associação com a trealose foi reportado na literatura. Assim, este trabalho objetivou testar a capacidade crioprotetora da dimetilacetamida, em duas

¹ Universidade Federal da Bahia, 40170-115, Salvador, Bahia.
*fbvet1@gmail.com

concentrações, para espermatozoides ovinos, e a sua interação com a trealose. Outro objetivo foi avaliar pela primeira vez a fertilidade do sêmen ovino criopreservado com dimetilacetamida.

Material e Métodos

O diluidor Tris-gema de ovo (TRIS) foi a solução base usada para os cinco grupos experimentais: Grupo 1: TRIS com 6% glicerol (controle, GLI6%), Grupo 2: TRIS com 3% dimetilacetamida (DMA3%), Grupo 3: TRIS com 6% DMA (DMA6%), Grupo 4: TRIS com 3% DMA adicionado de 100mOsmol/L de trealose (DMA3%+TRE), Grupo 5: TRIS com 6% DMA com 100mOsmol/L de TRE (DMA6%+TRE).

Para este estudo foram colhidas com vagina artificial 18 ejaculados de nove reprodutores ovinos da raça Santa Inês. Após as avaliações iniciais e concentração espermática, o total de 1mL, de cada um dos diluidores experimentais, foi acrescentado lentamente a tubos contendo cada um 320×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva. Dessa forma, foram compostas doses inseminantes com 80×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva/0,25 mL para cada grupo experimental. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao resfriamento a 5°C (0,47°C/min), tempo de equilíbrio (total de 2h), e então congeladas em vapor de nitrogênio líquido.

A descongelação foi feita em banho-maria, a 37°C por 50 segundo, 90 dias após a congelação das amostras. Uma alíquota de 120 µL de meio X-CELL (IMV, L'Aigle, France), previamente aquecida a 37°C, foi adicionado lentamente a 5 µL de sêmen pós-descongelação (2×10^6 espermatozoa) dos diferentes grupos experimentais (concentração final de 16.0×10^6 espermatozoides/mL) e mantidos a esta temperatura por cinco minutos. Então, dez microlitros desta mistura foram transferidas para a câmara de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) e a cinética espermática avaliada através no analisador computadorizado IVOS 12 (Hamilton Thorn Biosciences, Beverly, MA, USA), com a contagem mínima de quatro campos diferentes e mínimo de 300 células. As características avaliadas foram: as percentagens de espermatozoides com motilidade total (MTH, %), motilidade progressiva (MPH, %) e de espermatozoides rápidos (RAP, %), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), linearidade (LIN, %) e retilinearidade (STR, %).

A análise da viabilidade espermática foi realizada através da coloração supravital (SV) com o corante eosina e através da microscopia de fluorescência com associação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio - IP (IMP, integridade de membrana plasmática), iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1 (PMM, potencial de membrana mitocondrial) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA (IAC, integridade da membrana acrossomal) de acordo com Celeghini et al. (2007), com modificações (BITTENCOURT et al., 2014).

Para avaliação da fertilidade do sêmen congelado com dimetilacetamida, 80 ovelhas Santa Inês foram submetidas à sincronização do estro com implantes vaginais de progesterona (Progespon, Syntex SA, Luis Guillon, BA, AR) por 12 dias. As fêmeas receberam 400 UI de eCG (Novormon, Syntex SA, Luis Guillon, BA, AR) no momento da retirada do implante e a inseminação artificial por laparoscopia ocorreu 55-60 hours após. Quarenta e duas ovelhas foram inseminadas com o semen congelado no Grupo 1 (GLI6%) e 42 no Grupo 2 (DMA 3%). As ovelhas foram submetidas ao diagnóstico de gestação por ultrassonografia, 45 dias após a inseminação artificial.

Para a análise estatística das características espermáticas foi usado o pacote Statistical Analysis System (SAS 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) aplicando o procedimento MEANS para análise descritiva, os dados foram checados quanto a normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e o procedimento GLM com o teste Student-Newman-Keuls (SNK) usado para comparação dos parâmetros espermáticos nos diferentes grupos, com nível de significância de 5%. A taxa de prenhez foi comparada entre os grupos, através do teste qui-quadrado do SAS.

Resultados e Discussão

A dimetilacetamida na concentração de 6% demonstrou significativo efeito negativo sobre os parâmetros de viabilidade espermática pós-descongelação, quando comparada à concentração de 3%. A adição de trealose ao meio de congelamento deprimiu os parâmetros de cinética espermática, embora tenha produzido em alguns diluidores, efeitos positivos sobre a integridade plasmática e acrossomal, reforçando a hipótese de que a influência negativa na cinética espermática seja restrita ao fato de que o meio hiperosmótico, devido a sua maior densidade, promova uma maior resistência ao deslocamento celular. Através do qui-quadrado foi possível observar que as taxas de concepção das fêmeas foram similares ($P > 0,05$), independente do crioprotetor utilizado, com 27,3% e 35,7% para GLI6% e DMA3%, respectivamente.

Os resultados obtidos com o sêmen pós-descongelamento nos diferentes diluidores experimentais estão representados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros da cinética espermática pós-descongelamento e frequência de espermatozoides com membrana plasmática (IMB and SV) e acrossomal (IAC) íntegras e com alto potencial de membrana mitocondrial (PMM), nos diferentes diluidores estudados. Motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP). Valores acompanhados de diferentes letras na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ($P < 0,05$).

Parâmetro	Tratamento				
	GLI6%	DMA3%	DMA6%	DMA3%+TRE	DMA6%+TRE
MT (%)	75,2 a	60,6 b	32,2 c	56,7 b	40,0 c
MP (%)	55,7 a	41,3 b	19,1 d	33,0 c	20,5 d
IMP (%)	29,0 a	18,2 bc	08,3 d	25,2 ab	09,8 cd
IAC (%)	76,6 a	69,2 a	45,0 c	72,2 a	55,2 bc
PMM (%)	51,2	16,6	31,0	48,5	40,4

Fonte: Elaborado pelos autores.

A dimetilacetamida na concentração de 6% demonstrou significativo efeito negativo sobre os parâmetros de viabilidade espermática pós-descongelamento, quando comparada à concentração de 3%. A adição de trealose ao meio de congelamento deprimiu os parâmetros de cinética espermática, embora tenha produzido em alguns diluidores, efeitos positivos sobre a integridade plasmática e acrossomal, reforçando a hipótese de que a influência negativa na cinética espermática seja restrita ao fato de que o meio hiperosmótico, devido a sua maior densidade, promova uma maior resistência ao deslocamento celular. Através do qui-quadrado foi possível observar que as taxas de concepção das fêmeas foram similares ($P > 0,05$), independente do crioprotetor utilizado, com 27,3% e 35,7% para GLI6% e DMA3%, respectivamente.

Conclusões

No presente estudo, a dimetilacetamida na concentração de 6% afetou negativamente a cinética espermática e o diluidor isosmótico, com glicerol a 6%, foi o mais efetivo para a manutenção dos parâmetros espermáticos, quando comparado com os demais contendo a dimetilacetamida como crioprotetor.

Referências

- AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v. 50, n. 3, p. 239-249, 2005.
- BAKAS, L. S.; DISALVO, E. A. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. **Cryobiology**, v. 28, n. 4, p. 347-353, 1991.
- BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, M.; VASCONCELOS, M.F.; BISCARDE, C.E.A.; BICUDO, S.D. Trehalose and a calcium chelator for ram semen cryopreservation. **Archives of Veterinary Science**, v.19, n.2, p.69-77, 2014
- CELEGHINI, E.C.C., ARRUDA, R.P., ANDRADE, A.F. et al. 2007. Practical techniques for simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479-488, 2007.
- GRAÇAS, C.P.; LIM, A.I.P.G; FIDELIS, A.A.G.; CARDOSO, J.R.C.; BLUME, H.; MONDADORI. Metilformamida na criopreservação de semen ovino. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4, p.481-87, 2013
- JAFAROGHLI, M; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; ZAMIRI, M. J. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 96, n. 1, p. 58-63, 2011.
- JEREZ, R; GONZALEZ, N.; OLACIREGUI, M.; LUNO, V.; BLAS, I. de; GIL, L. Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 134, p. 34-38, 2016.

MOUSTACAS, V. S.; ZAFFALON, F. G.; LAGARES, M. A.; LOAIZA-ECHEVERRI, A. M.; VARAGO, F. C.; NEVES, M. M.; HENEINE, L. G. D.; ARRUDA, R. P.; HENRY, M. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 75, n. 2, p. 300-307, 2011.

SILVA, E. C. B.; CAJUEIRO, J. F. P.; SILVA, S. V.; VIDAL, A. H.; SOARES, P. C.; GUERRA, M. M. P. In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. **Animal Reproduction Science**, v. 132, n. 3, p. 155-158, 2012.

Efeito da carnosina na criotolerância de espermatozoides de baixa congelabilidade provenientes de garanhões

Giulia Kiyomi Vechiato Kawai^{1}, João Diego de Agostini Losano¹, Carolina Camargo Rocha¹, Andressa Dalmazzo¹, Bárbara do Carmo Simões da Silva¹, Keyvan Hunger Malek Zadeh², Maria Augusta Alonso¹, Camilla Motta Mendes¹, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção¹, Marcilio Nichi¹*

Resumo: Observamos que os espermatozoides do garanhão, na ausência de plasma seminal (PS), são particularmente suscetíveis ao malondialdeído (MDA). No entanto, este evento não ocorreu na presença de PS. Uma possível substância envolvida neste mecanismo é o dipeptídeo carnosina. Esta substância, observada no PS dos cavalos, pode atuar como eliminador de ROS e MDA. No entanto, a criopreservação de espermatozoides em cavalos requer a remoção quase total de PS e, conseqüentemente, de carnosina. Assim, o objetivo era aumentar a criotolerância do espermatozoide equino após a criopreservação, adicionando carnosina ao diluidor. As amostras foram tratadas com carnosina adicionada ao diluidor (1, 50 e 100mM) e depois criopreservadas. As amostras tratadas com 50 mM apresentaram melhora da motilidade total e porcentagem de células rápidas. No entanto, todas as concentrações de carnosina diminuíram a atividade mitocondrial. Estes resultados podem ser explicados devido à afinidade da carnosina em reagir com açúcares, o que pode influenciar negativamente a atividade mitocondrial, diminuindo a produção de piruvato.

Palavras-chave: Carnosina. Malondialdeído. Garanhão.

Effect of carnosine on cryotolerance of low freezing spermatozoa from stallions

Abstract: We have observed that stallion spermatozoa, in absence of seminal plasma (SP) is particularly susceptible to malondialdehyde (MDA). However, this event did not occur in presence of SP. A possible substance involved in this mechanism is the dipeptide carnosine. This substance, observed in horses' SP, can act as scavenger of ROS and MDA. However, sperm cryopreservation in horses requires the almost total removal of SP, and consequently of carnosine. Thus, the objective was to increase the cryotolerance of equine sperm after cryopreservation by adding carnosine to extender. Samples were treated with carnosine added to extender (1, 50 and 100mM) and then cryopreserved. Samples treated with 50mM showed an improvement of total motility and percentage of rapid cells. However, all concentrations of carnosine decreased mitochondrial activity. These results can be due to the affinity of carnosine to react with sugars, which can negatively influence mitochondrial activity by decreasing pyruvate production.

Keywords: Carnosine. Malondialdehyde. Stallion.

Introdução

A refrigeração e criopreservação seminal apresentam vantagens no comércio de sêmen equino, na seleção de linhagens e desempenhos desejados. No entanto, devido às baixas taxas de concepção é necessário criar uma estratégia para melhorar a qualidade seminal (ALVARENGA et al., 2014). A criopreservação seminal diminui a viabilidade celular e a capacidade de fecundação (THOMSON et al., 2009), o que pode estar relacionado ao estresse oxidativo (EO), devido a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs). A retirada quase total do plasma seminal, procedimento realizado para concentrar os espermatozoides durante a criopreservação, reduz ainda mais a capacidade antioxidante, e conseqüentemente, aumenta a suscetibilidade dos espermatozoides ao EO (FRANCO et al., 2013). Subprodutos da peroxidação lipídica podem ser tão ou mais deletérios que as EROs. Em estudo anterior, observamos que a remoção do plasma seminal aumenta a suscetibilidade do espermatozoide equino ao MDA, importante subproduto da oxidação de lipídeos. Isto pode indicar que alguma substância presente no plasma

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 05508-270, São Paulo, São Paulo.

² Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, Minas Gerais.

* gkiyomi@usp.br

seminal possui o papel de inativar os produtos da peroxidação lipídica (KAWAI et al., 2017). Dentre os componentes do plasma, a carnosina pode ser uma das responsáveis pela proteção contra o acúmulo de MDA e seus efeitos deletérios (HIPKISS et al., 1997). Ademais, a carnosina protege peptídeos e proteínas contra modificações induzidas por cetonas e aldeídos prejudiciais, incluindo o MDA (HIPKISS et al., 1997). Neste contexto, este dipeptídeo poderia ser aplicado na terapia espermática durante o processo de criopreservação, o qual promove desequilíbrio oxidativo e formação de subprodutos citotóxicos (FRANCO et al., 2013). Assim, objetivamos avaliar o possível efeito protetor da carnosina na criopreservação espermática utilizando ejaculados equinos de baixa congelabilidade.

Material e Métodos

Foram utilizados 7 garanhões, entre 3 e 8 anos. Foram realizadas duas colheitas com intervalo de sete dias e os ejaculados foram centrifugados a 400xg/10 minutos para remoção do plasma seminal. Os pellets foram suspensos a 200×10^6 /mL com Botucurio® e carnosina (1, 50 e 100mM). As amostras foram criopreservadas e descongeladas a 37°C/30 segundos no momento da avaliação. Após a descongelação, amostras com motilidade total abaixo de 40% foram avaliadas pelo Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA-Hamilton Thorne IVOS 12.3, USA) e atividade mitocondrial (3'3 diaminobenzidina).

Os dados foram analisados pelo SAS (Statistical Analysis System–Institute versão 9.4) e as médias foram comparadas pelo teste t de Student. As variáveis foram expressas em média±SEM dos dados originais e o nível de significância considerado foi de 5% ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Amostras de baixa congelabilidade tratadas com 50 mM de carnosina apresentaram maior motilidade total (Figura 1A) e mais células rápidas (Figura 1B) quando comparadas ao grupo controle. Apesar deste aparente efeito positivo da carnosina na cinética espermática, muitos estudos demonstraram que a fertilidade não pode ser determinada apenas pela concentração limiar de espermatozoides móveis, sendo mais dependente da competência celular funcional (HOLLIDAY; MACFARLAND, 1996).

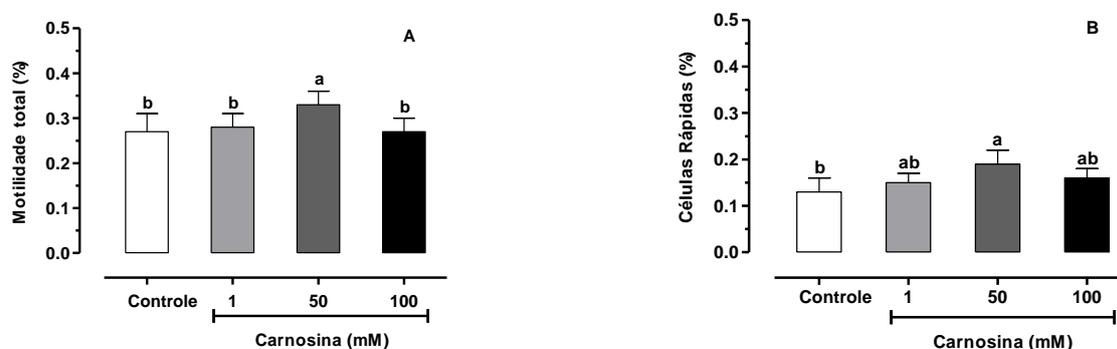


Figura 1. Efeito das concentrações de carnosina na motilidade total (1A) e células rápidas (1B) em espermatozoides equinos de baixa congelabilidade submetidos à criopreservação. Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos ($P < 0,05$). Fonte: Elaborado pelos autores.

Neste sentido, alguns espermatozoides apresentam motilidade aceitável com alterações que podem comprometer a capacidade de fertilização (COLENBRANDER et al., 2003). Neste experimento, observamos diminuição do número de células com atividade mitocondrial alta (Figura 2A) nas concentrações de carnosina. Além disso, amostras tratadas com 100mM apresentaram maior número de células com atividade mitocondrial média (Figura 2B) e baixa (Figura 2C), comparadas ao grupo controle. Um motivo para este efeito seria a afinidade da carnosina em reagir com açúcares, o que poderia influenciar negativamente a atividade mitocondrial ao diminuir a produção de piruvato pela via glicolítica. Uma alternativa para contornar tal efeito seria a associação da carnosina com uma suplementação celular de piruvato.

Desta forma, o efeito deletério da carnosina seria compensado pelo estímulo exógeno de piruvato, mantendo a produção energética celular (HOLLIDAY; MACFARLAND, 1996).

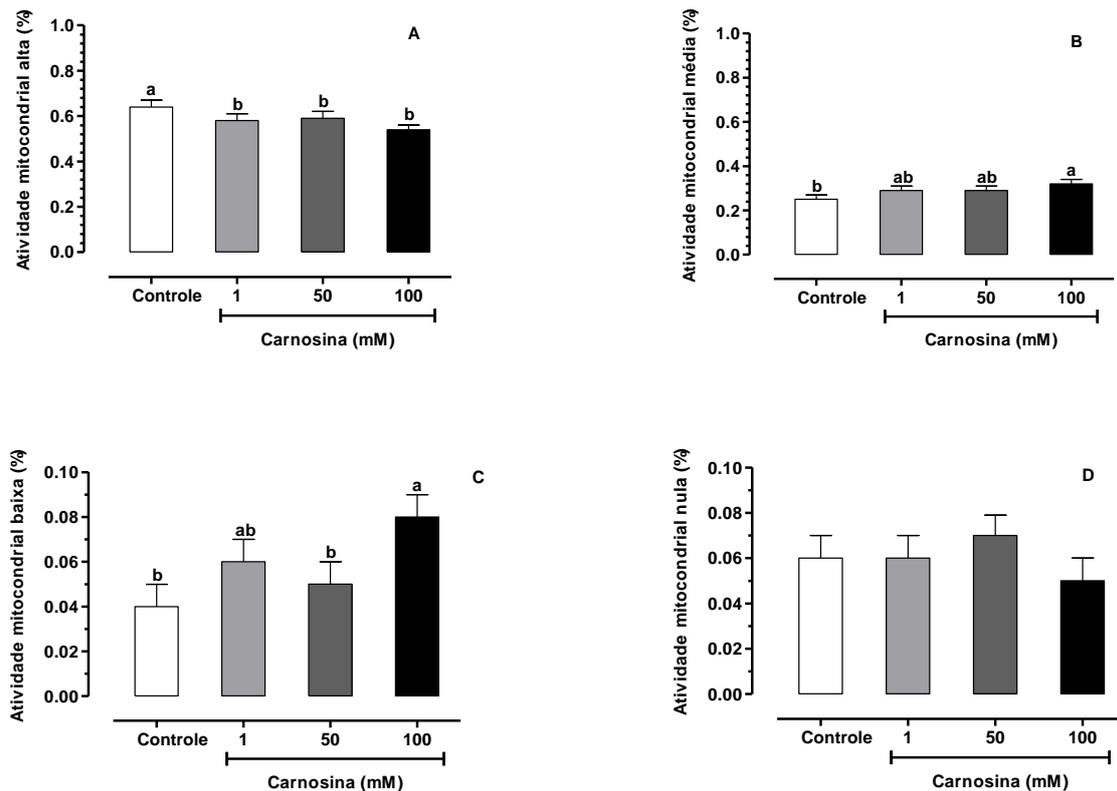


Figura 2 - Efeito das concentrações de carnosina na atividade mitocondrial alta (2A), média (2B), baixa (2C) e nula (2D) em espermatozoides equinos de baixa congelabilidade submetidos a criopreservação. Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos ($P < 0,05$). Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

A terapia espermática com carnosina (50mM) durante a criopreservação de amostras seminais de baixa congelabilidade apresentou efeitos positivos na cinética espermática. Por outro lado, a carnosina pode ter gerado um possível comprometimento mitocondrial devido a diminuição da produção de piruvato pela via glicolítica. Portanto, apesar de poucos estudos a respeito do possível efeito da carnosina na função espermática, a terapia espermática com esta molécula durante o processo de criopreservação seminal equina necessita de mais pesquisas.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo número: 2016/03782-8) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ processo número: 460764/2014-4) ao suporte financeiro.

Referências

- ALVARENGA, M.; NETO, C. R.; PAPA, F. O. Estratégias para melhorar a qualidade e fertilidade do sêmen de reprodutores equinos. **Spermova**, v. 4, n. 2. p. 172-178, 2014.
- COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 305-311, 2003.
- FRANCO, J. S. V.; CHAVEIRO, A.; GOIS, A.; SILVA, F. M. da. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 10, p. 787-793, 2013.

HIPKISS, A. R.; PRESTON, J. E.; HIMSWOTH, D. T.; WORTHINGTON, V. C.; ABBOT, N. J. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. **Neuroscience Letters**, v. 238, n. 3, p. 135-138, 1997.

HOLLIDAY, R.; MCFARLAND, G. A. Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. **British Journal of Cancer**, v. 73, n. 8, p. 966-971, 1996.

KAWAI, G. K. V.; GURGEL, J. R. C.; LOSANO, J. D. de A.; DALMAZZO, A.; ROCHA, C. C.; TSUNODA, R. H.; GOES, P. A. de A.; RUI, B. R.; ANGRIMANI, D. de S. R.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; MENDES, C. M.; BARNABE, V. H.; NICHI, M. Susceptibility of stallion spermatozoa to different oxidative challenges: role of seminal plasma. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 55, p. 76-83, 2017.

THOMSON, L. K.; FLEMING, S. D.; AITKEN, R. J.; IULIIS, G. N.; ZIESCHANG, J. A.; CLARK, A. M. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2061-2070, 2009.

Efeito do ácido docosahexaenóico (DHA) e antioxidantes enzimáticos (SOD e GPx) na criopreservação dos espermatozoides epididimários de touros

João Diego de Agostini Losano¹, Daniel de Souza Ramos Angrimani¹, Bruno Rogério Rui¹, Luana de Cássia Bicudo¹, Andressa Dalmazzo¹, Bárbara do Carmo Simões da Silva¹, Camilla Mota Mendes¹, Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção¹, Valquiria Hyppólito Barnabe¹, Marcilio Nichi¹

Resumo: A suplementação com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) pode melhorar certas características dos espermatozoides, mas também torna estas células mais susceptíveis ao estresse oxidativo. Assim, a adição de antioxidantes que neutralizam o estresse oxidativo tornou-se uma opção. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da interação entre o ácido docosahexaenóico (DHA) e antioxidantes sobre a qualidade dos espermatozoides epididimários pós - descongelação. Para tanto, vinte epidídimos foram coletados em abatedouros e os espermatozoides foram criopreservados utilizando meio de congelamento suplementado com ácido docosahexaenóico (DHA), glutathione peroxidase (GPx) e/ou superóxido dismutase (SOD). Verificamos uma melhora numérica da motilidade no grupo que foi tratado apenas com DHA 5µM e um efeito concentração – dependente na susceptibilidade à peroxidação lipídica que foi associada à quantidade de DHA (1µM, 5µM e 10µM). Além disso, o tratamento com DHA (5µM) + SOD (20UI/mL) apresentou maior motilidade espermática. Assim, a associação entre DHA (5µM) e SOD (20UI/mL) parece ser uma opção para a melhora dos atributos espermáticos pós - descongelação.

Palavras-chave: Sêmen bovino. Epidídimo. Oxidação lipídica.

The addition of docosahexaenoic acid (DHA) and enzymatic antioxidants in extenders to epididymal sperm cryopreservation in bulls

Abstract: Polyunsaturated fatty acid (PUFA) supplementation may improve certain sperm characteristics, but it also makes sperm more susceptible to oxidative stress; thus, adding antioxidants that counteract oxidative stress has become an option. In this context, this study aimed to evaluate the effect of the interaction between docosahexaenoic acid (DHA) and antioxidants on the quality after the cryopreservation of epididymal bull sperm. Twenty epididymides were collected after slaughter, and epididymal sperm was cryopreserved with bovine extender supplemented with docosahexaenoic acid (DHA), glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD). We verified an improvement in motility in the group that was treated only with DHA 5µM and a concentration-dependent effect on susceptibility to lipid peroxidation that was associated with DHA concentration (1µM, 5µM and 10µM). Moreover, the treatment with DHA (5µM) and SOD (20 IU/mL) showed higher sperm motility. Thus, the association between DHA (5µM) and SOD (20 IU/mL) appears to be an option for increased epididymal sperm features in bulls.

Keywords: Bovine sperm. Epididymis. Lipid oxidation.

Introdução

Os espermatozoides epididimários têm sido amplamente utilizados nas biotecnologias reprodutivas em diversas espécies incluindo caninos, suínos, ovinos e bovinos. Esse material genético proveniente do epidídimo possui grande importância devido à possibilidade de conservar os espermatozoides de animais com alto valor zootécnico ou ameaçados de extinção, inclusive *post mortem*. No entanto, para esse propósito, mais estudos objetivando melhoras na criopreservação dos espermatozoides epididimários são necessários (NICHII et al., 2007). A membrana plasmática do espermatozoide possui grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), que desempenham um papel fundamental na fisiologia espermática e nos processos reprodutivos (ROOKE et al., 2001). O ácido

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 05508-270, São Paulo, São Paulo.

* jdalosano@usp.br

docosaenoico (DHA) é um PUFA essencial para a fluidez da membrana espermática e, portanto, a suplementação desse ácido graxo no meio de criopreservação poderia favorecer a cinética espermática e proteger as células durante a congelação. No entanto, uma maior quantidade de PUFAS pode aumentar a susceptibilidade espermática à peroxidação lipídica promovida pelas espécies reativas de oxigênio (EROS). Neste contexto, os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído, podem ser tão deletérios quanto as EROS (NICHI et al., 2007). Baseado nestas assertivas, a suplementação com PUFAS em associação à um tratamento antioxidante para prevenir os efeitos oxidativos deletérios desses ácidos graxos, pode ser uma alternativa para melhorar a viabilidade pós-descongelação dos espermatozoides provenientes de epidídimos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a adição do ácido docosahexaenóico (DHA) em associação à superóxido dismutase (SOD) e/ou glutatona peroxidase (GPx) na criopreservação dos espermatozoides epididimários de touros.

Material e Métodos

Foram utilizados vinte epidídimos/testículos de touros (2-5 anos) oriundos de abatedouros. Dez testículos selecionados randomicamente foram utilizados para cada experimento (N=10). Os espermatozoides foram colhidos por meio de pequenas incisões na cauda do epidídimo utilizando um bisturi. Posteriormente, as amostras espermáticas foram submetidas aos tratamentos descritos abaixo.

No experimento 1, cada amostra espermática (N=10) foi dividida em quatro alíquotas e distribuída nos seguintes tratamentos: meio de criopreservação Bovimix® (controle); Bovimix® + DHA1µM; Bovimix® + DHA 5µM e Bovimix® + DHA 10µM. Após as diluições, as amostras foram submetidas à criopreservação/descongelação e análises espermáticas. Posteriormente, a concentração de 5µM de DHA foi selecionada para ser utilizada no experimento 2, devido a esta concentração ter apresentado melhores resultados. Para este propósito, cada amostra seminal (N=10) foi dividida em quatro alíquotas e distribuída nos seguintes tratamentos: Bovimix® (controle); Bovimix® + DHA 5µM + GPx 5UI/mL; Bovimix® + DHA 5µM + SOD 20 UI/mL; e Bovimix® + DHA 5µM +GPx 5UI/mL + SOD 20 UI/mL. Após as devidas diluições, as amostras foram submetidas aos processos de criopreservação/descongelação e análises espermáticas.

Em ambos experimentos, após o descongelamento, as amostras foram analisadas quanto à motilidade (%), vigor (escala de 1 a 5), integridade das membranas plasmática e acrossomal (Eosina – Nigrosina e Fast-green / Rosa bengala, respectivamente), atividade mitocondrial (3'3 Diaminobenzidina; DAB I – alta, DABII – média, DABIII – baixa e DABIV – ausência de atividade mitocondrial), susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida (ensaio SCSA®) e susceptibilidade à peroxidação lipídica (ensaio TBARS).

Os dados foram analisados por meio do programa SAS for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000). O efeito dos tratamentos foi determinado utilizando análise de variância por meio de testes paramétricos (LSD) e não paramétricos (Wilcoxon). O nível de significância adotado foi de 5%. Os resultados foram expressados em média e erro padrão.

Resultados e Discussão

O uso de ácidos graxos poli-insaturados na composição dos meios de criopreservação parece ser interessante devido aos espermatozoides apresentarem uma grande quantidade de PUFAS na membrana plasmática, sendo essencial para sua fluidez e proporcionando assim a cinética espermática adequada (ROOKE et al., 2001). De fato, nossos resultados demonstraram maior motilidade (numericamente diferente) em amostras suplementadas com DHA 5µM (Figura 1A). No entanto, verificamos um efeito concentração – dependente na susceptibilidade das amostras à peroxidação lipídica (Figure 1B).

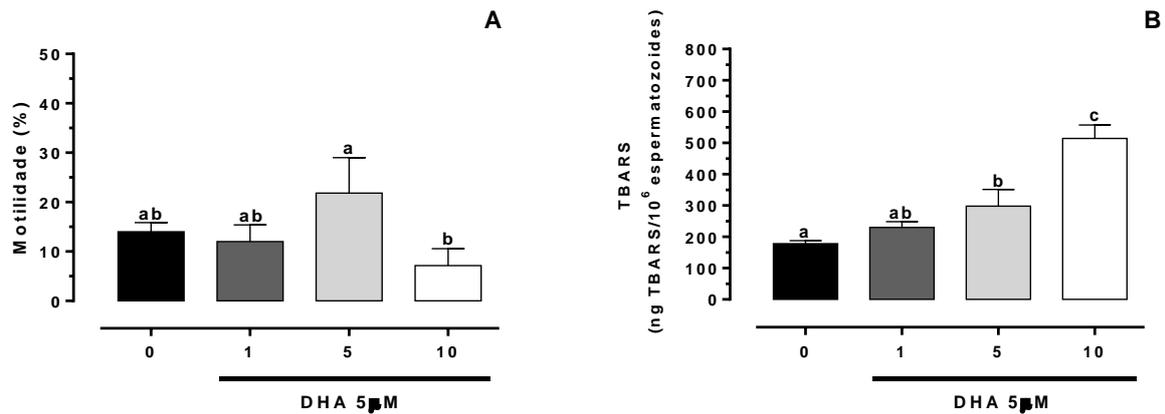


Figura 1. Efeito das concentrações crescentes de DHA (1, 5 e 10µM) nas variáveis resposta motilidade (A) e peroxidação lipídica (B) de espermatozoides epididimários bovinos criopreservados. Diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Portanto, para evitar esse efeito deletério, associamos antioxidantes enzimáticos (SOD e GPx) ao tratamento com DHA 5µM durante a criopreservação espermática em um segundo experimento. Nesta etapa, o grupo tratado com DHA 5µM + SOD 20UI/mL apresentou maior motilidade (Figura 2A). Além disso, não observamos diferenças nas taxas de peroxidação lipídica entre os grupos. Esse resultado nos sugere que os antioxidantes enzimáticos são capazes de prevenir o efeito deletério dos PUFAS durante a congelamento dos espermatozoides (Figura 2B). O mecanismo de ação da SOD (presente no plasma seminal) está extremamente relacionado à função espermática, resistência ao estresse oxidativo, integridade de DNA e fertilidade (KOBAYASHI et al., 1991). De fato, esse fenômeno foi observado em nossos resultados devido às estruturas espermáticas terem se mantido intactas nas amostras suplementadas com SOD. Em bovinos, a importância da superóxido dismutase foi demonstrada por Gurler et al. (2015). Sendo assim, acreditamos que ao suplementar os espermatozoides com SOD, mimetizamos o contato destas células com o plasma seminal preservando as estruturas espermáticas e melhorando a motilidade, inclusive com adição de DHA. Por outro lado, não observamos efeitos significativos da suplementação com GPx, isolada ou associada à SOD.

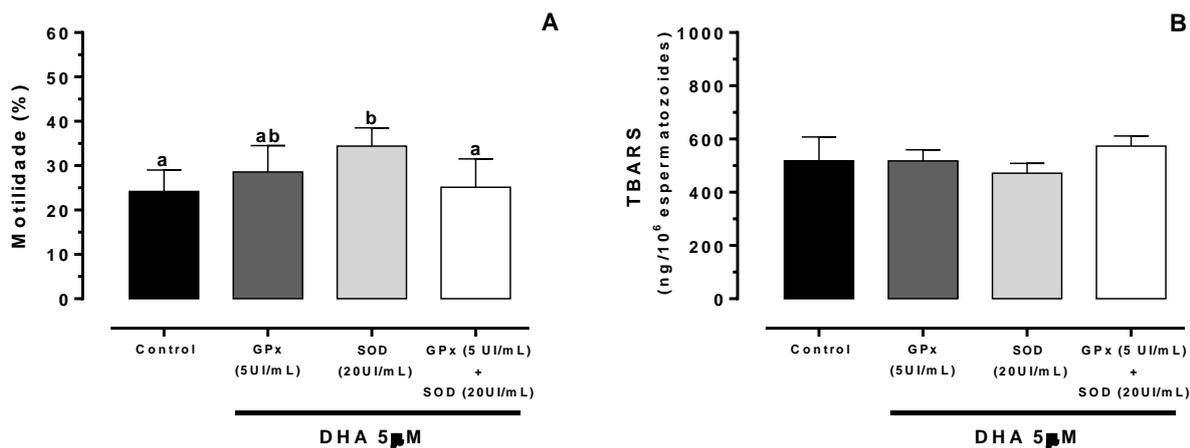


Figure 2. Efeito da adição de DHA (5µM) em associação aos antioxidantes GPx (5UI/mL) e/ou SOD (20UI/mL) na motilidade (A) e susceptibilidade à peroxidação lipídica (B) de espermatozoides epididimários bovinos submetidos à criopreservação. Diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Conclusões

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a adição de DHA em associação à SOD no meio de criopreservação parece ser uma alternativa para melhorar a qualidade dos espermatozoides epididimários pós – descongelamento. No entanto, estudos mais detalhados sobre o efeito destes tratamentos na função espermática e fertilidade devem ser conduzidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro. Projeto N° 460764/2014-4.

Referências

- GURLER, H.; CALISICI, O.; BOLLWEIN, H. Inter-and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 155, p. 99-105, 2015.
- KOBAYASHI, T.; MIYAZAKI, T.; NATORI, M.; NOZAWA, S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 6, n. 7, p. 987-991, 1991.
- NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G. F.; CORTADA, C. N. M.; BARNABE, V. H.; CLERCQ, J. B. P. de; BOLS, P. E. J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34°C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.
- ROOKE, J. A.; SHAO, C. C.; SPEAKE, B. K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. **Reproduction**, v. 121, n. 2, p. 315-322, 2001.

Efeitos da suplementação com fonte de ácidos graxos poliinsaturados na cinética espermática em sêmen fresco de machos da raça Nelore

Natália Marins Bastos^{1*}, Guilherme Fazan Rossi¹, Dayane Piscila Virsman¹, Naiara Nantes Rodrigues¹, Luana Lelis Souza², Anielly de Paula Freitas³, Mariana Furtado Zorzetto², Fabio Morato Monteiro², Gisele Zoccal Mingoti⁴, Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima¹

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de avaliar a influência do suplemento de ácidos graxos poliinsaturados na qualidade do sêmen. Utilizamos ejaculados de 12 touros Nelore divididos em 2 grupos de 6 animais, G1 suplementados com AGPs e G2 sem AGPs. A coleta de sêmen foi realizada com o auxílio de um eletroejaculador e as amostras foram submetidas à análise computadorizada (CASA). Os parâmetros foram: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade rápida (RAP; %), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos cruzados (BCF; Hz), linearidade (LIN; %), progressividade (STR; %). G2 apresentou melhores resultados do que G1 em relação MT ($92,50,5 \pm 1,82$ vs $85,50 \pm 1,82$), RAP ($84,00 \pm 2,68$ vs $90,66 \pm 2,68$) e BCF ($30,13 \pm 0,0010$ vs $28,35 \pm 0,0010$). A possível razão para este fato é a alta concentração de PUFAs dentro das frações lipídicas dos espermatozoides, tornando-os suscetíveis à peroxidação lipídica, prejudicando a estrutura celular e alterando negativamente a qualidade do sêmen, comprometendo a fluidez da membrana plasmática.

Palavras-chave: Ácidos graxos poliinsaturados. CASA. Nelore.

Effects of supplementation with polyunsaturated fatty acid source on spermatic kinetics in fresh semen of Nelore males

Abstract: The aim of the present study is to evaluate the influence of polyunsaturated fatty acid supplementation on semen quality. We used ejaculates of 12 Nelore bulls divided into 2 groups of 6 animals, G1 supplemented with AGPs and G2 without AGPs. The semen collection was performed with the aid of an electro-juicer and the samples were submitted to the computerized analysis (CASA). The parameters were: total motility (MT; %), progressive motility (MP; %), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m} / \text{s}$), straight velocity (VSL, $\mu\text{m} / \text{s}$), path velocity / S), lateral head displacement amplitude (ALH, μm), crossover frequency (BCF, Hz), linearity (LIN; %), progressivity (STR; %) and rapidity (RAP; %). G2 presented better results than G1 in relation MT ($92,50,5 \pm 1,82$ vs $85,50 \pm 1,82$), RAP ($84,00 \pm 2,68$ vs $90,66 \pm 2,68$) e BCF ($30,13 \pm 0,0010$ vs $28,35 \pm 0,0010$). The possible reason for this fact is the high concentration of PUFAs within the lipid fractions of the spermatozoa making them susceptible to lipid peroxidation, damaging the cellular structure and negatively altering the semen quality, compromising the fluidity of the plasma membrane.

Keywords: Polyunsaturated fatty acids. CASA. Nelore.

Introdução

A qualidade espermática tem grande importância no sucesso reprodutivo dos touros e é dependente de vários fatores, tais como: idade, estado nutricional, genética, clima e alimentação (MELLO et al., 2016). A nutrição se destaca por sua importância na qualidade do sêmen produzido, sendo o nível energético da dieta, um dos fatores mais estudados. Nos machos, o baixo consumo de energia está associado a queda da produção espermática, diminuição do desenvolvimento testicular, entre outros. Nos espermatozoides, a composição lipídica da membrana plasmática é

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo.

² Centro APTA Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, 14160-900, Sertãozinho, São Paulo.

³ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo.

⁴ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, 16050-680, Araçatuba, São Paulo.

* nataliamarinsbastos@yahoo.com.br

importante para sua função, pois cada espécie de lipídio atribui à membrana uma característica única (AMANN, 2010) sendo estes determinantes da motilidade, sensibilidade a processos de congelação, fatores relacionados a viabilidade podendo induzir a modificações na taxa de fertilidade (HAMMERSTEDT, 1993). Dentro do contexto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a influência da suplementação de ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) na qualidade do sêmen de touros Nelore.

Material e Métodos

Foram utilizadas amostras de sêmen de 12 touros da raça Nelore do rebanho Tradicional (NeT) do Instituto de Zootecnia idade média de 24 meses e peso médio de 521,4 kg \pm 11,4 kg. Os animais foram mantidos a pasto de *Brachiaria brizantha* cv Marandu com acesso a água e sal proteinado *ad libitum*. Os animais foram divididos em 2 grupos de 6 animais, sendo o grupo 1 (G1) suplementado com ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) e grupo 2 (G2) sem suplementação com AGPs. As dietas foram isoproteicas. A fonte de gordura utilizada foi Megalac-E® e os touros foram suplementados dos 12 até aos 24 meses de idade. A colheita de sêmen foi realizada com o auxílio de um eletroejaculador e o sêmen foi diluído no meio BotuBov®, contendo 7% de crioprotetor glicerol. As amostras foram submetidas à análise computadorizada (CASA – computer assisted sperm analysis) (HAMILTON THORNE RESEARCH, Ivos-10, EUA). Foram avaliados os parâmetros: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade rápida (RAP; %), velocidade curvilinear (VCL; μ m/s), velocidade em linha reta (VSL; μ m/s), velocidade de trajeto (VAP; μ m/s), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH; μ m), frequência de batimentos cruzados (BCF; Hz), linearidade (LIN; %), progressividade (STR; %).

Para a análise estatística foi realizado o teste de normalidade para todas as características utilizando o procedimento UNIVARIATE do SAS. Para as características MT, MP, RAP, VAP, VSL, VCL, ALH, STR e LIN, que seguiram distribuição normal, foi utilizado o procedimento GLM. Já para a característica BCF, foi utilizado o procedimento GENMOD, sendo a distribuição Gamma a que melhor se ajustou aos dados. Foi considerado o nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

No presente estudo foi observado diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos nas variáveis MT, RAP e BCF, entretanto as outras variáveis não diferiram entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Cinética espermática de machos Nelore suplementados ou não com AGPs. Motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), células rápidas (RAP; %), velocidade do trajeto (VAP; μ m/s), velocidade progressiva (VSL; μ m/s), velocidade curvilinear (VCL; μ m/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH; μ m), frequência de batimento (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %) e linearidade (LIN; %). Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas ($P < 0,05$).

Variáveis	G1	G2	ERRO PADRÃO	P
MT%	85,50 ^b	92,50 ^a	1,82	0,02
MP%	67,00	72,00	2,68	0,18
RAP%	84,00 ^b	90,66 ^a	1,97	0,04
VAP μ m/s	103,23	105,06	5,19	0,82
VSL μ m/s	83,78	84,93	4,07	0,84
VCL μ m/s	168,51	173,88	10,42	0,72
ALH μ m	6,52	7,06	0,36	0,34
BCF Hz	28,35 ^b	30,13 ^a	0,0010	<,0001
STR%	82,17	81,67	1,09	0,75
LIN%	53,00	51,50	1,23	0,41

Fonte: Elaborado pelos autores.

Os animais do G2 apresentaram maiores valores de MT (92,50,5 \pm 1,82 vs 85,50 \pm 1,82), RAP (84,00 \pm 2,68 vs 90,66 \pm 2,68) e BCF (30,13 \pm 0,0010 vs 28,35 \pm 0,0010) em relação o G1, evidenciando que o G2 obteve melhores valores nos parâmetros avaliados. A composição lipídica da membrana celular possui um importante papel na qualidade espermática (FONSECA, 2012). Kelso et al. (1997) observaram que a redução de AGPs no sêmen diminui a motilidade e conseqüentemente, o potencial dos espermatozoides bovinos. Entretanto, o excesso de AGPs na membrana do sêmen o torna vulnerável ao ataque das espécies reativas de oxigênio (EROs), promovendo a

peroxidação lipídica (VAN TRAN et al., 2017). Esse fator contribui para perdas na qualidade espermática, pois gera a rápida e irreversível perda de motilidade, alterando o metabolismo, a integridade da membrana plasmática (BROUWERS et al., 2003), a liberação de componentes intracelulares e deleções no DNA da célula. Por essa razão, há uma possível queda dos índices de MT, RAP e BCF, sendo que elevados valores dessa última variável, apresentam melhor migração e penetração no muco cervical, podendo ter correlação positiva com a taxa de prenhez (VERSTEGEN et al., 2002). Fonseca (2012) afirma que mesmo apresentando efeitos benéficos, a alta concentração de AGPs dentro das frações lipídicas dos espermatozoides os torna susceptíveis a peroxidação lipídica, danificando a estrutura celular. Possivelmente, no presente estudo, houve a peroxidação lipídica no G1 fazendo com que o G2 tenha maiores valores nos parâmetros da cinética espermática.

Conclusões

Os animais suplementados com AGPs apresentaram parâmetros de cinética espermática inferior aos animais não suplementados com AGPs.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Instituto de Zootecnia.

Referências

- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoa funcional. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). **Equine reproduction**. 2nd ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 2010. p. 1053-1084.
- BROUWERS, J. F. H. M.; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 11, p. 1382-1391, 2003.
- FONSECA, M. A. **Análise do perfil lipídico do semen bovino**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- HAMMERSTEDT, R. H. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 675-690, 1993.
- KELSO, K. A.; REDPATH, A.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, n. 1, p. 1-6, 1997.
- MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; MELLO, M. R. B. de; PALHANO, H. B. Influência do manejo na fisiologia reprodutiva do macho bovino. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 1, p. 57-63, 2016.
- VAN TRAN, L.; MALLA, B. A.; KUMAR, S.; TYAGI, A. K. Polyunsaturated fatty acids in male ruminant reproduction: a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, n. 5, p. 622, 2017.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

Embriões provenientes de touros de alta e baixa fertilidade *in vitro* não diferem na cinética do desenvolvimento das primeiras clivagens

Tamie Guibu de Almeida^{1*}, Letícia Signori de Castro¹, Adriano Felipe Perez Siqueira¹, Vivian S. C. Pinto¹, Thais R. S. Hamilton¹, Luana C. Bicudo¹, Camilla M. Mendes¹, Mayra Fernanda Alves², Andrea Cristina Basso², Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção¹

Resumo: A seleção de touros de alta fertilidade *in vitro* pode melhorar a produção *in vitro* de embriões. Entender o que torna os touros com diferenças de alta e baixa fertilidade é a chave para a seleção do touro. Os touros foram selecionados a partir da utilização de uma base de dados fornecida por um laboratório comercial e foram classificados com base na taxa de blastocisto/taxa de clivagem. Foram utilizados dez touros com alta (n = 5) e baixa fertilidade *in vitro* (n = 5) para a produção de embriões *in vitro*. A taxa de fertilização foi avaliada pela visualização dos pronúcleos, 24 horas após a inseminação (hpi). A cinética do embrião foi determinada em 24, 36, 48, 60, 72 hpi. A taxa de clivagem foi avaliada no terceiro dia (D3) de cultura *in vitro*, os blastocistos viáveis e as taxas de desenvolvimento embrionário foram avaliadas no sétimo dia (D7). Apesar da diferença nas taxas de desenvolvimento de blastocistos e embriões, entre touros de fertilidade alta e baixa, não houve diferença nas taxas de fertilização, clivagem e nos estágios embrionários nos períodos avaliados.

Palavras-chave: Bovino. Fertilização. Blastocisto.

Embryos from bulls of high and low *in vitro* fertility do not differ in the kinetics of the development of the first cleavages

Abstract: Selection of *in vitro* high fertility bulls can improve *in vitro* embryo production. Understanding what makes bulls with high and low fertility different is the key for bull selection. Bulls were selected in a retrospective database of a commercial laboratory and were ranked based on blastocyst/cleaved rate. Ten bulls with high (n=5) and low (n=5) *in vitro* fertility were used for *in vitro* embryo production. The fertilization rate was evaluated by visualizing the pronuclei, 24 hours post insemination (hpi). Embryo kinetics were determined at 24, 36, 48, 60, 72 hpi. Cleavage rate was assessed at day 3 (D3) of *in vitro* culture, viable blastocysts and embryo development rates were assessed at day 7 (D7). Despite the difference in blastocyst and embryo development rates, between high and low fertility bulls, there was no difference in fertilization and cleavage rates and embryo stages in any of the evaluated periods.

Keywords: Bovine. Fertilization. Blastocyst.

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia amplamente empregada para multiplicar a progênie de vacas e de touros com alto mérito genético. Nos últimos anos, essa tecnologia tem aumentado progressivamente no mundo, destacando-se na América do Sul. Em 2014, só o Brasil produziu 348.468 embriões bovinos correspondendo a aproximadamente 60% da produção mundial de embriões *in vitro* (PERRY, 2014). Mesmo que bem estabelecida, a eficiência do processo pode ser melhorada, sendo que aumentar a conversão de oócitos aspirados em embriões é um dos maiores desafios. Um dos fatores que pode contribuir para esse fim é a seleção de touros de alta fertilidade para PIVE, ou seja, touros que produzem altas taxas de blastocisto. Compreender o que diferencia a fertilidade *in vitro* dos touros é de extrema relevância para otimizar essa biotécnica. A avaliação da cinética de desenvolvimento pode ser uma ferramenta para identificar o momento de bloqueio embrionário que leva touros a terem maiores ou menores taxas de blastocisto. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar se há relação entre a fertilidade do touro e a cinética de desenvolvimento embrionário e, se houver, estabelecer em qual fase do desenvolvimento embrionário ocorre a divergência entre touros de alta e de baixa fertilidade *in vitro*.

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 05508-270, São Paulo, São Paulo.

² Genus plc, In Vitro Brasil, 13800-970, Mogi Mirim, São Paulo.

* tamie.almeida@usp.br

Material e Métodos

Para seleção dos animais de alta e baixa fertilidade, foi utilizado o banco de dados fornecido pela empresa In Vitro Brasil (IVB), entre os anos de 2012 a 2015. Foram selecionados animais com base nos seguintes critérios: touros com mais de 10 manipulações com mais de 50 oócitos/manipulação e uso de sêmen sexado de fêmea que foram submetidos ao gradiente de Percoll. Os 140 animais de diferentes raças que obedeciam a estes critérios foram ranqueados de acordo com a média das manipulações baseado na taxa de desenvolvimento embrionário (taxa de blastocisto/taxa de clivagem). A partir deste ranking, os animais extremo superior e inferior (5 touros para cada grupo), com sêmen disponível comercialmente, foram alocados nos grupos de alta e baixa fertilidade, procurando-se balancear as raças (holandesa, gir e girolando), dentro de cada grupo. Produção *in vitro* de embriões: Os embriões foram produzidos na empresa In Vitro Brasil, seguindo a metodologia de Pontes et al. (2010), sendo a mesma metodologia empregada nas manipulações do banco de dados utilizado. Foram utilizados ovários provenientes de abatedouro, aspirados assim que coletados para recuperação dos complexos cumulus oophorus (COC's) e selecionados de acordo com o manual da IETS (STRINGFELLOW; GIVENS, 2010) nos graus I, II e III. Em cada manipulação, foram utilizados na PIVE pelo menos 2 touros de cada grupo, selecionados aleatoriamente no dia da FIV. Para cada touro foram utilizados de 60 a 80 oócitos/manipulação, sendo realizadas 5 manipulações/animal. Taxa de fecundação: Parte dos presumíveis zigotos (n=10/manipulação) foram fixados no D1 (24 horas pós-fecundação) e corados com corante nuclear DAPI para visualização da formação do pró-núcleo e classificados entre fecundação positiva e negativa. Cinética embrionária: Os zigotos foram avaliados nos momentos 24, 36, 48, 60, 72 horas pós inseminação e classificados de acordo com estágio de clivagem: não clivados, 2 células, 4 células, 6 células, 8-16 células. Taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário: A taxa de clivagem foi avaliada no D3 de cultivo e a taxa de blastocisto calculada no D7, sendo considerado o número de blastocistos grau I e II (STRINGFELLOW; GIVENS, 2010) sobre o número de estruturas cultivadas. A taxa de desenvolvimento embrionário foi considerada como sendo a razão entre o número de blastocistos grau I e II sobre o número de estruturas clivadas no dia 3. Análise estatística: Os dados foram analisados pelo software SAS 9.3 (System for Windows). Para as variáveis taxa de fecundação, de clivagem, de blastocisto e de desenvolvimento embrionário foi realizado ANOVA para verificar diferença entre os dois grupos. Para a análise da cinética, foi utilizado o modelo de medidas repetidas no tempo pelo procedimento PROC GLIMMIX. O nível de significância considerado foi de 0,05.

Resultados e Discussão

Houve diferença entre as taxas de blastocisto e de desenvolvimento embrionário entre os grupos de alta e de baixa fertilidade. Essa diferença também foi observada nos dados retrospectivos, confirmando a diferença de fertilidade entre os grupos. Não houve diferença entre a taxa de fecundação e a de clivagem (Figura 1).

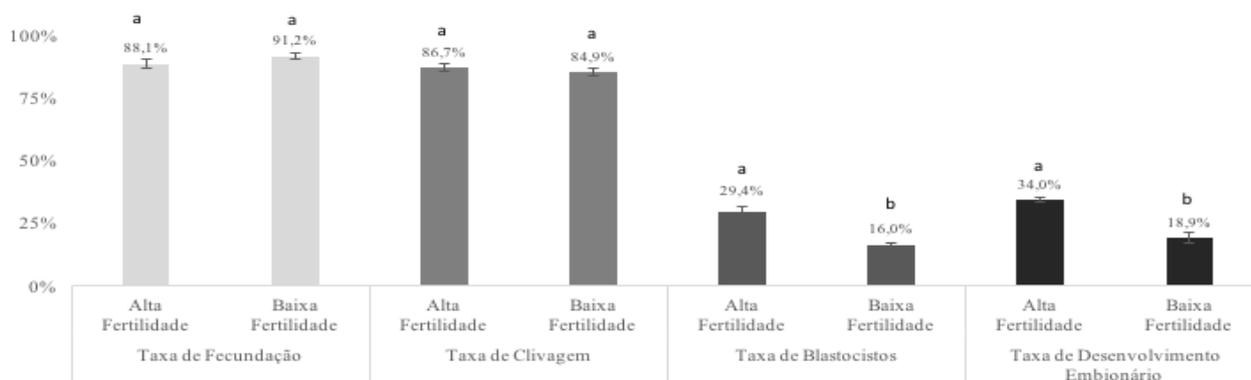


Figura 1. Taxa de clivagem, taxa de blastocisto e taxa de desenvolvimento embrionário entre os grupos de alta e baixa fertilidade. Para letras iguais dentro da mesma variável dependente (taxa de fecundação, taxa de clivagem, taxa de blastocisto, taxa de desenvolvimento) significa que não existe diferença estatística ($P > 0,05$). Fonte: Elaborado pelos autores.

Para cinética de desenvolvimento embrionário, não houve diferença estatística entre os grupos para todos os estágios de desenvolvimento nos tempos avaliados. (Figura 2).

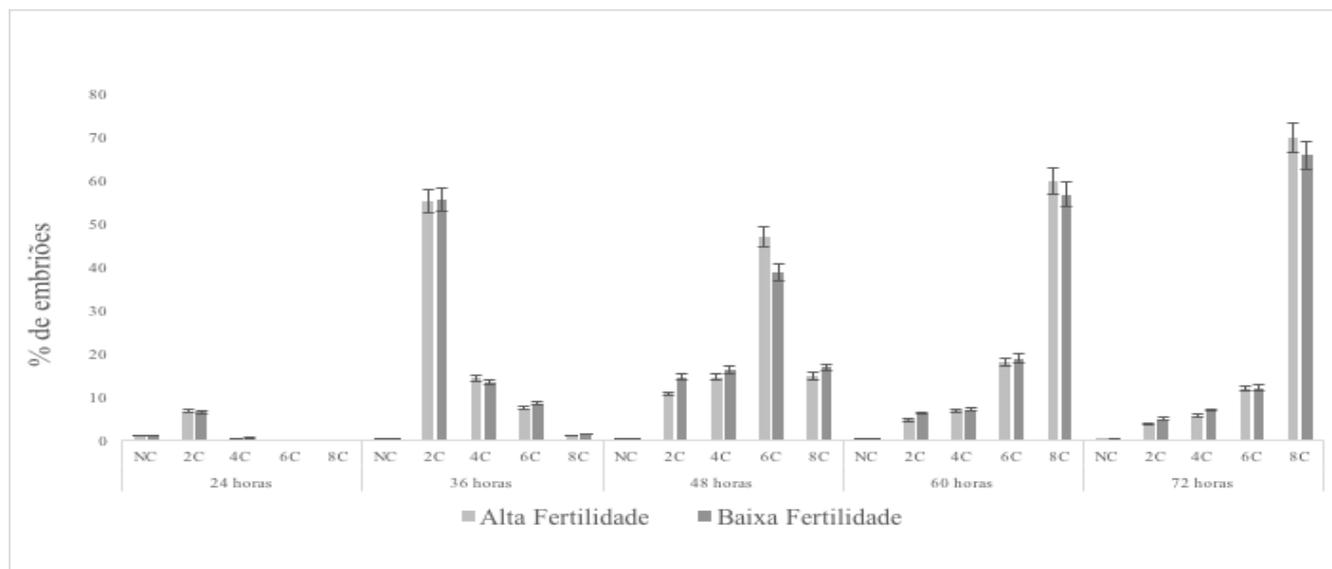


Figura 2. Porcentagem de embriões não clivados (NC), com 2 células (2C), 4 células (4C), 6 células (6C) e 8 células (8C), dos grupos de alta e baixa fertilidade nos diferentes tempos.

Já se sabe que o espermatozoide não é apenas um carreador de material genético paterno, mas que tem fundamental importância no desenvolvimento do embrião e no estabelecimento da gestação (KROPP et al., 2017). Porém, ainda não estão claros os mecanismos envolvidos nesses processos. O papel do espermatozoide nas primeiras clivagens já foi revisado por Lechniak et al. (2008) e diversos estudos demonstraram correlação entre o tempo das primeiras clivagens e a produção/viabilidade dos blastocistos (VAN SOOM et al., 1997; WARD et al., 2001; CARROCERA et al., 2016), no entanto, sem estabelecer um delineamento relacionada à fertilidade do touro. Com base na literatura, este estudo tinha como hipótese a existência de diferença na cinética de desenvolvimento entre os grupos de alta e baixa fertilidade. Essa diferença deveria ser observada durante as clivagens iniciais, pois dados de literatura comprovam que esta é determinante para a produção de blastocistos. Entretanto, esta hipótese foi refutada dado que não houve diferença no tempo das clivagens entre os grupos. Provavelmente, o bloqueio embrionário ocorreu após o estágio de 8-16 células, ou seja, após o momento de maior ativação do genoma embrionário em bovinos (SIRARD, 2012).

Conclusões

A diferença na produção de blastocistos oriundos de touros de alta e baixa fertilidade *in vitro* não pode ser determinada pela cinética embrionária inicial. Mais estudos com enfoque no momento de ativação de genoma embrionário, e subsequente desenvolvimento, são necessários para pontuar o que diferencia os touros de alta e baixa fertilidade *in vitro*.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

CARROCERA, S.; CAAMANO, J. N.; TRIGAL, B.; MARTIN, D.; DIEZ, C. Developmental kinetics of *in vitro*-produced bovine embryos: an aid for making decisions. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 822-827, 2016.

KROPP, J.; CARRILLO, J. A.; NAMOUS, H.; DANIELS, A.; SALIH, S. M.; SONG, J.; KHATIB, H. Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 280, 2017.

LECHNIAK, D.; PERS-KAMCZYC, E.; PAWLAK, P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. **Reproductive Biology**, v. 8, n. 1, p. 23-42, 2008.

PERRY, G. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, p. 14-26, 2014.

PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER, F. F.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1349-1355, 2010.

SIRARD, M. A. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 148-155, 2012.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. 4th ed. Champaign, USA: IETS, 2010.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; KRUIF, A. de. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm *in vitro* produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, n. 1, p. 47-56, 1997.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 1, p. 47-55, 2001.

Impacto da concentração de lipoproteínas de baixa densidade no meio diluidor sobre a cinética espermática do sêmen ovino

Gabriel Felipe Oliveira de Menezes^{1}, Rodrigo Freitas Bittencourt¹, Paola Pereira Snoeck², Adrielle da Silva Lima¹, Edivânia Oliveira de Jesus¹, Jéssica de Jesus Pinheiro¹, Fernando de Lima Cardoso¹, Elisiane Sateles dos Santos¹, Mariana Alves de Andrade Silva¹, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho¹*

Resumo: A gema do ovo tem sido usada como um componente importante do diluidor, no entanto, várias pesquisas mostraram que a parte responsável pela crioproteção de espermatozoides são as lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Assim, na tentativa de elucidar alguns problemas inerentes ao congelamento do sêmen ovino, este estudo foi realizado para avaliar o efeito do uso de LDL extraído da gema de ovo com o objetivo de fazer um diluidor para a criopreservação do sêmen ovino e para avaliar o efeito sobre os parâmetros da cinética espermática. Para este estudo, utilizou-se o sêmen de seis ovinos da raça Santa Inês submetidos à criopreservação em seis tipos de diluidores, com diferentes concentrações de LDL. Após a análise no laboratório, concluiu-se que os diluidores, que continham alta concentração de LDL em sua composição, apresentaram melhores resultados quando comparados a outros tratamentos.

Palavras-chave: Ovinos. Criopreservação espermática. LDL.

Impact of low density lipoprotein concentration on the diluent medium on the spermatic kinetics of ovine semen

Abstract: The egg yolk has been used as a major component of extender, however, several researches have shown that the part responsible for cryoprotection of spermatozoa are low density lipoproteins (LDL). Thus, in an attempt to elucidate some problems inherent to the freezing of ovine semen, this study was carried out to evaluate the effect of the use of LDL extracted from egg yolk for the purpose of making a extender for the cryopreservation of ovine semen and to evaluate its Effect on the parameters of spermatic kinetics. For this study, to used the semen of six Santa Inês ram submitted to cryopreservation were used in six types of extenders, with different concentrations of LDL. After analysis in the laboratory, it was concluded that the extenders, which contained hight concentration of LDL in its composition, presented better results when compared to other treatments.

Keywords: Ovine. Cryopreservation. LDL.

Introdução

A criopreservação de sêmen é imprescindível para melhoramento genético dos ovinos. Dentre as suas diversas vantagens pode-se destacar a preservação do material genético por tempo indeterminado, facilitação do transporte das doses para qualquer região, redução de custos e riscos relacionados à aquisição e ao transporte do reprodutor e, com o uso associado da inseminação artificial (IA), leva ao aumento no número de progênies por macho e disseminação facilitada de material genético de maior qualidade em vários locais ao mesmo tempo (LEBOEUF et al., 1998, 2000). Entretanto, grandes partes dos espermatozoides ficam inviáveis após o processo de congelamento e descongelamento do sêmen (BAILEY et al., 2000). Diversos fatores devem ser observados para que um maior número de células espermáticas se encontre viáveis após a descongelamento. Dentre eles, se destacam o tipo de diluente e sua composição, o método de adição e a concentração de crioprotetor (CASTELO et al., 2008; SALAMON; MAXWELL, 1995).

Pace e Graham (1974) purificaram a gema de ovo e identificaram as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) como os constituintes que minimizam as injúrias ocasionadas ao espermatozoide pela criopreservação. Estudos recentes

¹ Universidade Federal da Bahia, 40170-115, Salvador, Bahia.

² Universidade Estadual de Santa Cruz, 45662-900, Ilhéus, Bahia.

* gmenezes.vet@gmail.com

comprovaram este achado e verificaram que as LDLs agem apresentando um ambiente favorável a sobrevivência espermática.

A utilização da LDL para confecção de diluidores para o processo de criopreservação espermática pode melhorar consideravelmente os parâmetros espermáticos *in vitro* do sêmen ovino após descongelação, representando uma alternativa para minimizar a variabilidade individual de congelabilidade entre ejaculados de um mesmo reprodutor, melhorar os resultados de fertilidade após a descongelação e atender aos padrões internacionais de biossegurança para comercialização de germoplasma animal, pois não utilizaria no meio a gema de ovo *in natura*.

Assim, na tentativa de elucidar alguns problemas inerentes à congelação do sêmen ovino, esse estudo surge com o objetivo de avaliar o efeito da utilização da LDL extraídas da gema de ovo com a finalidade de confeccionar diluentes para criopreservação do sêmen ovino e avaliar o seu efeito sobre os parâmetros da cinética espermática.

Material e Métodos

Para esse estudo, foram utilizados seis animais da raça Santa Inês, todos em idade reprodutiva, submetidos à vermifugação e nutrição balanceada. Previamente às congelações, os reprodutores foram aprovados em exames andrológicos com colheitas de sêmen (CBRA, 2013). Depois foram realizadas duas colheitas de sêmen de cada reprodutor, em dias alternados, através de vagina artificial com água aquecida (42 a 50 °C) e uma fêmea em estro natural como manequim, a fim de estimulá-los sexualmente.

A fim de avaliar a melhor concentração das LDLs, foram formulados cinco diluidores, a base de Tris-glicerol, com diferentes concentrações de LDL em substituição total a gema de ovo, além do grupo controle com gema de ovo: Controle (CTR-20% de gema de ovo), Tratamento 1 (T1-6% de LDL), Tratamento 2 (T2-8% de LDL), Tratamento 3 (T3-12% de LDL), Tratamento 4 (T4-16% de LDL) e Tratamento 5 (T5-20% de LDL).

Após diluição do sêmen em cada tratamento, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e criopreservadas (RODELLO, 2006). As descongelações foram realizadas a 37°C por 30 segundos (LUCIDI et al., 2001), quando então as amostras foram submetidas a análise subjetiva de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %) e vigor espermático (VIG, 1-5) (CBRA, 2013). As amostras também foram avaliadas quanto a integridade funcional da membrana plasmática pelo choque hiposmótico com água destilada (HOST) (MENEZES et al., 2013) e integridade funcional com o corante supravital eosina (SV, %) (BARTH; OKO, 1989).

Os resultados foram submetidos ao pacote estatístico SAS, versão 9.0 (2002). Como todas as amostras apresentaram padrão não normal de distribuição (Shapiro-Wilk), procedeu-se teste de Kruskal-Wallis para estudo de eventuais diferenças das características espermáticas entre os diluidores testados. Quando houve a confirmação da diferença entre os grupos, o parâmetro espermático foi comparado entre os grupos, individualmente, com o teste de Bonferroni. Todas as análises consideraram o nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

As avaliações de vigor e funcionalidade de membrana, através do choque osmótico (HOST), não diferiram entre os grupos. Pode-se verificar, na (Tabela 1), as avaliações pós-descongelação da motilidade total (MT%) e progressiva (MP%), bem como o teste supravital (SV%) através da utilização da eosina.

Tabela 1. Médias dos parâmetros da cinética espermática e do teste supravital, avaliados após a descongelação do sêmen de carneiros. Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Parâmetros	Tratamentos					
	CTR	T1-6%	T2-8%	T3 12%	T4-16%	T5-20%
MT%	31,0 ^b	33,6 ^b	33,6 ^b	41,4 ^a	53,2 ^a	50,0 ^a
MP%	24,0 ^b	28,2 ^b	28,2 ^b	35,0 ^a	45,5 ^a	43,2 ^a
SV%	15,8 ^a	12,5 ^a	12,5 ^a	18,1 ^{ab}	19,3 ^{ab}	24,0 ^b

Fonte: Elaborado pelos autores.

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) preconiza valores $\geq 30\%$ para o parâmetro de motilidade total de espermatozoides após descongelamento, dessa forma, as médias dos grupos deste experimento (CTR, T1-6%, T2-8%, T3-12%, T4-16% e T5-20%) mantiveram-se superiores. O T4-16% obteve melhores ($P < 0,05$) percentuais de MT% e MP%, quando comparado aos grupos CTR, T1-6% e T2-8%, entretanto, semelhantes ($P > 0,05$) aos verificados no T3-12% e T5-20%. Esses resultados são condizentes com outros achados, em que os meios diluidores contendo LDL a 4% ou 8% foram mais eficazes que os meios contendo gema de ovo integral (15%) ao avaliar a resposta do sêmen ovino (SILVA et al., 2014). Ainda, Moussa et al. (2002), ao avaliarem a motilidade espermática de touros, com sêmen diluído em meios com diferentes proporções de LDL (5, 6, 7, 8, 9 e 10%) e um grupo controle (BIOCIPHOS® - IMV®, L'Aigle, France), observaram melhores resultados de 51% versus 54,8% dos meios diluidores contendo 8% de LDL proporcionando os melhores resultados. No entanto, no presente experimento, as concentrações de LDLs que apresentaram a maior eficácia em relação à motilidade foram dos grupos com as maiores concentrações, T3-12%, T4-16% e T5-20%. O percentual de células com integridade estrutural da membrana plasmática (SV%) foi superior para o T5-20% ($P < 0,05$), quando comparado aos verificados com CTR, T1-6% e T2-8% e, não diferiu ($P > 0,05$) aos encontrados para o T3-12% e T4-16%. Estes achados demonstram que quanto maior a concentração de LDL no meio diluidor, maior é a viabilidade das células espermáticas.

Conclusões

Os resultados obtidos demonstram que as LDLs foram eficientes para a substituição da gema de ovo no diluidor de criopreservação do sêmen ovino e na concentração maiores proporcionaram melhores índices de manutenção dos parâmetros espermáticos.

Agradecimentos

À FAPESB pelo apoio financeiro ao projeto e à CAPES, pelo consentimento das bolsas de estudos.

Referências

- BAILEY, J. L.; BLODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon minireview. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press, 1989. 285 p.
- CASTELO, T. de S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, MG: CBRA, 2013. 104 p.
- LEBOEUF, B.; MANFREDIB, E.; BOUEC, P.; PIACERED, A.; BRICEE, G.; BARILF, G.; BROQUAE, C.; HUMBLOTG, P.; TERQUIF, M. Artificial insemination of dairy goats in France. **Livestock Production Science**, v. 55, n. 3, p. 193-203, 1998.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1, p. 113-141, 2000.
- LUCIDI, P.; BARBONI, B.; MATTIOLI, M. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. **Theriogenology**, v. 55, n. 9, p. 1797-1805, 2001.
- MENEZES, G. F. O. de.; BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A de L.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, M. F.; OBA, E.; BICUDO, S. D. Utilização do choque osmótico na avaliação da viabilidade de sêmen criopreservado de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 396-405, 2013.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1695-1706, 2002.
- PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 6, p. 1144-1149, 1974.

RODELLO, L. **Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 3-4, p. 185-249, 1995.

SILVA, M. C. da.; MOURA, L. C. O.; MELO, M. I. V.; MAMBRINI, J. V. M.; NEVES, M. M.; HENRY, M.; SNOECK, P. P. N. Prolonged post cooling but not pre-cooling equilibrium length improves the viability of ram sperm cryopreserved in an extender containing low-density lipoproteins. **Small Ruminant Research**, v. 119, n. 1, p. 88-95, 2014.

Incidência de hipoplasia testicular em touros da raça Senepol: relato de caso

Ana Cláudia Fagundes Faria^{1*}, Ricarda Maria dos Santos², Teresinha Inês Assumpção²

Resumo: Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a incidência de hipoplasia testicular em touros da raça Senepol. Foram avaliados 443 touros com idade entre 12 a 30 meses. Para avaliar o testículo, estes foram traçados e corrigidos lado a lado. A hipoplasia testicular foi classificada de acordo com o grau de redução do testículo: grau 1 (até 20%), grau 2 (30%), grau 3 (40%) e grau 4 (50% ou mais). Foi observado um total de 7,43% dos animais com hipoplasia unilateral, sendo 4,74% do grau 1; 1,12% grau 2; 0,90% grau 3 e 0,67% grau 4. As avaliações dos touros da raça Senepol mostraram um índice razoável de hipoplasia testicular, detectada no exame físico dos testículos, mostrando assim a importância do exame andrológico em touros para reprodução, para eliminar os animais portadores desta patologia hereditária.

Palavras-chave: Reprodução. Patologia testicular. *Bos taurus*.

Incidence of testicular hypoplasia in Senepol bulls: case report

Abstract: The objective of this study was to evaluate the incidence of testicular hypoplasia in Senepol bulls. Were evaluated 443 bulls with age between 12 to 30 months. To evaluate the testis, these were tractioned and fixed side by side. Testicular hypoplasia was classified according to the grade of reduction of the testicle: grade 1 (up to 20%), grade 2 (30%), grade 3 (40%) and grade 4 (50% or more). The total of 7.43% of animals with unilateral hypoplasia was observed, being 4.74% of grade 1; 1.12% grade 2; 0.90% grade 3 and 0.67% grade 4. Evaluations of the Senepol bulls showed a reasonable level of testicular hypoplasia, detected in the physical examination of the testis, thus showing the importance of the andrological examination in bulls for reproduction, to eliminate the animals with this hereditary pathology.

Keywords: Reproduction. Testicular pathology. *Bos taurus*.

Introdução

No Brasil cerca de 90% das vacas e novilhas do rebanho de corte são servidas pela monta natural. Quando se fala de "touro" isoladamente, conclui-se que a importância de sua fertilidade é muito maior do que a de qualquer fêmea, uma vez que é possível acasalar o touro com um grande número de fêmeas, tanto na monta natural como na inseminação artificial (BARBOSA et al., 2005). Assim, é de grande importância avaliar o potencial reprodutivo dos reprodutores, para selecionar aqueles que melhor imprimem características econômicas desejáveis à sua prole como fertilidade, precocidade, capacidade de ganho rápido de peso e musculosidade (FONSECA, 2009). Os testículos podem ser acometidos por diversas patologias que afetam a fertilidade podendo ser de origem genética, congênita ou adquirida. A hipoplasia testicular é uma alteração de caráter hereditário causada pela expressão de um gene recessivo autossômico de penetrância incompleta, que interfere na espermatogênese (NASCIMENTO; SANTOS, 2011). Ela pode se apresentar uni ou bilateral, parcial ou total. Touros com hipoplasia unilateral parcial ou total, ou bilateral parcial, são subfêrteis, e apresentam sêmen com baixa motilidade, concentração e alta porcentagem de anormalidades espermáticas, principalmente as alterações na cabeça do espermatozoide. É uma patologia que é transmitida aos seus descendentes, recomendando-se o descarte do animal (BICUDO et al., 2007). Diante da importância dos touros no desempenho reprodutivo dos rebanhos e dos problemas que a hipoplasia testicular podem causar, este estudo teve por objetivo avaliar a incidência de hipoplasia testicular em touros da raça Senepol.

¹ Seleção R&S Consultoria Pecuária, 38408-194, Uberlândia, Minas Gerais.

² Universidade Federal de Uberlândia, 38408-100, Uberlândia, Minas Gerais.

* anaclaudia_ff@hotmail.com

Material e Métodos

Foram avaliados 443 touros da raça Senepol, com idade entre 12 e 30 meses, puros de origem, oriundos de fazendas comerciais do estado de Minas Gerais. A pesquisa foi realizada durante o ano 2016, com animais criados a pasto e criados no sistema semi-intensivo, com suplementação proteico-energética. Todos os animais foram avaliados por exame clínico geral e do sistema reprodutivo. Na avaliação dos testículos, estes foram tracionados e fixados um ao lado do outro, procurando deixar o escroto distendido para avaliar a simetria testicular. Os testículos foram avaliados visualmente e classificados em: 1) simétricos - quando não tinham nenhum grau de redução entre eles; 2) grau 1 - assimetria, em que um dos testículos era até 20% menor que o outro; 3) grau 2 - assimetria, em que um dos testículos era 30% menor que o outro; 4) grau 3 - assimetria, em que um dos testículos era 40% menor que o outro; 5) grau 4 - assimetria em que um dos testículos apresentou diferença de tamanho de no mínimo 50% menor que o outro.

Resultados e Discussão

Os resultados da avaliação testicular dos touros da raça Senepol se encontram na figura 1, que ilustra o grau de hipoplasia testicular e o número de animais com cada tipo de hipoplasia. Observou-se no rebanho avaliado um total de 7,43% (33/443) de animais com hipoplasia testicular, sendo: 4,74% (21/443) hipoplasia testicular parcial unilateral grau 1; 1,12% (5/443) hipoplasia testicular parcial unilateral grau 2; 0,90% (4/443) hipoplasia testicular parcial unilateral grau 3; 0,67% (3/443) hipoplasia testicular parcial unilateral grau 4 (figura 1). Não foram encontrados animais com hipoplasia bilateral.

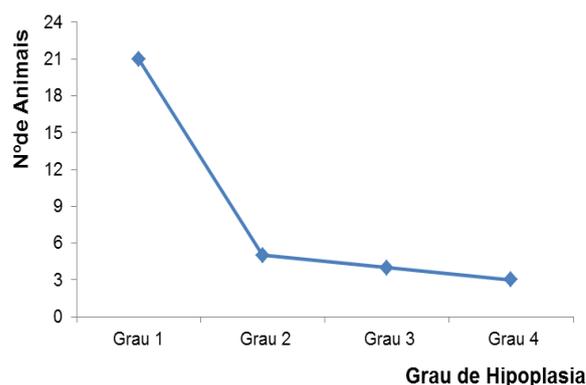


Figura 1. Grau de hipoplasia testicular verificada em touros da raça Senepol com idade entre 12 e 30 meses. Fonte: elaborado pelos autores.

Há poucos relatos sobre a incidência de hipoplasia testicular em touros, principalmente em animais da raça Senepol. Os resultados deste estudo mostraram uma incidência de hipoplasia testicular menor que a relatada por Oliveira et al. (2011) na raça Brangus-Ibagé (11,8%) e também por Goizo et al. (2005) em animais da raça Nelore (15%). Porém, resultado semelhante ao deste estudo foi observado por Vale Filho e Pinto (1988), que relataram incidência de 5,0% de hipoplasia testicular em touros *Bos taurus* e *Bos indicus* no território brasileiro. Há também relatos de incidência menor de hipoplasia testicular, em animais da raça Bororo vermelho por Adeyeye e Wakkala (2013) que registraram 1,57% de incidência da patologia, e por Acuña e Campero (1997) que relatam um descarte de 3,8%, em animais de 18 a 24 meses de raças de carne, na Argentina.

A grande variação da incidência de hipoplasia testicular entre as raças bovinas pode ser explicada pela maior ou menor seleção dos rebanhos, descartando precocemente os touros jovens com problema de hipoplasia, minimizando os índices dos anos posteriores.

Conclusões

A avaliação dos touros da raça Senepol mostrou um índice razoável de hipoplasia testicular, detectada no exame físico dos testículos, mostrando assim a importância da realização de exame andrológico em touros para a reprodução, para eliminar os animais portadores desta patologia hereditária. Neste caso, foi recomendado aos produtores a investigação da origem dos animais, para se evitar novos cruzamentos desta linhagem e assim diminuir o número de animais com hipoplasia testicular.

Referências

- ACUNA, C. M.; CAMPERO, C. M. Problemas reprodutivos, clínicos ea prova de capacidade de serviço em 22.994 touros de raças de carne na Argentina. In: CONGRESSO LATINO DE BUIATRIA, 9.; JORNADAS URUGUAIAS DE BUIATRIA, 25., 1997, Paysandu, Uruguay. **Anais**... Paysandu, Uruguay: CLB, 1997. p. 6-8.
- ADEYEYE A. A.; WAKKALA, S. Testicular hypoplasia in bulls slaughtered at the Sokoto metropolitan abattoir: Nigeria. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE NIGERIAN SOCIETY FOR ANIMAL PRODUCTION, 38., 2013, Port Harcourt, Nigeria. **Proceedings**... Port Harcourt, Nigeria: Rivers State University of Science and Technology, 2013. p. 132-135.
- BARBOSA, R. T.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A. C. M. **A importância do exame andrológico em bovinos**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 13 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular técnica, 41).
- BICUDO, S. D.; SIQUEIRA, J. B.; MEIRA, C. Patologias do sistema reprodutor de touros. **Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 43-48, 2007.
- FONSECA, V. O. Avaliação reprodutiva de touros para a monta a campo: análise crítica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 36-41, 2009.
- GOIOZO, P. F. I.; DI SANTIS, G. W.; LIMA, J. P. de; LAUFER, A. R.; BANDARRA, E. P. Alterações testiculares em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) criados no centro-oeste brasileiro. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 11, p. 58-62, 2005.
- NASCIMENTO, E. F. do; SANTOS, R de L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 153 p.
- OLIVEIRA, L. Z.; CAMARGO, A. S.; LIMA, V. F. M. H.; LIMA, F. M.; COSTA, M. Z. Alta incidência de hipoplasia testicular em touros Brangus-ibagé no estado do Mato Grosso do Sul: relato de caso. **ARS Veterinaria**, v. 27, n. 1, p. 51-55, 2011.
- VALE FILHO, V. R.; PINTO, E. H. Testicular hypoplasia in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls, raised in Brasil. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11., 1988, Dublin, Ireland. **Proceedings**... Dublin, Ireland: University College Dublin, 1988.

Incubação com solução de heparina e BSA não promove aumento do 8-OHdG no DNA de espermatozoides bovinos criopreservados

Janaina Torres Carreira^{1*}, Ana Carolina Pedrosa², Alexandre Champroux³,
Joël R. Drevet³, Ayhan Kocer³

Resumo: Soluções de heparina e BSA são utilizadas para auxiliar na capacitação do sêmen antes da fertilização em muitos protocolos de fertilização *in vitro*, até mesmo os eventos oxidativos são necessários para capacitação e fertilização *in vivo*, assim, queríamos verificar se a incubação *in vitro* com solução de heparina poderia causar danos oxidativos no DNA do espermatozoide. O anticorpo de 8-OHdG foi usado para localizar e contar a oxidação da guanina no DNA do esperma de cinco amostras de sêmen agrupadas após incubação durante 15 minutos com solução de heparina BSA. Não foram observadas diferenças no número de sinais ou na distribuição nuclear do sinal. Nesta condição, a indução de capacitação não aumentou a oxidação do DNA.

Palavras-chave: Capacitação. FIV. EROs. DNA espermático.

Incubation with heparin solution and BSA does not promote increase of 8-OHdG in the DNA of cryopreserved bovine spermatozoa

Abstract: Heparin and BSA solutions have been used to help sperm capacitation prior fertilization on many IVF protocols, even oxidative events are necessary for *in vivo* capacitation and fertilization we wanted to check if the *in vitro* incubation with heparin solution could cause oxidative damage on sperm DNA. 8-OHdG antibody were used to locate and count guanine oxidation on sperm DNA of five pooled semen samples after incubation for 15 minutes with heparin BSA solution. No differences in number of signals or difference on nuclear distribution of signal was observed. In this experiment condition, capacitation induction did not increased DNA oxidation.

Keywords: Capacitation. IVF. ROS. Sperm DNA.

Introdução

Muitas substâncias foram testadas para acelerar a capacitação espermática antes e durante a incubação com oócitos maturados nos protocolos de fertilização *in vitro* (FIV). E foi a partir de experimentos utilizando heparina com espermatozoides bovinos que se chegou a um melhor entendimento dos eventos intracelulares de capacitação. A primeira observação é que a heparina induz a capacitação de espermatozoides bovinos e não somente a reação acrossômica (PARRISH, 2014). Esses eventos estão associados a estados oxidativos considerados fisiológicos e necessários para a fertilização *in vivo* (CHAMPROUX et al., 2016), no entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da indução da capacitação na incubação para FIV quanto ao balanço entre a necessidade fisiológica de geração de radicais livres e o estresse oxidativo com consequentes possíveis danos ao DNA espermático. A fragmentação do DNA pode ocorrer devido ao ataque de diferentes fatores endógenos e exógenos, como nucleases, radicais livres (EROS), mutagênicos, manipulação para reprodução assistida ou artificial (SAKKAS; ALVAREZ, 2010). O mais importante produto final da oxidação das bases nitrogenadas é o 8-OHdG, proveniente da oxidação da Guanina, desta forma ele tem se mostrado um importante marcador de danos causados por radicais livre ao DNA espermático. O objetivo deste trabalho foi verificar se o favorecimento da capacitação *in vitro* com heparina e BSA contribui para formação de quantidades mais elevadas ou modifica a localização das lesões no DNA espermático de um grupo de touros.

Material e Métodos

Foram utilizadas 5 amostras em pool de sêmen congelado de 3 touros Charolês entre 3 e 4 anos com parâmetros espermáticos homogêneos (Elva Novia, Fontaines, França). As amostras descongeladas foram divididas em duas

¹ Instituto Federal de Minas Gerais, 38900-000, Bambuí, Minas Gerais.

² Centro Universitário de Rio Preto, 15025-400, São José do Rio Preto, São Paulo.

³ Université Clermont Auvergne, GReD, Clermont Ferrand, França.

* janaina.carreira@ifmg.edu.br

alíquotas, Grupo Controle e Grupo Heparina. As amostras do grupo Heparina foram submetidas a um protocolo comum a etapa de fertilização in vitro (FIV), onde o sêmen descongelado foi incubado em solução de heparina e BSA (10mL PBS, 600µL BSA e 110µL de heparina) e o grupo controle em PBS durante 15 minutos, 37°C. Após o tratamento foram realizadas esfregaços em lâminas de vidro, depois de secas, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em Dihidroteitol (DTT 0,2Mm, PBS 1x, Triton x100 0,5%) e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, em seguida foram lavadas duas vezes com PBS 1x e Triton X-100 0,01%. Após duas lavagens com PBS 1x, Triton x100 0,1%, foram incubadas em solução de saturação NGS 4% e BSA 1% em PBS 1x por uma hora em temperatura ambiente. Então as lâminas foram cobertas com a solução contendo o anticorpo primário 8-OHdG (15A3 Acris Antibodies, USA) a ser avaliado e incubadas a 4°C, por pelo menos 12 horas. No dia seguinte as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS 1x e cobertas com anticorpo secundário cabra anti-camundongo e alexa 488 por uma hora em temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS 1x as laminas foram coradas por 5 minutos com solução de Hoeschst 33342, lavadas novamente e montadas com PBS/glicerol e lamínula. As laminas foram avaliadas em microscópio confocal Leica SPE em objetiva de 63x (entre 0,18 e 0,21um/stack), após a aquisição de imagens individuais de pelo menos 7 espermatozoides, as imagens foram deconvoluídas no software Huygens Professional e avaliadas no Imaris. As marcações obtidas tridimensionalmente nos núcleos espermáticos com o anticorpo estudado foram transformadas em pontos (figura 1). Então, as imagens tridimensionais foram transformadas em imagens bidimensionais com sobreposição dos pontos e áreas no software Imaris, é importante ressaltar que o software identifica os pontos de fluorescência e os marca com um ponto, ou dot e na transformação bidimensional conta todos os pontos mesmo que sobrepostos. A partir das imagens bidimensionais foram determinadas a caixa de fronteiras para cada célula espermática e a porcentagem da área correspondente a 5 regiões distintas – Dobra acrossomal, acrossoma, região equatorial, e ânulos (pescoço). Os dados da localização topográfica dos pontos provenientes das marcações com os anticorpos descritos acima foram exportados como dados numéricos de posição em tabela do Excel e utilizados para quantificar e verificar a distribuição dos anticorpos no núcleo espermático.

Resultados e Discussão

As amostras avaliadas obtiveram marcação positiva para danos oxidativos em todas as regiões estudadas, a região que apresentou numericamente mais pontos de marcação pelo anticorpo anti-8OHdG foi a correspondente ao acrossoma, no entanto, não houve diferença significativa entre as regiões do núcleo ($P>0,05$). Outros experimentos realizados por esse grupo (dados não publicados) utilizando controle isotópico e a própria localização dos pontos na imagem tridimensional mostram que não há marcação inespecífica de proteínas acrossomais, e que realmente a marcação é nuclear (tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão da quantidade de pontos de marcação do anticorpo anti-8-OHdG no núcleo de espermatozoides bovinos (n=5/grupo), incubados em solução sem (controle) ou com heparina e BSA (heparina).

	Dobra Acrossomal	Acrossoma	Equador	Pós-acrossomal	Ânulus	Total
Controle	0,71±0,75	6,57±6,57	2,14±1,95	2,71±3,2	1,99±1,40	13,57±10,81
Heparina	2,71±2,43	7,86±8,36	1,57±2,30	2,14±1,86	1,43±1,99	15,71±13,44

Fonte: Elaborado pelos autores.

Da mesma forma, não houve diferença entre grupos para nenhuma das regiões estudadas e nem para o total de marcação pelo anticorpo anti-8-OHdG (Figura 1, tabela 1). Apesar a hipótese de que as alterações metabólicas que ocorrem após a exposição do espermatozoide à solução de heparina e BSA em 15 minutos de incubação pudessem aumentar a quantidade de bases oxidadas no DNA espermático, a hipótese não se confirmou nesse experimento, o que é muito favorável para o uso dessa etapa nos protocolos de FIV.

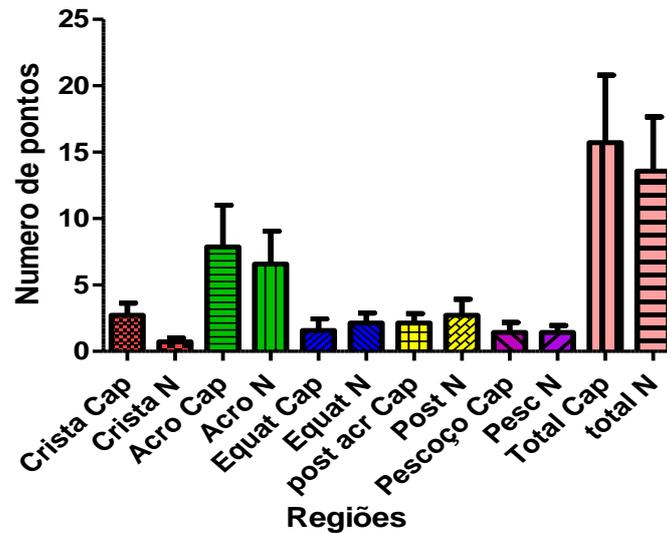
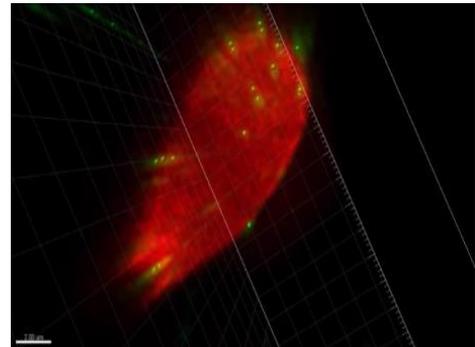


Figura 1. Representação gráfica das regiões avaliadas para espermatozoides incubados com solução de heparina e BSA (Cap) e controle (N). Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 2. Representação gráfica de espermatozoide bovino após deconvolução e transformação da marcação em pontos pelo software Imaris. Fonte: Elaborado pelos autores.



Conclusões

Podemos concluir que nas condições desse experimento não houveram alterações qualitativas (localização das lesões por radicais livres) e quantitativas (quantidade de marcação pelo anticorpo anti-8OhdG) após a incubação de amostras descongeladas de espermatozoides bovinos em solução de heparina e BSA, mimetizando etapa importante dos protocolos de FIV, no entanto, acreditamos que são necessárias avaliações suplementares nas etapas subsequentes da FIV, e de um número maior de amostras.

Agradecimentos

Ao Programa Ciências sem Fronteiras. Elva Novia.

Referências

CHAMPROUX, A.; CARREIRA, J. T.; GHARAGOZLOO, P.; DREVET, J. R.; KOCER, A. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. **Basic and Clinical Andrology**, v. 26, n. 1, p. 17, 2016.

PARRISH, J. J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 67-73, 2014.

SAKKAS, D.; ALVAREZ, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 4, p. 1027-1036, 2010.

Influência da insulação testicular em touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) e mudanças no padrão da morfologia espermática

Arnaldo Algaranhar Gonçalves^{4*}, Thiago Velasco Guimarães Silva¹, Eduardo Baia de Souza¹, Dayana Neves De Melo⁵, Sebastião Tavares Rolim Filho², Alexandre Rossetto Garcia⁶, Otávio Mitio Ohashi¹

Resumo: Este estudo teve como objetivo compreender a morfologia espermática em touros bubalinos sobre a influência do estresse térmico testicular, mantido durante 48 horas, induzido por uma bolsa insuladora. O sêmen foi coletado no tempo de 7, 14 e 21 dias após o início do isolamento testicular. Cinco touros bubalinos, com uma média de 6,5 anos, foram mantidos em barracão com acesso à sombra e ao sol. Observou-se que houve aumento significativo ($P < 0,05$) aos dias 14 e 21 após isolamento testicular para gota citoplasmática proximal ($10,1 \pm 9,1\%$ e $8,1 \pm 5,5\%$) e que embora o aumento não tenha sido significativo ($P > 0,05$), aumentou a observação de patologia de cauda fortemente dobrada e/ou enrolada aos 14 dias, deste modo, esses dados podem caracterizar um perfil espermático diferente encontrado em bovinos (*Bos Taurus indicus*) causados pelo estresse térmico testicular. Portanto, pode-se sugerir que o estresse térmico testicular por 48 horas foi capaz de modificar o padrão de morfologia espermática em touros bubalinos, enfatizando um perfil de patologias espermáticas diferentes em um possível quadro inicial de degeneração testicular.

Palavras-chave: Búfalo. Perfil espermático. Degeneração testicular.

Influence of testicular insulation on buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) and changes in sperm morphology pattern

Abstract: This study aimed to understand the sperm morphology in buffalo bulls on the influence of testicular thermal stress maintained for 48 hours induced by an insulating bag. Semen was collected at the time of 7, 14 and 21 days after the onset of testicular insulation. Five buffalo bulls with a mean of 6.5 years old were kept in stalls with access to shade and sun. It was observed that there was a significant increase ($P < 0.05$) at days 14 and 21 after testicular insulation for proximal cytoplasmic gout ($10.1 \pm 9.1\%$ and $8.1 \pm 5.5\%$). There was a numerically increase ($P > 0.05$) in strongly folded and/or curled tail pathology over 14 days, thus, these data may characterize a different spermatic profile found in bovine (*Bos taurus indicus*) caused by testicular thermal stress. Therefore, it can be suggested that testicular insulation for 48 hours was able to modify the pattern of sperm morphology in buffalo bulls, emphasizing a profile of different sperm pathologies in a possible initial testicular degeneration.

Keywords: Buffalo. Spermatic profile. Testicular degeneration.

Introdução

O Brasil é detentor do maior rebanho bubalino das Américas. O estado do Pará possui o maior rebanho bubalino do país, com aproximadamente 493 mil cabeças, dentre um rebanho nacional de 1,32 milhões de animais. Isso proporciona uma atividade econômica geradora de emprego e renda, que desempenha forte papel de fixação do homem no campo. A bubalinocultura está inserida em um sistema de produção agropecuário que sofre influências do meio ambiente. Por isso, o estresse térmico é um fator importante no estabelecimento de novas unidades de produção de bubalinos para carne e leite, principalmente, considerando que 85% dos búfalos são criados em áreas intertropicais, caracterizadas por altas temperaturas e umidade relativa do ar (GARCIA, 2013). A condição climática desfavorável exercida pelas altas temperaturas influencia negativamente a estação reprodutiva em propriedades na pecuária de corte (SINGH et al., 2013). Em bovinos, já foi demonstrado que o aumento da temperatura testicular exerce efeito deletério nas diferentes

⁴ Universidade Federal do Pará, 66075-110, Belém, Pará.

⁵ Universidade Federal Rural da Amazônia, 66077-830, Belém, Pará.

⁶ Embrapa Pecuária Sudeste, Caixa Postal 339, 13560-970, São Carlos, São Paulo.

* algaranhar.vet@gmail.com

fases da espermatogênese, induzindo aumento de patologias espermáticas e dificultando o uso de inseminação artificial (GABALDI; WOLF, 2002; HANSEN, 2009; OHASHI et al., 2011). Em seres humanos, o estresse térmico também aumenta a porcentagem de anormalidades espermáticas e, conseqüentemente, resulta em falha na fecundação e morte embrionária (ESTEVES, 2015). Alguns estudos em bovinos reportaram que o estresse térmico prejudica a morfologia espermática, havendo relação direta com menor taxa de fecundação e qualidade de embrião, mensurada na contagem do número de células nos estádios de blastocisto (WALTERS et al., 2005; LEIVAS et al., 2011). No entanto, o objetivo deste estudo foi compreender através do estresse térmico testicular em búfalos um quadro inicial de morfologia espermática que caracterize um estágio de degeneração testicular.

Material e Métodos

Foram utilizados cinco touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah com média de idade de 6,5 anos mantidos em baias com área sombreada e não sombreada. As coletas de sêmen foram realizadas uma vez a cada sete dias, utilizando vagina artificial pré-aquecida a 42°C adaptada para espécie bubalina (VALE et al., 1984). Para a indução do estresse térmico testicular, foi usada bolsa insuladora que permaneceu fixa à região escrotal por 48 horas. Cada touro passou por 5 coletas de sêmen, uma coleta a cada 7 dias, sendo duas coletas antes da insulação testicular e três coletas após a insulação testicular. A avaliação da morfologia espermática foi realizada com microscópio de contraste de fase, e, aumento de 1000X, sendo avaliadas 200 células por amostra, que foram classificadas de acordo com Blom (1973). Os dados foram submetidos a comparação de médias pelo teste Tukey, utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0. O nível de significância previamente adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão

A análise comparativa da morfologia espermática permitiu identificar que houve influência do aumento da temperatura testicular decorrente da insulação sobre a incidência de defeitos morfológicos dos espermatozoides (Tabela 1).

Tabela 1. Morfologia espermática com valores em porcentagem (média ± desvio padrão) no sêmen bubalinos que sofreram insulação testicular por 48 horas e avaliados em microscópio de contraste de fase. Valores com letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha diferem significativamente (A-C, P<0,05). G.C.P.: gota citoplasmática proximal; C.F.D./Enrolada: cauda fortemente dobrada ou enrolada; C.D./Enrolada: cauda dobrada ou enrolada; G.C.D.: gota citoplasmática distal.

Morfologia espermática	Controle	7 dias pós insulação	14 dias pós insulação	21 dias pós insulação
Defeitos Maiores	19,3 ±13,4 ^A	25,6 ±14,5 ^{AB}	39,4 ±7,0 ^B	30,6 ±11,1 ^{AB}
Defeitos Menores	3,8 ±4,1	5,4 ±4,6	1,7 ±2,1	7,5 ±9,4
Defeitos Totais	21,6 ±14,0 ^A	31,0 ±10,5 ^{AB}	41,1 ±5,3 ^B	38,1 ±8,2 ^{AB}
Acrossoma	0,1 ±0,3	0,0 ±0,0	0,3 ±0,4	0,7 ±0,7
G.C.P.	1,1 ±0,9 ^A	1,5 ±1,0 ^{AB}	10,1 ±9,1 ^C	8,1 ±5,5 ^{BC}
C.F.D./Enrolada	16,5 ±14,5	23,7 ±15,5	25,7 ±14,5	18,3 ±9,2
C.D./Enrolada	3,3 ±3,9	3,6 ±4,9	0,9 ±1,4	0,6 ±1,3
G.C.D.	0,4 ±0,6	1,5 ±2,5	0,7 ±0,8	5,8 ±8,3

Fonte: Elaborado pelos autores.

O aumento da temperatura do escroto afetou principalmente o processo de maturação epididimária, onde os espermatozoides sofrem mudança conformacional pela retirada dos resíduos citoplasmáticos do espermatozoide, por ação do epitélio ciliar (ANGRIMANI et al., 2017). O tempo de maturação epididimária dura, em média, 8 a 12 dias [12], ou seja, no momento da insulação testicular, os espermatozoides que foram coletados até 14 dias (10,1 ± 9,1%, P<0,05) pós-insulação apresentaram alto percentual de gota citoplasmática proximal, o que pode ser reflexo de uma alteração da fisiologia do epitélio epididimário.

Constatou-se também que houve um aumento de gotas citoplasmáticas proximais aos 21 dias (8,1 ± 5,5, P<0,05) pós-insulação, em relação ao grupo controle demonstrando um prejuízo na fase de espermiogênese, quando transcorria o alongamento das espermatides (RAHMAN et al., 2011). Com isso, foi possível notar forte aumento nos defeitos maiores e totais nos espermatozoides, principalmente 14 dias (39,4 ± 7,0% e 41,1 ± 5,3, P<0,05) pós-insulação. Esses valores observados excederam o limite estipulado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) para a aceitação de ejaculados *in natura* de touros bubalinos.

Mesmo não se observando diferença estatística no valor absoluto ($25,7 \pm 14,5\%$, $P > 0,05$) para caudas fortemente dobradas e/ou enroladas a sua frequência aumentou no décimo quarto dia pós-insulação, chamando atenção, haja vista sua relação com o padrão de movimentação dos espermatozoides, podendo também indicar um quadro inicial de degeneração característico do touro bubalino. Nossos resultados diferiram dos achados de Fernandes et al. (2008), em bovinos (*Bos taurus indicus*) que encontraram um quadro de morfologia espermática diferente realizando insulação testicular por 120 horas em touros Nelore encontrando $3,1 \pm 0,2\%$, $1,5 \pm 0,7\%$ e $8,3 \pm 1,2\%$, de defeito acrossomal, $0,7 \pm 0,2\%$, $14,0 \pm 5,0\%$ e $12,3 \pm 2,3\%$ de *knobbed sperm*, aos 7, 14 e 21 dias após a insulação testicular, respectivamente ($P < 0,05$). Já para gotas citoplasmáticas proximais encontraram $0,4 \pm 0,1\%$, $2,8 \pm 1,0\%$ e $2,6 \pm 0,7\%$ e cauda fortemente dobrada e/ou enrolada $6,1 \pm 3,0\%$, $4,6 \pm 1,7\%$ e $4,5 \pm 1,5\%$, sendo valores inferiores, aos 7, 14 e 21 dias após a insulação testicular respectivamente ($P > 0,05$), ou seja, o inverso quando comparado aos touros bubalinos deste estudo onde as patologias de acrossoma, patologias de cauda fortemente dobrada e/ou enrolada ($P > 0,05$, respectivamente) e gotas citoplasmáticas proximais ($P < 0,05$) foram mais altas. Nosso resultado foi similar ao encontrado por Garcia (2009), que observou alto valor de patologia de cauda fortemente dobrada e/ou enrolada (16,2%) pós-insulação testicular em touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) submetidos ao estresse térmico por 168 horas, observando também baixo índice de patologia de cabeça, ratificando com os dados encontrados neste estudo.

Conclusões

Como observado neste trabalho pode-se sugerir que o estresse térmico testicular por 48 horas foi capaz de modificar o padrão de morfologia espermática em touros bubalinos, enfatizando um perfil de patologias espermáticas diferentes em um possível quadro inicial de degeneração testicular.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Referências

- ANGRIMANI, D. S. R.; LOSANO, J. D. A.; LUCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L.; LANDRIM, F. C.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Cytoplasmic droplet acting as a mitochondrial modulator during sperm maturation in dogs. **Animal Reproduction Science**, v. 181, p. 50-56, 2017.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinary Medicine**, v. 25, n. 7-8, p. 383-391, 1973.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.
- ESTEVES, S. C. Male infertility due to spermatogenic failure: current management and future perspectives. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 62-80, 2015.
- FERNANDES, C. E.; DODE, M. A. N.; PEREIRA, D.; SILVA, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, n. 9, p. 1560-1568, 2008.
- GABALDI, S. H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências Agrárias e da Saúde**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2002.
- GARCIA, A. R. Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 121-130, 2013.
- GARCIA, O. S. **Estudo experimental da insulação testicular em bubalinos**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, Belém.
- HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3341-3350, 2009.
- LEIVAS, F. G.; BRUM, B. D. FIALHO, S. S.; SALIBA, W. P.; ALVIM, M. T. T.; BERNARDI, M. L.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. Fetal calf serum enhances in vitro production of *Bos taurus indicus* embryos. **Theriogenology**, v. 75, n. 3, p. 429-433, 2011.

OHASHI, O. M.; SANTOS, S. S. D.; MIRANDA, M. S.; CORDEIRO, M. S.; COSTA, N. N.; SILVA, T. V. G. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 88-94, 2011.

RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; FRIJTERS, A.; NOORDMAN, J.; GRANADOS, A.; DERNELLE, E.; SHAMSUDDIN, M.; PARRISH, J. J.; VAN SOOM, A. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1246-1257, 2011.

SINGH, M.; CHAUDHARI, B. K.; SINGH, J. K.; SINGH, A. K.; MAURYA, P. K. Effects of thermal load on buffalo reproductive performance during summer season. **Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2013.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L.; SOUSA, J. S.; OHASHI, O. M. Inseminação artificial em búfalos (*Bubalus bubalis*) na região amazônica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 21., 1984, Belém, PA. **Anais...** Belém, PA: CBMV, 1984. p. 91.

WALTERS, A. H.; EYESTONE, W. E.; SAACKE, R. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 1925-1937, 2005.

Influência do fotoperíodo no desempenho reprodutivo de ovinos da raça Santa Inês criados no Distrito Federal

Áurea Maria Póvoa Duarte^{1*}, Carolina Gonzales da Silva¹, Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva², Fernanda Beserra de Almeida², Bianca Damiani Marques Silva²

Resumo: O trabalho foi conduzido com objetivo de avaliar a influência do fotoperíodo crescente e decrescente no Distrito Federal, em padrões reprodutivos e qualidade do sêmen fresco de carneiros da raça Santa Inês. Para isso, foram utilizados cinco carneiros sob a mesma dieta durante todo o experimento. O exame andrológico, realizado a cada 15 dias, incluiu avaliação do perímetro escrotal e consistência testicular, além disso, o ejaculado foi coletado e os parâmetros de motilidade, concentração, integridade da membrana plasmática e morfologia foram analisados. Os mesmos foram comparados pelo teste T ($P < 0,05$). A consistência testicular e a motilidade espermática apresentaram diferença estatística entre as duas estações avaliadas, sendo maior no fotoperíodo decrescente, enquanto que para os demais parâmetros não foi observada diferença significativa. Este estudo confirma que a diminuição dos dias interfere positivamente em alguns parâmetros andrológicos, o que pode melhorar o desempenho reprodutivo dos carneiros da raça Santa Inês no Distrito Federal.

Palavras-chave: Carneiro. Sazonalidade. Sêmen.

Influence of photoperiod on the reproductive performance of Santa Inês rams breed in the Distrito Federal

Abstract: The objective of this work is to evaluate the influence of growing and decreasing photoperiod in Distrito Federal, in reproductive patterns and quality of fresh semen of Santa Inês rams. For this, five rams were used under the same diet throughout the experiment. The andrological examination, performed every 15 days, included evaluation of scrotal circumference and testicular consistency, in addition, the ejaculate was collected and the parameters of motility, concentration, plasma membrane integrity and morphology were analyzed. The means were compared by the T test ($P < 0.05$). Testicular consistency and sperm motility presented statistical difference between the two stations evaluated, being larger in the decreasing photoperiod, while for the others parameters no significant difference was observed. This study confirms that the decrease of days interferes positively in some andrological parameters, which can improve the reproductive performance of Santa Inês rams in Distrito Federal.

Keywords: Ram. Seasonality. Semen.

Introdução

Os ovinos da raça Santa Inês são considerados poliéstricos anuais, embora apre-sentem curtos períodos de sazonalidade reprodutiva (MORAES et al., 2013). Os efeitos do fotoperíodo (duração dos dias) sobre o controle hormonal são mediados pela melatonina pineal que transforma a mensagem fotoperiódica em mensagem química, e a sua secreção diária é proporcional ao comprimento da noite (COELHO et al., 2006). Em carneiros, o estímulo da liberação do LH ocorre invariavelmente durante o período em que a duração dos dias decresce, já que a diminuição (ou encurtamento) dos dias exerce um efeito estimulante na secreção de GnRH pelo hipotálamo nesses reprodutores de dias curtos (PTASZYNSKA, 2008), enquanto que o aumento (ou prolongamento) dos dias provoca sua inibição, sendo assim, sua atividade sexual é maior no outono, declinando no fim do inverno, primavera e verão (HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B., 2004). Com o aumento da procura, e conseqüentemente da produção, é de fundamental importância obter informações a respeito do perfil reprodutivo da população ovina no Distrito Federal. Em nenhum dos estudos encontrados foi realizado o controle sobre a nutrição dos animais, o que influenciou diretamente nos resultados, fazendo com que não fosse comprovada a influência específica do fotoperíodo na estacionalidade. O objetivo desse trabalho é avaliar a influência do fotoperíodo na região do Distrito Federal, quanto aos padrões reprodutivos e a qualidade do

¹ Centro Universitário de Desenvolvimento do Centro-Oeste, 72800-000, Luziânia, Goiás.

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 70770-917, Brasília, Distrito Federal.

sêmen fresco de carneiros da raça Santa Inês, durante os períodos em que deveriam apresentar atividade reprodutiva reduzida (primavera e verão), e se estão aptos a serem introduzidos na reprodução nesse período, respondendo aos padrões de qualidade exigidos da raça.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no Campo Experimental Fazenda Sucupira (CEFS) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen, situada em Brasília, DF, localizado a 15°47' de latitude sul e 47°55' de longitude oeste, de clima tropical. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (protocolo nº 003-2016). O experimento ocorreu entre 16 de setembro de 2016 e 17 de março de 2017. Foram utilizados cinco reprodutores ovinos da raça Santa Inês, com idade entre dois e cinco anos, mantidos em sistema intensivo. Os reprodutores foram avaliados a cada quinze dias por meio do exame andrológico, totalizando 14 avaliações, sendo sete nos meses de fotoperíodo crescente (primavera) e outras sete nos meses de fotoperíodo decrescente (verão). Também foi mensurada a temperatura nos dias de cada coleta, através de informações disponibilizadas pelo Inmet. Na avaliação andrológica foi realizado exame do aparelho reprodutivo, onde foi mensurada circunferência escrotal (MARTINS FILHO, 1991) e aferida a consistência testicular (LEAL et al., 2002). Foi realizada a lavagem do prepúcio com solução fisiológica (0,9% NaCl), seguindo com a coleta de sêmen utilizando a vagina artificial e manequim viva. Imediatamente após, iniciou-se o espermograma, com análises de motilidade, concentração e morfologia espermática realizadas de acordo com o CBRA (2003). Por fim, foi realizado teste de integridade de membrana plasmática no microscópio de fluorescência com os corantes Iodeto de Propídio (IP) associado com o Diacetato de Carboxifluoresceína (FDA), segundo Harrison e Vickers (1990). Para comparação entre médias foi realizado o teste T a um nível de significância de 5% ($P < 0,05$), por meio do programa estatístico Prophet 5.0®.

Resultados e Discussão

Os parâmetros consistência testicular e motilidade espermática apresentaram diferença estatística entre as duas estações avaliadas, sendo maiores no fotoperíodo decrescente (Tabela 1). Contradizendo a hipótese apresentada por Rege et al. (2000), que afirma que enquanto em regiões temperadas a sazonalidade dos carneiros é atribuída à combinação entre fotoperíodo e temperatura, em regiões tropicais o efeito ambiental parece estar mais relacionado com a chuva e seu efeito na quantidade e qualidade da forragem, já que neste estudo a alimentação foi controlada, não havendo variação entre os períodos analisados.

Tabela 1. Comparação das médias dos resultados obtidos das avaliações de cada coleta realizada nos diferentes períodos sazonais. Valores com letras diferentes nas linhas são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

ANÁLISES	PRIMAVERA (fotoperíodo crescente)		VERÃO (fotoperíodo decrescente)	
Circunferência Escrotal (cm)		31,6 ± 2,7 ^a		32,1 ± 2,4 ^a
Consistência Testicular (1-4)		2,4 ± 0,9 ^b		3,2 ± 0,7 ^a
Motilidade Espermática (%)		75 ± 7,5 ^b		81 ± 7,5 ^a
Patologia Espermática (%)		18,8 ± 8,7 ^a		17,2 ± 11,8 ^a
Integridade de	Integros	55,8 ± 21,5 ^a		64,9 ± 12,3 ^a
Membrana Plasmática	Lesados	43,9 ± 21,8 ^a		35 ± 12,3 ^a
Concentração Espermática (x10 ⁶ /ml)		3571,8 ± 661 ^a		3322 ± 761,1 ^a
Temperatura (°C)	Máxima	29,7 ± 1,3 ^a		29,8 ± 1,1 ^a
	Mínima	19,3 ± 1,1 ^a		18,7 ± 2,1 ^a

Fonte: Elaborado pelos autores.

A consistência testicular, que segundo Santos e Simplício (2000), tem influência da temperatura, apresentou diferentes graus de firmeza, porém, nunca flacidez. Tal resultado se explica já que não houve variação significativa da temperatura ou estresse térmico durante o período do experimento. Quanto à motilidade, os resultados corroboram os achados de Dufour et al. (1984), mas são contraditórios aos de Martins et al. (2003), também realizado no Distrito Federal que não encontrou interferência da época do ano na motilidade. A quantidade de células espermáticas morfológicamente normais se manteve satisfatória durante todo o período, inclusive de acordo com o padrão do CBRA (2003), assim como resultados anteriores em estudos realizados em animais Santa Inês (SILVA; NUNES, 1984). Não houve diferença

estatística sobre a circunferência escrotal e isso pode ser explicado pelo fato de não haver variação de peso corporal devido à alimentação controlada, pois segundo Alves et al. (2006), existe alta correlação entre o peso e os parâmetros testiculares externos. Os resultados de concentração espermática encontrados neste estudo não tiveram variação significativa, assim como a avaliação de integridade de membrana através da fluorescência, que é utilizada como um pré-requisito para os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, a penetração no revestimento do oócito, a ligação à zona pelúcida e a fusão com o oolema (SOARES; GUERRA, 2009). O fato de haver ligeira melhora no verão comprova que ovinos, considerados animais de dias curtos, na verdade podem ser considerados animais de período decrescente de luminosidade, como já afirmado por Goldman (1999), pois, simplesmente o fato da duração dos dias começarem a diminuir provou melhora, mesmo os dias do verão não sendo menores que do outono e inverno.

Conclusões

Os animais utilizados no presente estudo apresentaram discreta melhora durante o verão, comprovando que a interferência do fotoperíodo afeta significativamente seu desempenho reprodutivo durante o período avaliado na região do Distrito Federal.

Agradecimentos

A Embrapa.

Referências

- ALVES, J. M.; MCMANUS, C.; LUCCI, C. M.; CARNEIRO, H. C. R.; DALLAGO, B. S.; CADAVID, V. G.; MARSIAJ, P. A. P.; LOUVANDINI, H. Estação de nascimento e puberdade em cordeiros Santa Inês. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 958-966, 2006.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame endrológico e avaliação do sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2003. 104 p.
- COELHO, L. A.; RODRIGUES, P. A.; NONAKA, K. O.; SASA, A.; BALIEIRO, J. C. C.; VICENTE, W. R. R.; CIPOLLA NETO, J. Annual pattern of plasma melatonin and progesterone concentrations in hair and wool ewe lambs kept under natural photoperiod at lower latitudes in the southern hemisphere. **Journal of Pineal Research**, v. 41, n. 2, p. 101-107, 2006.
- DUFOUR, J. J.; FAHMY, M. H.; MINVIELLE, F. Seasonal changes in breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 2, p. 416-422, 1984.
- GOLDMAN, B. D. The circadian timing system and reproduction in mammals. **Steroids**, v. 64, n. 9, p. 679-685, 1999.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.
- LEAL, T. M.; REIS, J. de C.; GIRAO, R. N. Perímetro escrotal e características do sêmen de carneiros deslanados da raça Santa Inês: estudo de correlações. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 4, n. 1-2, p. 46-55, 2002.
- MARTINS FILHO, R. **Estimativa de correlações genéticas entre circunferência escrotal em bovinos da raça nelore e características reprodutivas em suas meias-irmãs paternas**. 1991. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- MARTINS, R. D.; MCMANUS, C.; CARVALHEDO, A. S.; BORGES, H. V.; SILVA, A. E. D. F.; SANTOS, N. R. dos. Avaliação da sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês criados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1594-1603, 2003.
- MORAES, G. V. de; MACEDO F. A. F.; LOURENÇO, F. J.; MACEDO, F. G.; RIGOLON, L. P.; NOGUEIRA, G. P.; SANTELLO, G. A. Frequency of estrus in Santa Inês, Texel and Ile de France ewes in the northwest of Paraná State, Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 10, p. 706-712, 2013.
- PTASZYNSKA, M. **Compendio de reprodução animal**. 2008. Disponível em:
<http://www. abspecplan.com.br/upload/library/Compendio_Reproducao.pdf >. Acesso em: 02 fev. 2017.

REGE, J. E. O.; TOE, F.; MUKASA-MUGERWA, E.; TEMBELY, S.; ANINDO, D.; BAKER, R. L.; LAHLOU-KASSI, A. Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep: II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs. **Small Ruminant Research**, v. 37, n. 3, p. 173-187, 2000.

SANTOS, D. O.; SIMPLICIO, A. A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 9, p. 1835-1841, 2000.

SILVA, A. E. D. F.; NUNES, J. F. Estacionalidade na atividade sexual e qualidade do sêmen nos ovinos deslanados das raças Santa Inês e Somalis brasileira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 8, n. 4, p. 207-214, 1984.

SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 2, p. 53-63, 2009.

Morfologia dos espermatozoides de tatu-canastra *Priodontes maximus* Kerr, 1792

Teresinha Inês Assumpção^{1*}, André Luiz Quagliatto Santos¹, Lilja Fromme¹, Graciele Freitas Cardoso¹

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de caracterizar a morfologia espermática do tatu-canastra (*Priodontes maximus* Kerr, 1792). O sêmen foi obtido do testículo e cauda do epidídimo *post-mortem*. As células espermáticas vieram de um tatu-canastra morto pisoteado na região de Cristalina, Estado de Goiás, no Brasil. O trato reprodutivo foi removido, a cauda do epidídimo foi dissecada, cortada, pressionada para eliminar os espermatozoides e lavada com solução salina de formaldeído. Os testículos receberam um corte transversal no terço médio, fazendo impressão do tecido na superfície de uma lâmina de vidro lisa. Foram utilizados microscopia óptica de contraste de fase (câmara úmida) e em lâmina corada pelo método panótico rápido para avaliação. Os espermatozoides apresentaram cabeça oval com grande dimensão, o mesmo que em outros cingulatas, e semelhante ao descrito para a maioria dos mamíferos. A reprodução assistida do tatu-canastra apresenta um grande desafio devido à falta de conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva das espécies.

Palavras-chave: Tatus. Reprodução. Xenarthra.

Spermatic morphology of the armadillo *Priodontes maximus* Kerr, 1792

Abstract: This study aimed to characterize the spermatic morphology of the giant armadillo (*Priodontes maximus* Kerr, 1792). The sperm was obtained post mortem from the testicles and the tails of each epididymis. The spermatic cells came from a giant armadillo killed by trampling in the Cristalina region, State of Goiás, Brazil. The reproductive tract was removed, the tail of epididymis was dissected, cut, pressed to eliminate spermatozoa, and washed with saline formaldehyde solution. The testicles received a cross section cut in the middle third, and they were imprinted on glass slides. Phase contrast (wet chamber) and hematologically smeared stained sheet optical microscopy were used for evaluation. The spermatozoa presented oval head with great dimension, the same as in other cingulatas and similar to the described for most mammals. The assisted reproduction of the giant armadillo presents a great challenge because of the lack of knowledge on the reproductive physiology of the species.

Keywords: Armadillos. Reproduction. Xenarthra.

Introdução

O tatu-canastra *Priodontes maximus* (Kerr, 1792), pertencente à família Dasypodidae, é a maior espécie de tatu, podendo chegar a 150 cm (incluindo a cauda), pesar até 50 quilos e possui grandes garras frontais com 20 cm de comprimento. Está amplamente distribuído por toda a América do Sul, mas em baixas densidades populacionais, e pouco se conhece sobre esta espécie que vive a maior parte do tempo dentro de suas grandes tocas e possui hábitos noturnos. Não há estudos concretos sobre sua reprodução, mas sabe-se que a maturidade sexual dos machos e fêmeas é atingida em torno de 9-12 meses, gestação de 4 meses e gera 1 ou 2 filhotes (SILVEIRA et al., 2009; SUPERINA et al., 2014; CARTER et al., 2016). Impactos Antrópicos (ação humana) como a caça e a destruição do seu habitat natural levaram o tatu-canastra a ser considerada uma espécie ameaçada de extinção, pois 30% da população foi perdida nos últimos 24 anos, sendo assim classificada como vulnerável pelos critérios A2cd do ICMBIO (2014).

Apesar da importância ecológica, são muito poucos os estudos relacionados à reprodução do tatu canastra, o que limita o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida, estratégias para a conservação da espécie e seu manejo em cativeiro. A obtenção de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo consiste em uma técnica importante para reserva genética de animais que vieram a óbito, já que os mesmos são viáveis e possuem capacidade fecundante, além de ser boa fonte de material para estudos morfológicos (SILVA; MOTA FILHO, 2012).

¹ Universidade Federal de Uberlândia, 38408-100, Uberlândia, Minas Gerais.

* teassumpcao@ufu.br

Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar os aspectos morfológicos das células espermáticas de tatu-canastra (*Prionotes maximus*) obtidas do testículo e da cauda do epidídimo post-mortem do animal.

Material e Métodos

Foram utilizadas células espermáticas de tatu-canastra (*Prionotes maximus*) adulto que veio a óbito por atropelamento em uma área de cerrado na região de Cristalina, Goiás. O animal foi trazido ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres da Universidade Federal de Uberlândia, chegando em torno de 6 horas após sua morte.

Os testículos e epidídimos foram rapidamente retirados e então processados. As caudas dos epidídimos foram dissecadas, receberam cortes longitudinais e transversais com uma lâmina de bisturi nº 23, sendo pressionadas para eliminar os espermatozoides, em seguida foram lavadas com solução de formol salina tamponada, sendo as amostras coletadas em microtubo de 2 ml. Os testículos receberam um corte transversal no terço médio, fazendo impressão do tecido na superfície de uma lâmina de vidro lisa (imprinting), que foram devidamente identificadas.

Foi avaliada a morfologia dos espermatozoides coletados do testículo (imprinting) e do líquido recolhido da cauda do epidídimo, utilizando microscopia óptica de contraste de fase (câmara úmida) e em lâmina corada pelo método panótico rápido. As características morfológicas das células foram registradas com a utilização da lâmina corada, em microscopia de luz com captura de imagem em aumento de 400 X.

Resultados e Discussão

A morfologia dos espermatozoides de tatu-canastra é semelhante à descrita para a maioria dos mamíferos, sendo que sua cabeça apresenta grandes dimensões (Figura 1), como o que ocorre em outros Cingulatas.

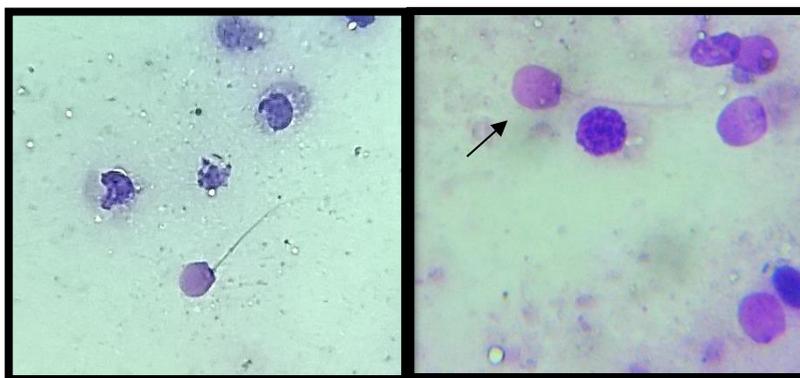


Figura 1. Fotomicrografia dos espermatozoides (*setas*) e de outras células da linhagem germinativa de tatu-canastra (*Prionotes maximus*). Coloração panótico rápido, aumento de 400 x. Fonte: Elaborado pelos autores.

A morfologia observada da célula espermática do tatu-canastra é semelhante a relatada em tatu-peba (*Euphractus sexcinctus*) por Sousa et al. (2013) e Silva et al. (2015) onde verificaram que a mesma representava 16,6% do tamanho total da célula e em tatu peludo (*ChaetophRACTUS villosus*) onde a cabeça representa 17,5% do tamanho total do espermatozoide (CETICA et al., 1993).

Não foi verificada a presença de agregados espermáticos denominados *rouleaux* relatados por Sousa et al. (2013) em *Euphractus sexcinctus*, talvez pelo fato que as células deste estudo foram testiculares e epididimárias (sem plasma seminal), diferente do sêmen utilizado pelos autores que foi obtido a partir de ejaculação, pois acredita-se que algum elemento do plasma seminal é responsável pela agregação dos espermatozoides.

Conclusões

A morfologia espermática do tatu-canastra (*Priodontes maximus*) mostrou-se semelhante a outros cingulatas, porém são necessários mais estudos, inclusive de ultraestrutura, para avaliar tal semelhança.

Referências

- CARTER, T. S.; SUPERINA, M.; LESLIE, D. M. *Priodontes maximus* (Cingulata: Chlamyphoridae). **Mammalian Species**, v. 48, n. 932, p. 21-34, 2016.
- CETICA, P. D.; SASSAROLI, J.; MERANI, M. S.; SOLARI, A. Comparative spermatology in Dasypodidae (*Priodontes maximus*, *Chaetophractus villosus* and *Dasypus hybridus*). **BIOCELL**, v. 18, p. 89-89, 1993.
- ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Mamíferos *Priodontes maximus* (Kerr, 1792): tatu-canastra**. 2014. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/>>. Acesso em: 05 maio 2017.
- SILVA, A. R.; SOUSA, P. C.; FREITAS, C. I. A. Reprodução assistida em tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*): peculiaridades e desafios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 61-65, 2015.
- SILVA, L. D. M. da; MOTA FILHO, A. C. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2012.
- SILVEIRA, L.; JACOMO, A. T. A.; TORRES, N. M.; SOLLMANN, R.; VYNNE, C. Ecology of the giant armadillo (*Priodontes maximus*) in the grasslands of central Brazil. **Edentata**, v. 8-10, p. 25-34, 2009.
- SOUSA, P. C.; SANTOS, E. A. A.; BEZERRA, J. A. B.; LIMA, G. L.; CASTELO, T. S.; FONTENELE NETO, J. D.; SILVA, A. R. Morphology, morphometry and ultrastructure of captive six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 140, n. 3, p. 279-285, 2013.
- SUPERINA, M.; PAGNUTTI, N.; ABBA, A. M. What do we know about armadillos? An analysis of four centuries of knowledge about a group of South American mammals, with emphasis on their conservation. **Mammal Review**, v. 44, n. 1, p. 69-80, 2014.

Perfil espermático de reprodutores da raça Bulldogue Francês

Larissa Rodrigues Santana¹, Rodrigo Freitas Bittencourt^{1*}, Morgana Duarte Felix¹, Catharina de Albuquerque Vieira¹, Alessandro Bittencourt Nascimento¹

Resumo: Treze cães, da raça bulldog francês, com idade entre 1 e 4 anos de idade foram utilizados. O sêmen foi coletado pelo método de manipulação digital com a ajuda de funil e tubos de plástico graduados. Os animais utilizados no estudo já estavam condicionados à coleta de sêmen por manipulação, uma vez que a raça apresenta dificuldades para a realização de acasalamento natural. 42 ejaculados foram coletados e processados no total. Foram observadas características macroscópicas como volume, cor, odor, aparência e características microscópicas, como motilidade total, motilidade progressiva, vigor, concentração, morfologia e teste hiposmótico. As descobertas deste trabalho na raça Bulldog francês foram: VOL ($3,6 \pm 1,3$); MT ($88,0 \pm 8,5$); MP ($83,8 \pm 7,8$); VIG ($3,7 \pm 0,6$); CONC ($84,2 \pm 69,4$); DMA ($6,0 \pm 4,7$); DME ($4,1 \pm 2,3$); SV ($88,9 \pm 6,6$); HOST ($89,5 \pm 10,7$). Todos os cães preencheram os parâmetros estabelecidos pelo CBRA.

Palavras-chave: Canino. Sêmen. Biotecnologia.

Spermatic profile of breeders of the breed Bulldog French

Abstract: Thirteen dogs, of the breed Bulldog French, were used between 1 and 4 years old. The semen was collected by the digital manipulation method with the aid of funnel and graduated plastic tubes. The animals used in the study were already conditioned to the collection of semen by manipulation, since the breed presents difficulties for the accomplishment of natural mating. 42 ejaculates were collected and processed in total. Macroscopic characteristics such as volume, color, odor and appearance and microscopic characteristics such as total motility, progressive motility, vigor, concentration, morphology and hyposmotic test were observed. The findings of this work in the French Bulldog breed were: VOL (3.6 ± 1.3); MT (88.0 ± 8.5); MP (83.8 ± 7.8); VIG (3.7 ± 0.6); CONC (84.2 ± 69.4); DMA (6.0 ± 4.7); DME (4.1 ± 2.3); SV (88.9 ± 6.6); HOST (89.5 ± 10.7). All dogs met the parameters established by the CBRA.

Keywords: Canine. Semen. Biotechnology.

Introdução

Nos últimos anos, o crescente interesse pela criação de cães motivou o desenvolvimento de uma atividade comercial lucrativa. Assim, há um interesse em aumentar a performance reprodutiva por meio de biotecnologias da reprodução, como criopreservação de gametas e a inseminação artificial (BRITO-NERY et al., 2014). A Inseminação Artificial (IA) em cães é uma biotecnologia que assume papel importante para a reprodução de cães de raça, pois evita a transmissão de doenças transmitidas pela cópula e possibilita a reprodução de animais que não conseguem chegar a termo no coito – animais de temperamento mais agressivos e aqueles com diferença de índole e tamanho, além de outras justificativas. E a IA com sêmen in natura, quando feita da forma e no momento adequados, proporciona taxas de concepção e tamanho da ninhada semelhantes aos obtidos com a cópula natural (BITTENCOURT et al., 2015). Especificamente para a raça Bulldog, a justificativa para o uso da Inseminação artificial (IA) está no relato de proprietários que tiveram baixas taxas de prenhez e pequeno número de filhotes com monta natural, devido às dificuldades dos machos e fêmeas durante o acasalamento (JACOMINI et al., 2006). Por observar carência de trabalhos que analisam o padrão espermático desses animais, objetivou-se com este estudo, traçar o perfil espermático de cães da raça Bulldogue Francês.

¹ Universidade Federal da Bahia, 40170-115, Salvador, Bahia.

* rfb@ufba.br

Material e Métodos

Para o estudo foram avaliados 42 ejaculados de 13 Buldogues Franceses, colhidos por estimulação manual do pênis. O sêmen in natura foi avaliado quanto ao volume (VOL) e em seguida, os parâmetros de motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP) e vigor (VIG) foram obtidos através de análise subjetiva com auxílio da microscopia óptica. Para cálculo da concentração espermática (CONC), realizou-se diluição na proporção de 1:50 em água destilada e posterior contagem em câmara de Neubauer. Para o exame de morfologia espermática, foi confeccionado esfregaço corado posteriormente em panótico rápido e avaliado quanto à presença de defeitos maiores (DMA) e menores (DME), contando o mínimo de 100 células por amostra. Além disso, observou-se a integridade estrutural da membrana plasmática através da coloração supravital com eosina (SV), identificando o percentual de células com ou sem lesão O teste hiposmótico (HOST) foi realizado em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x, após procedida a diluição do sêmen na proporção de 1:10 em água destilada, visando obter percentual de células com funcionalidade da membrana plasmática. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS, Versão 9.0 (2002). As variáveis foram submetidas ao teste de média e desvio padrão.

Resultados e Discussão

As características dos ejaculados são apresentados na (Tabela 1). Os resultados apresentados no estudo foram semelhantes aos resultados obtidos por Chacur et al. (2017), onde avaliaram a qualidade do sêmen fresco de cães da mesma raça. Soares et al. (2002), avaliando o sêmen fresco e refrigerado de cães da raça Pastor Alemão, obtiveram resultados superiores para motilidade total (90%) e vigor (BAPTISTA SOBRINHO et al., 2009), porém inferiores para concentração e volume. Baptista Sobrinho et al. (2009), avaliaram os parâmetros seminais de cães da raça Rottweiler e obtiveram resultados semelhantes para motilidade total e vigor. Apesar de apresentar baixas taxas de prenhez e pequeno número de filhotes com monta natural, os resultados apresentados no estudo demonstraram que o sêmen dos cães da raça Bulldog Francês possui boa qualidade seminal, assim sendo, o uso da inseminação artificial seria a melhor alternativa para melhorar os índices de fertilidade.

Tabela 1. Perfil espermático de cães da raça Buldogue francês.

Parâmetros	VOL	MT	MP	VIG	CONC	DMA	DME	SV	HOST
	3,6 ± 1,3	88,0 ± 8,5	83,8 ±7,8	3,7 ±0,6	84,2 ±69,4	6,0 ±4,7	4,1 ±2,3	88,9 ±6,6	89,5 ±10,7

Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

Os parâmetros avaliados encontram-se dentro do padrão exigido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para cães reprodutores, assim, pode-se concluir que os animais da raça Buldogue Francês utilizados no experimento são considerados aptos a reprodução.

Agradecimentos

Ministério da Educação e Cultura.

Referências

- BAPTISTA SOBRINHO, C. de A.; HATAMOTO-ZERVOUDAKIS, L. K.; BARNABE, V. H.; NICHII, M.; OLIVEIRA, C. A. Efeitos do estresse de trabalho sobre parâmetros seminais de cães da raça Rottweiler. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 4, p. 280-287, 2009.
- BITTENCOURT, R. F.; SANTOS, M. M.; JESUS, E. O.; MATOS, B. A. P.; BARRETO, W. B.; CHALHOUB, M. C. L. Eficácia da inseminação vaginal profunda em cadelas monitoradas por citologia vaginal. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 3, p. 60-60, 2015.

BRITO-NERY, L. T.; TILBURG, M. F.; MENEZES, E. B.; MACHADO, V. P.; MOURA, A. A. A.; OLIVEIRA, E. C. S. Proteínas do plasma seminal canino: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 110-115, 2014.

CHACUR, M. G. M.; SOUZA, M. G. R.; SOUZA, C. D.; CREMASCO, C. P. Influência da adição de vitamina E em meios diluentes na qualidade do sêmen fresco diluído, refrigerado e congelado em cães da raça Bulldog Francês. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n. 1428, p. 1-6, 2017.

JACOMINI, J. O.; MOREIRA, C. F.; CUNHA, G. N. Uso da inseminação artificial como rotina em programas de reprodução de cadelas da raça Bulldog. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, p. 139, 2006.

SOARES, M. P.; ROSSI, C. A. R.; MEZZALIRA, A.; CECIM, M. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 649-655, 2002.

Qual a melhor concentração de Trolox® associada ao ácido docosahexaenóico em diluidor BotuCrio® na congelação de sêmen de garanhões?

Cristiane Silva Aguiar¹, Celso Henrique Souza Costa Barros¹, William Morais Machado¹, Antônio de Oliveira Leite Filho², Larissa Pires Barbosa³, Ivan Bezerra Allaman¹, Paola Pereira das Neves Snoeck^{1}*

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de avaliar três diferentes concentrações de Trolox® associadas ao DHA no BotuCrio®. Dezesesseis ejaculados de garanhões Mangalarga Marchador foram congelados nos seguintes diluidores: D1) B + DHA + 30 µM / mL Trolox®; D2) B + DHA + 40 µM / mL Trolox®; D3) B + DHA + 50 µM / mL Trolox® e D4) Botucrío®. Houve diferenças entre os diluidores ($P < 0,05$) na preservação de alguns parâmetros cinéticos avaliados pelo SCA®. Na avaliação da peroxidação lipídica espontânea, observou-se baixa produção de TBARS entre os diluidores testados ($P > 0,05$). É possível concluir que a associação de 40 µM / mL de Trolox® com 50 ng mL⁻¹ de DHA é uma alternativa interessante para preservar a velocidade espermática. Embora nenhum diluidor testado tenha maximizado o efeito do BotuCrio®.

Palavras-chave: Antioxidante. Integridade. Ácido graxo.

What is the best concentration of Trolox® associated with docosahexaenoic acid in BotuCrio® extender in the freezing of stallion semen?

Abstract: The aim of this study was to evaluate three different concentrations of Trolox® associated with DHA in BotuCrio®. Sixteen ejaculates of Mangalarga Marchador stallions were frozen in the following extenders: D1) B + DHA + 30 µM / mL Trolox®; D2) B + DHA + 40 µM / mL Trolox®; D3) B + DHA + 50 µM / mL Trolox® and D4) Botucrío®. There were differences among extenders ($P < 0.05$) in preserving some kinetics parameters evaluated by SCA®. In the evaluation of spontaneous lipid peroxidation, low production of TBARS was observed among tested extenders ($P > 0.05$). It is possible to conclude that the association of 40 µM/mL of Trolox® with 50 ng mL⁻¹ of DHA is an interesting alternative to preserve sperm speed. Although no tested extender has maximized the effect of BotuCrio®.

Keywords: Antioxidant. Integrity. Fatty acid.

Introdução

O espermatozoide é particularmente vulnerável aos danos oriundos da peroxidação lipídica (LPO) (HATAMOTO et al., 2006), visto que os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) são abundantes em sua membrana plasmática, a exemplo do ácido docosahexaenóico (DHA) que apresenta grande atividade biológica, influenciando nas funções reprodutivas (OLLERO et al., 2000), porém esta célula é pobre em antioxidantes em seu citoplasma (NICHII, 2003). Os antioxidantes encontrados no sêmen e nos espermatozoides podem ser insuficientes para evitar os danos da LPO durante a criopreservação, principalmente, quando o sêmen é diluído em meio contendo DHA. Nestes casos, se faz necessária a utilização de substâncias com propriedades antioxidantes nos diluidores seminais de congelação visando maximizar a ação do ácido graxo e minimizar a LPO. Os danos causados na membrana resultam em alterações na motilidade e morfologia espermática dentre outras. Esses efeitos deletérios resultam de um desequilíbrio entre a quantidade de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e dos antioxidantes presentes no meio, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. A catalase, a superóxido dismutase e o sistema glutationa/peroxidase e glutationa/redutase (NICHII, 2003) são exemplos de antioxidantes enzimáticos e como não-enzimáticos podemos citar o ácido ascórbico (Vitamina C) e o alfa tocoferol (Vitamina E) (SONG et al., 2006). Todos

¹ Universidade Estadual de Santa Cruz, 45662-900, Ilhéus, Bahia.

² Médico-Veterinário, Profissional Autônomo.

³ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44380-000, Cruz das Almas, Bahia.

* paolasnoeck@gmail.com

agem na quebração dos metais de transição, quebrando as reações em cadeia e reparando as reações de lipoperoxidação. Estudos têm mostrado que o alfa tocoferol é capaz de cessar a reação em cadeia da LPO em biomembranas, protegendo a célula de danos na membrana plasmática e acrossomal (SIKKA, 2004). O Trolox® é um análogo do alfa tocoferol hidrossolúvel, que devido a essa característica possui potente propriedade antioxidante (WU et al., 1991). Considerando que o uso associado do Trolox® e DHA podem melhorar a qualidade espermática durante a criopreservação de sêmen equino (SILVA et al., 2017), objetivou-se avaliar três diferentes concentrações de Trolox® associado ao DHA em diluidor BotuCrio®.

Material e Métodos

Foram coletados por meio de vagina artificial quatro ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador. Os ejaculados foram avaliados macro e microscopicamente, diluídos em BotuSêmen® para centrifugação e o pellet foi rediluído para atingir 100×10^6 de espermatozoides/mL nos seguintes diluidores testados: D1) BotuCrio® + 50 ng mL⁻¹ de DHA + 30 µM/mL de Trolox®; D2) BotuCrio® + 50 ng mL⁻¹ de DHA + 40 µM/mL de Trolox®; D3) BotuCrio® + 50 ng mL⁻¹ de DHA + 50 µM/mL de Trolox® e D4) Botucrío® (controle). O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25mL, resfriado e congelado em máquina TK4000®. Após a descongelação (46°C/15s) foram avaliados os seguintes parâmetros: cinética espermática pelo Sperm Class Analyzer® (SCA®) e nível de peroxidação lipídica, espontânea e catalizada por FeSO₄, no sêmen diluído e no diluidor usando o ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com o método descrito por Buege e Aust (1978).

Resultados e Discussão

Registram-se diferenças significativas entre os diluidores em preservar determinados parâmetros da cinética espermática (Tabela 1). O D1 foi pior em preservar a motilidade total (MT) do que o D4 (P<0,05). A menor motilidade espermática encontrada nas amostras diluídas em BotuCrio® + DHA + 30 µM / mL Trolox® pode ser associada ao estresse oxidativo visto que a integridade mitocondrial e o fornecimento de energia para o movimento são afetados pela presença das espécies reativas ao oxigênio (ROS) (SABETI et al., 2016). O percentual de espermatozoides lentos (LEN) foi menor no D1 e D2 do que no D4. A velocidade curvilínea (VCL), a velocidade linear progressiva (VSL) e a velocidade média do trajeto (VAP) foram maiores no D2 do que no D4. A associação do DHA com 40 µM/mL de Trolox® em BotuCrio® potencializou os diferentes tipos de velocidades comparado ao BotuCrio® sem adição dessas substâncias. Os espermatozoides criopreservados em D1, D2 e D3 tiveram maior amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) do que D4.

Tabela 1. Resultado da cinética e peroxidação lipídica de espermatozoides criopreservados em diferentes diluidores. D1) BotuCrio® + 50 ng mL⁻¹ de DHA + 30 µM/mL de Trolox®; D2) BotuCrio® + 50 ng mL⁻¹ de DHA + 40 µM/mL de Trolox®; D3) BotuCrio® + 50 ng mL⁻¹ de DHA + 50 µM/mL de Trolox® e D4) Botucrío® (controle). Motilidade Total (MT-%), Motilidade Progressiva (MP-%), Rápidos (%), Médios (%), Lentos (%), Velocidade Curvilínea (VCL- µm/s), Velocidade Linear Progressiva (VSL-µm/s), Velocidade Média do Trajeto (VAP-µm/s), Linearidade (LIN-%), Retilinearidade (STR-%), Index de Oscilação (WOB-%), Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça (ALH-µm), Frequência de Batimento de Cauda (BCF-Hz) e Hiperativos (HIPER-%). TBARS E – Teste de Tbars espontâneo, TBARS I – Teste de Tbars induzido pelo FeSO₄. Letras em sobrescrito na linha diferem (P < 0,05).

Parâmetros	Diluidores				EPM	P-valor
	D1	D2	D3	D4		
MT (%)	28,4 ^b	34,3 ^{ab}	35,0 ^{ab}	40,6 ^a	2,8545	0,0364
MP (%)	6,9	8,8	8,7	8,1	1,1352	0,6118
Rápido (%)	1,5	1,6	1,3	1,0	0,2390	0,3111
Médio (%)	7,1	9,0	9,8	9,2	1,0603	0,3160
Lento (%)	19,3 ^b	23,3 ^b	23,9 ^{ab}	30,9 ^a	1,9372	0,0010
VCL (µm/s)	35,2 ^{ab}	37,7 ^a	35,8 ^{ab}	31,6 ^b	1,2683	0,0111
VSL (µm/s)	14,3 ^{ab}	16,3 ^a	14,5 ^{ab}	12,7 ^b	0,9443	0,0808
VAP (µm/s)	19,2 ^{ab}	21,2 ^a	19,4 ^{ab}	17,2 ^b	0,9534	0,0362
LIN (%)	40,4	41,0	39,8	39,1	1,2791	0,7519
STR (%)	73,8	75,5	74,8	73,7	1,2258	0,7049
WOB (%)	54,7	54,7	54,0	53,3	0,8894	0,6508
ALH (µm)	2,7 ^a	2,7 ^a	2,7 ^a	2,5 ^b	0,0505	0,0024
BCF (Hz)	12,5	12,7	12,4	13,0	0,2899	0,4845
HIPER (%)	0,5	0,6	0,5	0,5	0,1189	0,9295

TBARS (nMol/mL)	E	0,07	0,04	0,06	0,14	0,0477	0,4332
TBARS (nMol/mL)	I	0,02 ^b	0,05 ^b	-0,02 ^b	0,20 ^a	0,0240	0,0000

Fonte: Elaborado pelos autores.

Foi detectada baixa produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante a avaliação da LPO espontânea do sêmen diluído nos quatro diluidores (Tabela 1; $P > 0,05$). O BotuCrio® foi menos eficiente em controlar o TBARS comparado aos diluidores contendo DHA + Trolox® no teste catalisado por FeSO₄ (TBARS induzido; $P < 0,05$). A adição do Trolox® em diluidor BotuCrio® + DHA foi efetiva em controlar a quantidade de TBARS produzidas, pois promoveu a sua redução comparado com o BotuCrio®, especialmente durante a LPO induzida. O efeito antioxidante do Trolox® guarda semelhança com o da Vitamina E, ambos atuam na remoção dos radicais peroxil, interrompendo a reação em cadeia da lipoperoxidação (ALBERTINI; ABUJA, 1999).

Conclusões

Destaca-se que a associação de 40 µM/mL de Trolox® com 50 ng mL⁻¹ de DHA é uma alternativa interessante para preservar a velocidade espermática e que o Trolox® mesmo na menor concentração testada foi capaz de manter a lipoperoxidação em níveis extremamente baixos. Entretanto, nenhuma associação crioprotetora testada maximizou o efeito do diluidor BotuCrio®.

Agradecimentos

A FAPESB; CNPq; UESC; UFRB, Haras Pamplona.

Referências

- ALBERTINI, R.; ABUJA, P. M. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. **Free Radical Research**, v. 30, n. 3, p. 181-188, 1999.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- HATAMOTO, L. K.; BAPTISTA SOBRINHO, C. A.; NICHII, M.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1610-1614, 2006.
- NICHII, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- OLLERO, M.; POWERS, R. D.; ALVAREZ, J. G. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 326-334, 2000.
- SABETI, P.; POURMASUMI, S.; RAHIMINIA, T.; AKYASH, F.; TALEBI, A. R. Etiologies of sperm oxidative stress. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, v. 14, n. 4, p. 231-240, 2016.
- SIKKA, S. C. Andrology lab corner: Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.
- SILVA, D. M.; HOLDEN, S. A.; LYONS, A.; SOUZA, J. C.; FAIR, S. In vitro addition of docosahexaenoic acid improves the quality of cooled but not frozen-thawed stallion semen. **Reproduction, Fertility and Development**, 2017.
- SONG, G. J.; NORKUS, E. P.; LEWIS, V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 6, p. 569-575, 2006.
- WU, T. W.; HASHIMOTO, N.; AU, J. X.; WU, J.; MICKLE, D. A. G.; CAREY, D. Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. **Hepatology**, v. 13, n. 3, p. 575-580, 1991.

Qualidade do sêmen criopreservado e fertilidade de fêmeas bovinas em programas de IATF: dados preliminares

Camile Sanches Silva¹, Walvonvitis Baes Rodrigues², José Roberto Potiens³, Juliana Corrêa Borges Silva⁴, Eduardo Antonio de Almeida Rossignolo¹, Fernanda Battistotti Barbosa¹, Eliane Vianna da Costa e Silva¹, Eriklis Nogueira⁴

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de correlacionar os distintos métodos de avaliações laboratorial da criopreservação espermática com a taxa de prenhez de vacas zebuínas submetidas a protocolos de IATF, através de análise de regressão logística múltipla entre prenhez e parâmetros avaliados individualmente. Foram realizadas 19 análises de rotina laboratoriais de aspectos físicos, funcionais e morfológicos por meio de meios subjetivos, CASA e citometria de fluxo em amostras de sêmen de 20 touros utilizados nas 1.542 vacas Nelore submetidas à IATF. Foi observado o efeito da VCL (velocidade curvilínea), velocidade retilínea (VSL), linearidade (LIN) e concentração espermática (mL) na probabilidade de prenhez de vacas Nelore submetido à IATF. Os outros parâmetros avaliados não tiveram efeito na taxa de prenhez.

Palavras-chave: CASA. Citometria de fluxo. Vaca.

Quality of cryopreserved semen and fertility of cows in IATF programs: preliminary data

Abstract: The aim was to correlate different methods of laboratorial evaluation of semen post-thawing with the pregnancy rate of zebu cows submitted to FTAI, through logistic regression analysis between pregnancy and individually assessed parameters. Nineteen laboratory routine analyzes of physical, functional and morphological aspects were performed by subjective means, CASA and flow cytometry in semen samples from 20 bulls used in the 1,542 Nelore cows submitted to FTAI. The effect of VCL (curvilinear velocity), rectilinear velocity (VSL), linearity (LIN) and sperm concentration (mL) on the probability of pregnancy of Nelore cows submitted to FTAI was observed. The other parameters evaluated had no effect on the pregnancy rate.

Keywords: CASA. Flow cytometry. Cow.

Introdução

Apesar da metodologia de criopreservação espermática ter se tornado um procedimento habitual na indústria de biotecnologia reprodutiva, admite-se que a maioria dos protocolos utilizados resulta em considerável quantidade de espermatozoides que não sobrevivem ao processamento ou falham em alguma etapa da fecundação (NAGY et al., 2004).

A influência da qualidade do sêmen criopreservado em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) sobre a taxa de prenhez é expressiva, ainda que se utilizem amostras submetidas a testes laboratoriais simples e que atendam a padrões mínimos de qualidade (ANDERSSON et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2011a, 2011b)

A correlação de testes laboratoriais rotineiramente realizados, tais como: exames imediatos do sêmen, concentração e morfologia espermática, teste de termoresistência, análises computadorizadas do sêmen (ISLAM et al., 2017), testes funcionais, de integridade acrossoma e de membrana, bem como, a citometria de fluxo (GLIOZZI et al., 2007), com a taxa de prenhez à IATF são contraditórios, potencialmente em decorrência do número de fêmeas inseminadas, variações ambientais e alterações estruturais nos diversos compartimentos dos espermatozoides.

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

² Médico-Veterinário, Profissional Liberal.

³ Seleon Indústria e Comércio, 18690-000, Itatinga, São Paulo.

⁴ Embrapa Pantanal, Caixa Postal 109, 79320-900, Corumbá, Mato Grosso do Sul.

* medvetcamile@gmail.com

Deste modo, o trabalho foi conduzido com objetivo de correlacionar diferentes métodos de avaliação seminal com a taxa de prenhez de vacas zebuínas submetidas a protocolos de IATF.

Material e Métodos

Para realização dos testes laboratoriais, foram selecionadas amostras de partidas de sêmen de 20 touros, igualmente distribuídos, das raças Nelore e Angus, utilizadas na IATF de 1542 vacas Nelore, nulíparas e pluríparas, oriundas de propriedades localizadas no estado de Mato Grosso do Sul. O protocolo de IATF incluiu: D0: inserção do dispositivo de 1g progesterona (Sincrogest®) associado à 2mg de benzoato de estradiol, IM (Estrogin®); D8: retirada do dispositivo associado à 0,150 mg de d-cloprostenol, IM (Prolise®), 0,5 mg de cipionato de estradiol (ECP®) e 300UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon®); D10: inseminação artificial, realizada por cinco inseminadores de experiência comprovada e utilizando sêmen descongelado em descongelador automático à 36°C. O diagnóstico de gestação foi obtido por ultrassonografia transretal, 30 dias após a IATF.

Para determinação da qualidade espermática, avaliou-se motilidade e vigor pós-descongelamento, concentração e análise morfológica, teste hiposmótico (HOS) e teste de termo-resistência rápido (TTR) de acordo com CBRA (2013).

A análise computadorizada para avaliação da cinética espermática foi determinada pelo equipamento Computer-assisted semen analyse (CASA), modelo Ivos-Ultimate - Hamilton Thorne Biosciences, previamente ajustado (setup) para análise de sêmen bovino. Foram utilizados dois microlitros de sêmen e selecionados no mínimo sete campos para a leitura e análise dos parâmetros: motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade média (µm/s; VAP), velocidade retilínea (µm/s; VSL), velocidade curvilínea (µm/s; VCL), amplitude lateral de cabeça (µm; ALC), linearidade (%; LIN), retilinearidade (%; STR).

A integridade estrutural da membrana plasmática e polarização mitocondrial foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando, respectivamente, as sondas fluorescentes PI (iodeto de propídeo) e JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianine iodide), no aparelho EasyCyte IMV France.

A gestação foi expressa de forma binária (prenha ou vazia) e realizada a análise de regressão logística múltipla, admitindo-se o nível de significância de 5% e análise de correlação entre as variáveis (fertilidade da partida e resultados dos testes laboratoriais), com os touros incluídos no modelo, assim como inseminador e fazenda, e quando não significativos, excluídos. Os dados foram analisados através do Statistical Analysis System 9.1.3 (CASAGRANDE et al., 1979).

Resultados e Discussão

A análise de regressão logística apresentou concordância de 54,9% e probabilidade estimada de distinguir a probabilidade de prenhez, considerando no modelo logístico como significativas as variáveis velocidade curvilínea (VCL; P=0,008), velocidade retilínea (VSL; P=0,015), linearidade (LIN; P=0,037) e a concentração de espermatozoides/mL (P=0,0428). A taxa de prenhez entre touros variou de 22,9 a 59,4% (P=0,016).

Tabela 1. Variáveis de qualidade seminal pós-descongelamento (média e desvio padrão). MOT= motilidade subjetiva; ConcTT = concentração total; MOTp= motilidade progressiva; VCL= velocidade curvilínea; VSL=velocidade linear; VAP= velocidade de trajeto; LIN=índice de linearidade e STR=índice de retilinearidade; ALC=amplitude lateral de cabeça.

Variáveis	Média ± DP
MOT (%)	48,53 ± 8,76
Vigor (0-5)	3,21 ± 0,61
Def Totais (%)	11,29 ± 7,76
Conc/mL (sptz x10 ⁶)	54,97 ± 23,31
Concvv/dose (sptz x10 ⁶)	7,53 ± 2,81
HOS (céls integras, %)	49,00 ± 9,85
MOT-TTR (%)	15,27 ± 9,22
Vigor-TTR (0-5)	2,13 ± 0,94
HOS (integras-%)	19,79 ± 9,78
<i>Variáveis - análise computadorizada</i>	
MOTtt (%)	36,99 ± 11,83
MOTp (%)	28,22 ± 8,61
VCL(µm/s)	155,77 ± 27,05

VSL(µm/s)	79,95 ± 10,56
VAP(µm/s)	94,16 ± 12,15
LIN (%)	52,02 ± 6,12
STR (%)	84,45 ± 4,79
ALC (µm)	6,95 ± 1,36
<i>Citometria de fluxo</i>	
Integridade de membrana (PI) - %	47,18 ± 13,63
Potencial de membrana mitocondrial (%)	47,05 ± 10,55

Fonte: Elaborado pelos autores.

VCL e VSL apresentaram curva ascendente, sendo que, taxas de gestação acima de 50% foram preditas quando a velocidade foi superior a 140 e 65 µm/s (Fig 1A e 1B, respectivamente). A concentração espermática vem sendo discutida como um fator de relevância desde os primeiros trabalhos com inseminação artificial, ainda no método tradicional (CASAGRANDE et al., 1979). A concentração de espermatozoides/mL apresentou uma curva em que as taxas de gestação mais altas apresentaram-se entre 40 a 80 milhões de espermatozoides/mL, diferentemente de resultados de Crespiho et al. (2014). Em relação a LIN, houve efeito negativo, com maiores taxas de gestação encontradas com linearidade mais baixa.

Das 19 variáveis avaliadas, apenas a concentração de espermatozoides/mL, e as variáveis avaliadas pelo CASA (VCL, VSL e LIN), apresentaram algum efeito sobre a probabilidade de prenhez em vacas submetidas a IATF, assim, novos estudos estão em andamento buscando avaliar associações entre parâmetros laboratoriais e fertilidade, visando melhorar a predição de fertilidade em relação à avaliação de partidas de sêmen pós-descongelamento.

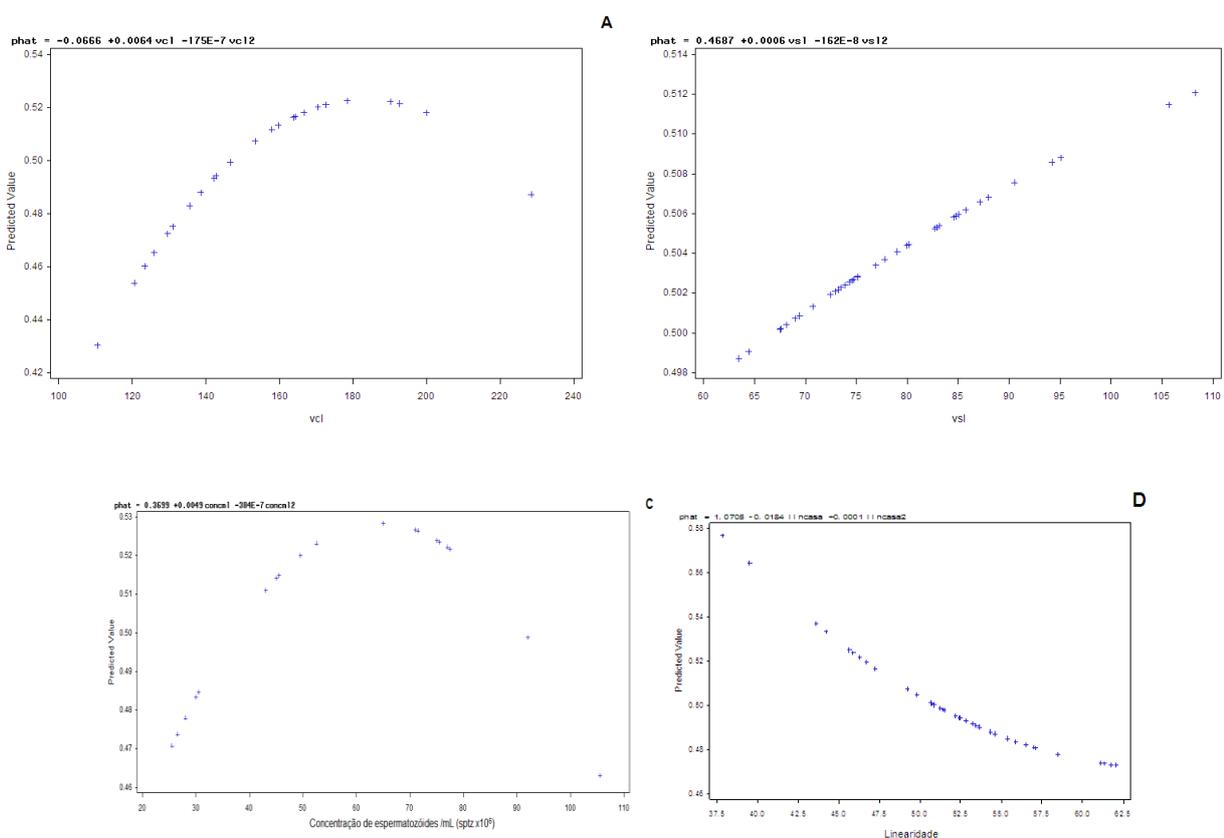


Figura 1. Relação entre: VCL (velocidade curvilínea) (A), velocidade retilínea (VSL) (B), concentração espermática/mL da dose (C), linearidade (LIN) (D), e a probabilidade de gestação de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF. Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

A velocidade curvilínea, velocidade retilínea, linearidade e concentração espermática/mL afetaram a probabilidade de gestação de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF. Novos estudos, avaliando a associação de parâmetros e taxas de prenhez, estão em andamento buscando melhorar a predição da fertilidade de partidas de sêmen congelado.

Agradecimentos

A FUNDECT e a Capes pela concessão de bolsas de doutorado e Pós-doutorado e a EMBRAPA pelo apoio financeiro para pesquisa.

Referências

- ANDERSSON, M.; TAPONEMA, J.; KOSKINENA, E.; DAHLBOM, 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, n. 7, p. 1583-1588, 2004.
- CASAGRANDE, J. F.; PINHEIRO, L. E. L.; ALMEIDA, C. A.; FERRAZ, J. B. S. Patologia espermática agrupada segundo BLOM (1972) na avaliação de sêmen para conelação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 3, n. 2, p. 19-23, 1979.
- CBRA - Colegio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.
- CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; SA FILHO, M. F.; GUASTI, P. N.; DELLAQUA JUNIOR, J. A.; VASCONCELOS, J. L. M.; NOVAES, J. L. C.; MARTINS JUNIOR, A. The influence of insemination dose on pregnancy per fixed-time artificial insemination in beef cows is affected by semen extender. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 1, p. 3-10, 2014.
- GLIOZZI, T. M.; TURRI, F.; MANES, S.; CASSINELLI, C.; PIZZI, F. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. **The Animal Consortium**, p. 1-8, 2017.
- ISLAM, M. R.; HUSAIN, S. S.; HOQUE, M. A.; TALUKDER, M. K.; RAHMAN, M. S.; ALI, M. Y. Computer assisted sperm analysis of Brahman crossbred breeding bull semen. **Bangladesh Journal of Animal Science**, v. 46, n. 1, p. 1-9, 2017.
- NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n. 3-4, p. 225-235, 2004.
- NOGUEIRA, E.; SILVA, A. S.; DIAS, A. M.; ITAVO, L. C. V.; BATISTOTE, E. **Taxa de prenhez de vacas nelores submetidas a protocolos de IATF no Pantanal de MS**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011a. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 97)
- NOGUEIRA, E.; SILVA, A. S.; MARQUES JUNIOR, H. R.; NOGUEIRA, R. J.; BORGES, J. C. **Taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF no Planalto Boliviano**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011b. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 101)

Relação entre motilidade e potencial de membrana mitocondrial durante a maturação espermática em bovinos

Bárbara do Carmo Simões da Silva^{1}, João Diego de Agostini Losano¹, Giulia Kiyomi Vechiato Kawai¹, Bruno Rogério Rui, Andressa Dalmazzo¹, Raquel Fernandes Redondo¹, Luana de Cássia Bicudo¹, Camilla Motta Mendes¹, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção¹, Marcilio Nichi¹*

Resumo: Estudos demonstraram a importância das mitocôndrias para a funcionalidade do sêmen como fonte principal de ATP para homeostase e motilidade. A aquisição de motilidade ocorre durante a maturação do sêmen no epidídimo dependendo do ATP. Observamos que a fosforilação oxidativa pode não estar relacionada ao suprimento de energia da motilidade. Assim, buscamos estudar a possível relação entre motilidade e potencial de membrana mitocondrial (MMP) durante a maturação espermática bovina. Os espermatozoides do cabeça, corpo e cauda do epidídimo foram recuperados e submetidos ao Sistema Computadorizado de Análise Espermática e avaliação de MMP. Observamos uma maior mobilidade em células de cauda ($60 \pm 4,59a$) de epidídimo quando comparadas com a cabeça ($0,54 \pm 0,39b$) e corpo ($2,5 \pm 1,04b$). No entanto, não foram observadas diferenças na porcentagem de células com MMP alta entre regiões do epidídimo. Em conclusão, a aquisição de motilidade em espermatozoides bovinos durante a maturação pode não estar relacionada à funcionalidade mitocondrial. Estudos mais detalhados sobre o metabolismo espermático devem ser realizados para elucidar isso.

Palavras-chave: Epidídimo. Glicólise. Mitocôndria.

Relationship between motility and mitochondrial membrane potential during sperm maturation in cattle

Abstract: Studies have demonstrated the importance of mitochondria for sperm functionality as main source of ATP for homeostasis and motility. The motility acquisition occurs during sperm maturation in epididymis depending on ATP. We have observed oxidative phosphorylation may not be related to motility energy supply. Thus, we aimed to study the possible relation between motility and mitochondrial membrane potential (MMP) during sperm maturation in cattle. Spermatozoa from caput, corpus and cauda of epididymis were recovered and submitted to computer-assisted sperm analysis and MMP assessment. We observed a higher motility in cells from cauda ($60 \pm 4.59a$) of epididymis when compared to from caput ($0.54 \pm 0.39b$) and corpus ($2.5 \pm 1.04b$). However, no differences were observed in cells percentage with high MMP between regions of epididymis. In conclusion, the motility acquisition in bovine spermatozoa during maturation may not be related to mitochondrial functionality. More detailed studies on sperm metabolism should be performed to elucidate this.

Keywords: Epididymis. Glycolysis. Mitochondria.

Introdução

A mitocôndria é uma organela responsável pela respiração celular, a qual produz energia na forma de ATP (CUMMINS, 1998), sendo imprescindível para funcionalidade espermática, homeostase oxidativa e motilidade (TRAVIS et al., 1998). No entanto, o papel da mitocôndria no metabolismo energético de espermatozoides é um paradigma. Estudos demonstraram que a despolarização mitocondrial dos espermatozoides de camundongos e a suplementação com substratos para a glicólise, manteve o batimento flagelar constante, demonstrando a importância desta via como fonte de energia para os espermatozoides. Estes resultados foram descritos em espermatozoides suínos (MARIN et al., 2003), roedores (YUAN et al., 2013) e humanos (STOREY, 2004), indicando que a via glicolítica é tão importante quanto a fosforilação oxidativa para a funcionalidade espermática. Após a espermição, os espermatozoides não possuem motilidade, a qual é adquirida gradativamente durante o processo de maturação ao longo do trânsito epididimário (FAWCETT, 1975). Alguns estudos demonstram que a mitocôndria pode não estar diretamente relacionada com a

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 05508-270, São Paulo, São Paulo.

* ba.cssilva@usp.br

aquisição da motilidade durante a passagem dos espermatozoides ao longo do epidídimo (LOSANO et al., 2017). Assim, objetivamos estudar a possível relação entre motilidade e função mitocondrial durante a maturação espermática em amostras provenientes de epidídimos bovinos.

Material e Métodos

Conjuntos testículo/epidídimo (N=11) provenientes de abatedouros foram transportados e mantidos a 4°C até o momento do processamento seminal. Espermatozoides dos diferentes segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda) foram coletados pelo método de fatiamento e diluídos em tampão-fosfato salino (PBS-Phosphate Buffer Saline). Imediatamente após a recuperação espermática, as amostras foram analisadas pelo Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA-Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton Thorne IVOS 12.3, USA) e quanto ao potencial de membrana mitocondrial (PMM- (JC-1, iodeto de 5, 5, 6, 6' tetracloro 1, 1, 3, 3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) (CELEGHINI et al., 2007). Os dados obtidos de motilidade espermática e PMM foram analisados pelo programa SAS System for Windows 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e submetidos à análise de variância (ANOVA). A comparação de médias foi realizada pelo teste paramétrico LSD (Least Significant Difference) e não paramétrico (Wilcoxon), de acordo com a normalidade dos resíduos (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias. As variáveis foram expressas em média e erro padrão da média (média±EPM) dos dados originais e o nível de significância para rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5% ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Como esperado, observamos maior motilidade total nas células recuperadas da cauda do epidídimo quando comparadas às células da cabeça e corpo (Figura 1).

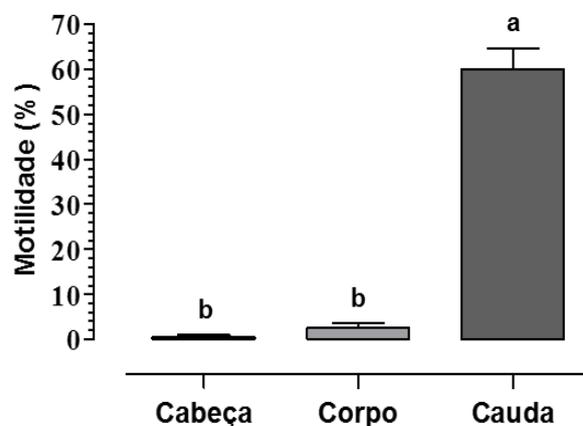


Figura 1. Motilidade (%) de espermatozoides recuperados da cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos ($P < 0,05$). Fonte: Elaborado pelos autores.

Esperávamos observar uma aquisição gradativa do potencial de membrana mitocondrial ao longo do trânsito epididimário (cabeça, corpo e cauda, respectivamente), assim como foi descrito por Angrimani et al. (2017). No entanto, foi observada uma ativação precoce do potencial de membrana mitocondrial, sendo que, não houve diferenças significativas de PMM entre os segmentos do epidídimo (Figura 2).

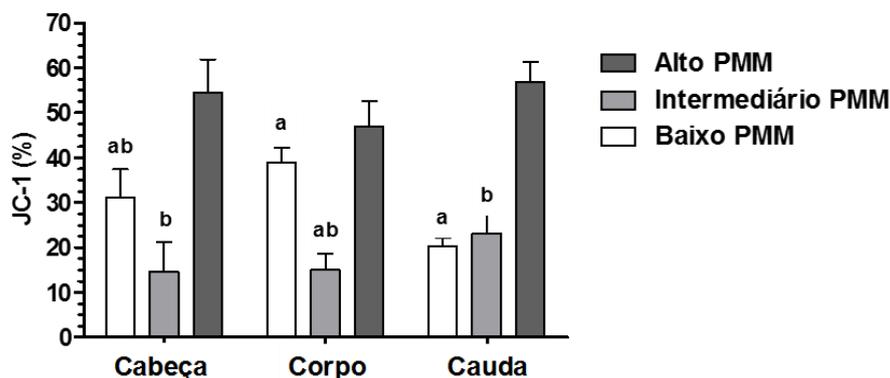


Figura 2. Potenciais de membrana mitocondrial (PMM) de espermatozoides recuperados da cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos ($p < 0,05$). Elaborado pelos autores.

Estes resultados indicam que a aquisição da motilidade durante a maturação espermática pode não estar diretamente relacionada ao potencial de membrana mitocondrial. Sabe-se que durante a capacitação espermática ocorrem modificações nas membranas e hiperativação que auxiliam no processo de fertilização do oócito. Estas modificações são dependentes de energia (FLESCHE; GADELLA, 2000). Contudo, o alto potencial de membrana mitocondrial observado em amostras espermáticas da cabeça e corpo do epidídimo pode estar relacionado com a demanda e reserva energética para a homeostase e processo de maturação espermática, e não somente para a aquisição da motilidade (MARIN et al., 2003).

Conclusões

Deste modo, sugerimos que a função mitocondrial durante a maturação espermática pode não estar relacionada à aquisição da motilidade. No entanto, estudos mais detalhados em relação à bioenergética do espermatozoide bovino durante a maturação espermática devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- ANGRIMANI, D. S. R.; LOSANO, J. D. A.; LUCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L.; LANDIM, F. C.; NICHII, M.; VANNUCCHI C. I. Cytoplasmic droplet acting as a mitochondrial modulator during sperm maturation in dogs. **Animal Reproduction Science**, v. 181, p. 50-56, 2017.
- CELEGHINI, E. C. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.
- CUMMINS, J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 172-182, 1998.
- FAWCETT, D.W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: GREEP, R. O.; ASTWOOD, E. B. (Ed.). **Handbook of Physiology Section 7 Endocrinology Volume V Male Reproductive System**. Washington, D.C.: American Physiological Society, 1975.
- FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

LOSANO, J. D. A.; ANGRIMANI, D. S. R.; DALMAZZO, A.; RUI, B. R.; BRITO, M. M.; MENDES, C. M.; KAWAI, G. K. V.; VANNUCCHI, C. I.; ASSUMPCÃO, M.; BARNABE, V. H.; NICHI, M. Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 2, p. 289-297, 2017.

MARIN, S.; CHIANG, K.; BASSILIAN, S.; LEE, W.-N. P.; BOROS, L. G.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M.; CENTELLES, J. J.; MEDRANO, A.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; CASCANTE, M. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. **FEBS Letters**, v. 554, n. 3, p. 342-346, 2003.

STOREY, B. T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 5-6, p. 427-437, 2004.

TRAVIS, A. J.; FOSTER, J. A.; ROSENBAUM, N. A.; VISCONTI, P. E.; GERTON, G. L.; KOPF, G. S.; MOSS, S. B. Targeting of a Germ Cell-specific Type 1 Hexokinase Lacking a Porin-binding Domain to the Mitochondria as Well as to the Head and Fibrous Sheath of Murine Spermatozoa. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, n. 2, p. 263-276, 1998.

YUAN, S.; ZHENG, H.; ZHENG, Z.; YAN, W. Proteomic analyses reveal a role of cytoplasmic droplets as an energy source during epididymal sperm maturation. **PloS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1-12, 2013.

Refrigeração do sêmen canino previamente contaminado por urina

Israel Pereira dos Santos^{1,2}, Carolina Montes Silva², Fausto Paes de Carvalho², Isabel Candia Nunes da Cunha²

Resumo: A contaminação por urina pode ocorrer durante a coleta de sêmen, seja por micção simultânea durante a ejaculação, ou na ejaculação em direção à bexiga. Os relatórios deste problema são comuns durante o procedimento de refrigeração do sêmen de canídeos obtido por eletroejaculação. O efeito da urina na preservação do sêmen não é completamente compreendido. O estudo foi conduzido com objetivo de verificar os efeitos da exposição das amostras de sêmen a diferentes soluções de concentrações de urina e a disponibilidade de amostras de sêmen refrigerado após exposição à solução de urina até 24 horas. Os resultados demonstraram que a qualidade das amostras de sêmen só difere do controle após exposição em solução de urina contendo $\geq 13\%$ de urina. No entanto, após o resfriamento, apenas os espermatozoides que foram incubados em soluções de urina $> 25\%$ diferiram daqueles incubados em solução simples de Ringer. Conclui-se que o sêmen canino suporta concentrações de urina $< 13\%$ durante pelo menos 20 minutos e que os diluidores baseados em leite são eficientes na recuperação da motilidade do espermatozoide previamente contaminado com uma concentração de urina $\leq 25\%$ até 24 horas abaixo de 5°C .

Palavras-chave: Cães. Sêmen. Eletroejaculação.

Freezing of canine semen previously contaminated by urine

Abstract: The urine contamination can happen during the collection of semen, whether by simultaneous urination during ejaculation, as well as when the ejaculate flows toward the bladder. The reports of this problem are common during canids semen freezing procedure when the semen is obtained by electroejaculation. The effect of urine on sperm preservation is not completely understood. The aim of this study was to verify the effects of sperm samples exposition to different urine concentrations solutions and the availability of cooling sperm samples after urine solution exposition until 24 hours. The results demonstrated that sperm samples quality only differ from control after exposition in urine solution containing $\geq 13\%$ of urine. However, after cooling, only the sperm that were incubated in urine solutions $> 25\%$ differed from those incubated in simple Ringer solution. It is concluded that the canine semen supports urine concentrations $< 13\%$ for at least 20 minutes, and that milk based extenders are efficient in recovering the motility of the sperm that were previously contaminated with a urine concentration $\leq 25\%$ until 24 hours under 5°C . effective.

Keywords: Dog. Semen. Electroejaculation.

Introdução

O sêmen canino pode ser contaminado por urina em algumas situações, como por exemplo, na ejaculação em direção à bexiga chamada de ejaculação retrógrada (BEUFAYS et al., 2008). A contaminação do sêmen pela urina foi observada no homem, no equino, no cachorro-do-mato e no urso-marron (MAKLER et al., 1981; GRIGGERS et al., 2001; GOMES-ALVES et al., 2014). Dentre os fatores da urina considerados mais prejudiciais aos espermatozoides estão as diferenças de osmolaridade e pH entre o plasma seminal e a urina (MAKLER et al., 1981; GRIGGERS et al., 2001).

As técnicas utilizadas para contornar os efeitos deletérios da urina sobre o espermatozoide podem ser pré ou pós-ejaculatórias. Dentre as pré-ejaculatórias incluem-se o tamponamento da urina do paciente por meio da ingestão de soluções com NaHCO_3 (BRASSESCO et al., 1988); ou a terapia com fármacos alfa-adrenérgicos que impedem a retroejaculação, como a fenilpropanolamina (BEUFAYS et al., 2008). Como técnicas pós-ejaculatórias podem ser utilizadas: a centrifugação do sêmen contaminado por urina (GRIGGERS et al., 2001; GOMES-ALVES et al., 2014), uso de diluidor a base de leite, que reduzem as perdas da viabilidade espermática (GRIGGERS et al., 2001) ou uso de diluidores comerciais (GOMES-ALVES et al., 2014).

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, 69190-000, Maués, Amazonas.

² Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 28035-200, Goytacazes, Rio de Janeiro.

* cunhaicn@gmail.com

Tratando-se de animais de alto valor zootécnico ou de animais silvestres em risco de extinção, toda amostra seminal deve ser aproveitada. A contaminação do sêmen com urina durante o procedimento de eletroejaculação é um fator frequente nos canídeos (SOUZA et al., 2011), desta forma, tentativas de correção do pH e da osmolaridade da urina, com objetivo de minimizar os efeitos deletérios sobre os espermatozoides durante a coleta já foram realizadas (MAKLER et al., 1981; GRIGGERS et al., 2001). O objetivo deste trabalho foi verificar qual a porcentagem máxima de contaminação com urina é compatível com a utilização do sêmen de cão no processo de resfriamento.

Material e Métodos

Foram utilizados 10 animais de diferentes raças, com idade entre 1,5-7,0 anos (6 ± 1), e pesando entre 7,0-32,0 Kg (23 ± 3). Todos os animais foram provenientes de criadores particulares.

As coletas de sêmen aconteceram 2 vezes em uma semana e somente a segunda coleta de cada cão foi utilizada nos experimentos. Foi utilizada a segunda fração (fração espermática) de 10 ejaculados, coletados pela massagem peniana, com auxílio de luvas, funis e tubos plásticos de 15 mL com tampas rosqueadas. Todas as amostras de sêmen foram levadas ao laboratório, onde o ensaio começou imediatamente, em um intervalo inferior a 30 minutos.

A urina autóloga foi coletada e diluída nas proporções de 1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2 (concentrações aproximadas de 3, 6, 13, 25 e 50%, respectivamente) em ringer simples.

Alíquotas de 100 μ L de sêmen foram diluídas em 400 μ L de urina e nas soluções de ringer + urina descritas acima. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 700 x g por 7 minutos. Para o resfriamento, o sobrenadante foi retirado e 400 μ L do diluidor Kenney foi adicionado ao decantado. Todas as amostras diluídas em Kenney foram refrigeradas em um refrigerador Minitub® a 5°C por 24h.

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético e Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos do Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. As avaliações macroscópicas realizadas foram: cor, aspecto e volume.

As propriedades físico-químicas avaliadas do sêmen foram o pH com a fita colorimétrica 0-14 Universalindikator (Merck-Alemanha) e a osmolaridade com o osmômetro modelo 5004 Micro-osmett™ - Precision Systems, Inc.

A concentração foi aferida em câmara de Neubauer sob microscopia de contraste de fase (Nikon, model Eclipse 80i). A morfologia foi avaliada, sob microscopia de contraste de fase com magnificação de 1000x magnification (Nikon, model Eclipse 80i), segundo a classificação proposta previamente na literatura (OETTLE, 1993).

A motilidade total e progressiva do sêmen foi avaliada no sistema computadorizado Hamilton Thorne-Research CEROS 10.8□, nos tempos 0, 20 minutos e 24 horas. Para tanto, uma alíquota de 7 μ L da amostra foi colocada entre lâmina 25,4x 76,2mm e lamínula 22x22mm pré-aquecidas a 37°C (NOTHLING; SANTOS, 2012).

Para verificar a integridade e funcionalidade da membrana espermática, alíquotas de 10 μ L do sêmen provenientes da cada diluição entre sêmen e urina, após 24h de refrigeração, foram incubadas por 45 minutos em uma solução hiposmótica de frutose 60mOsmol/l. Ao final da incubação, a morfologia de 200 espermatozoides foi avaliada entre lâmina e lamínula, no aumento de 1000x através da microscopia de contraste de fase (Nikon, model Eclipse 80i), as células que enrolaram a cauda após a incubação foram consideradas íntegras e funcionais (KUMI-DIAKA, 1993).

As amostras de urina foram avaliadas com as tiras de urinálise Uriquest (Labtest diagnóstica S/A).

Os dados foram tabulados no software Microsoft Excel. Após as transformações necessárias, os tratamentos foram comparados pela análise de variância não-paramétrica Kruskal-Wallis, seguida pelo teste post hoc Student-Newman-Keuls; estas análises foram realizadas no software livre BioEstat 5.0, Brasil. Foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

Os resultados médios das características do sêmen fresco foram: volume 2,0 mL, concentração 285 ± 83 milhões de espermatozoides/mL e motilidade total $79 \pm 7\%$. Os resultados obtidos após refrigeração das amostras antes incubadas em ringer e em diferentes soluções de ringer+urina no diluidor Kenney (1975) por 24h a 5°C, permitiu preservar a viabilidade espermática de células que foram submetidas previamente a solução de ringer+urina $\leq 25\%$ e estes resultados indicam que a ação do diluidor a base de leite (Kenney, 1975) foi capaz de melhorar ($P < 0,05$) os resultados das variáveis motilidade total, motilidade progressiva, BCF, VAP e VSL durante as 24h de refrigeração a 5°C.

O ringer simples, que é relatado na literatura como um meio adequado à manutenção da função espermática, foi escolhido como extensor do sêmen no presente estudo, principalmente devido sua composição simples, NaCl, KCl e

CaCl₂, de pequeno potencial deletério para a aplicação intravesical; somando-se a isso, é um meio estéril e de simples aquisição.

Os resultados da motilidade total observados no presente trabalho após 20 minutos de incubação são semelhantes àqueles encontrados anteriormente na literatura (GRIGGERS et al., 2001) para o sêmen equino em soluções de 0,5, 10, 33 e 50% de urina em NaCl (0,9%).

Os efeitos da urina sobre todas as variáveis do movimento espermático avaliadas, durante a incubação a 37°C por 20 minutos foram significativos a partir de concentrações ≥13% de urina em ringer, onde a osmolaridade esteve próxima dos 500 mOsmol/L, considerados por Songsasen et al. (2002) como o limite de força osmótica em que o sêmen canino apresenta perdas significativas da motilidade.

A centrifugação parece não ter influenciado negativamente a funcionalidade dos espermatozoides contaminados por urina, pois os resultados do movimento espermático avaliados após a centrifugação e refrigeração do sêmen no diluidor Kenney foram superiores ($P < 0,05$) aos encontrados nas amostras de sêmen incubadas nas diferentes soluções de urina, pois a despeito da centrifugação não ter sido maléfica aos espermatozoides de ursos marrons contaminados por urina (GOMES-ALVES et al., 2014; BRASSESCO et al., 1988), somente esta técnica que separa os espermatozoides do meio contaminado com urina não é suficiente para mitigar os efeitos da urina e o diluidor a base de leite, utilizado no presente trabalho, foi suficiente para além de conservar a funcionalidade das células que suportaram até 12,5% de urina, também restabelecer a funcionalidade de células que se encontraram em um ambiente significativamente mais hostil, com 25% de urina.

Conclusões

O sêmen canino diluído em ringer simples e incubado por 20 minutos a 37°C apresentou os mesmos resultados quando comparado ao sêmen diluído em ringer + 13% de urina. Após o processo de refrigeração com o diluidor a base de leite a 5°C por 24h, os espermatozoides que foram previamente incubados em ringer simples + 25% de urina apresentaram os mesmos resultados dos espermatozoides incubado apenas em ringer simples. Assim, é possível afirmar que o sêmen contaminado com soluções de ringer simples com concentrações ≤ 25% de urina e refrigerado com o diluidor Kenney permanecem viáveis por pelo menos 24h.

Agradecimentos

Ao Doutor Osvaldo Almeida Resende pela contribuição na escolha dos testes estatísticos. Ao laboratório de Patologia Clínica da UENF por nos ceder as tiras de urinálise. CNPq pelo auxílio financeiro e FAPERJ pela bolsa de estudos.

Referências

- BEAUFAYS, F.; ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. Retrograde ejaculation occurs in the dog, but can be prevented by pre-treatment with phenylpropanolamine: a urodynamic study. **Theriogenology**, v. 70, n. 7, p. 1057-1064, 2008.
- BRASSESCO, M.; VISCASILLAS, P.; BURREL, L.; CALAF, J.; RAJMIL, O.; SERRA, J. M. P.; FARGAS, F. M. Sperm recuperation and cervical insemination in retrograde ejaculation. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 5, p. 923-925, 1988.
- GOMES-ALVES, S.; ALVARES, M.; NICOLAS, M.; MARTINES-RODRIGUES, C.; BORRAGAN, S.; CHAMORRO, C. A.; PAZ, P. de. Salvaging urospermic ejaculates from brown bear (*Ursus arctos*). **Animal Reproduction Science**, v. 150, n. 3, p. 148-157, 2014.
- GRIGGERS, S.; PACCAMONTI, D. L.; THOMPSON, R. A.; EILTS, B. E. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 613-622, 2001.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p. 1279-1289, 1993.
- MAKLER, A.; DAVID, R.; BLUMENFELD, Z.; BETTER, O. S. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. **Fertility and Sterility**, v. 36, n. 4, p. 507-511, 1981.
- NOTHLING, J. O.; SANTOS, I. P. dos. Which fields under a coverslip should one assess to estimate sperm motility?. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1686-1697, 2012.
- OETTLE, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 257-260, 1992.

SONGSASEN, N.; YU, I.; MURTON, S.; PACCAMONTI, D. L.; EILTS, B. E.; GODKE, R. A.; LEIBO, S. P. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. **Cryobiology**, v. 44, n. 1, p. 79-90, 2002.

SOUZA, N. P.; GUIMARÃES, L. D. A.; PAZ, R. C. Dosagem hormonal e avaliação testicular em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) utilizando diferentes protocolos anestésicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1224-1228, 2011.

Remoção do plasma seminal de ejaculados de touros antes da criopreservação: efeitos sobre a motilidade e cinética espermática

Fernanda Nunes Marqui^{1}, Alicio Martins Júnior², Tatiana Issa Uherara Berton³, Tairini Érica da Cruz¹, Diego Gouvêa de Souza⁴, Eunice Oba¹*

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de determinar os efeitos da remoção do plasma seminal de ejaculados de touros antes do congelamento, com ou sem adição de RedCushion®, durante a centrifugação de sêmen nas características de motilidade e cinética espermática. Foi utilizado o sêmen de quatro touros Nelore. Os ejaculados de cada touro foram diluídos em um tubo cônico (1:2) de 15 mL e depois centrifugados a 700 x g/10 min. Para a centrifugação espermática com RedCushion®, foi adicionado 1 mL de colóide no fundo do tubo de centrifuga. No grupo de controle, o sêmen não foi submetido ao procedimento de centrifugação. Posteriormente, as amostras foram congeladas e descongeladas para avaliar a motilidade e a cinética de esperma através da análise computadorizada (CASA). A remoção do PS através de centrifugação do sêmen bovino na presença ou ausência de RedCushion®, antes do congelamento, não influenciou beneficemente os parâmetros de motilidade e cinética dos espermatozoides.

Palavras-chave: Centrifugação. RedCushion®. CASA.

Seminal plasma removal of bull ejaculates before cryopreservation: effects on motility and sperm motion

Abstract: This study aimed to determine the effects of seminal plasma removal of bull ejaculates before freezing either with or without addition of RedCushion® during the sperm centrifugation on the characteristics of motility and sperm motion. The semen of four Nelore bulls was used. Ejaculates of each bull were diluted in freezing extender (1:2) in 15 mL-centrifuge tubes, and then were centrifuged at 700 x g/10 min. For the sperm centrifugation with RedCushion®, 1 mL of colloid was placed on the bottom of the centrifuge tube. In the control group, semen was not subjected to the centrifugation procedure. Afterwards, the samples were frozen and subsequently thawed for assessment of motility and sperm kinetics through CASA. No beneficial effect of seminal plasma removal was found among groups after cryopreservation, in the presence or absence of Red Cushion®, for all the sperm parameters on evaluated bulls.

Keywords: Centrifugation. RedCushion®. CASA.

Introdução

Embora considerável progresso na eficiência dos protocolos de criopreservação tenha ocorrido desde o primeiro relato de sucesso de congelamento de sêmen bovino (POLGE et al., 1949), a recuperação de espermatozoides competentes pós-descongelamento ainda permanece baixa (HOLT, 2000), gerando impacto negativo sobre as biotécnicas reprodutivas em bovinos, as quais dependem exclusivamente do sêmen congelado.

Apesar de, em bovinos, a centrifugação espermática não ser empregada rotineiramente, a remoção parcial do plasma seminal (PS) de touros, através de centrifugação, incrementou em mais de 40% a viabilidade espermática após congelamento (AKE-LOPEZ et al., 1997). Da mesma forma, efeito benéfico foi observado sobre os parâmetros de motilidade progressiva e cinética (movimento rápido, VSL, VCL e VAP) pós-descongelamento (TANAJURA NETO et al., 2008).

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 18618-970, Botucatu, São Paulo.

² Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, 16050-680, Araçatuba, São Paulo.

³ Central de Congelamento de Sêmen Tairana, 19160-000, Presidente Prudente, São Paulo.

⁴ Master Fertility Reprodução Animal Ltda, 16015-515, Araçatuba, São Paulo.

* fernanda_nunes_37@hotmail.com

Além disso, a utilização de coloide denso (“cushion”) no fundo do tubo de centrifugação, como o iodixanol, é sugerida, permitindo assim maior recuperação espermática com reduzido ou nenhum efeito deletério sobre a motilidade e viabilidade (WAITE et al., 2008). Saragusty et al. (2009) relataram, ainda, possível efeito crioprotetor do iodixanol, uma vez que promoveu a recuperação de espermatozoides com maior motilidade e integridade de membrana pós-descongelamento.

Com base no exposto, hipotetizamos que a remoção do PS bovino e a utilização de RedCushion® (Botupharma, Botucatu, Brasil), sem descrição na literatura para a preparação de sêmen bovino antes do congelamento, pode proporcionar a obtenção de amostras espermáticas com características cinéticas superiores.

Assim, este estudo teve como objetivo verificar os efeitos da remoção do PS de ejaculados de touros submetidos à centrifugação, com ou sem a adição de RedCushion®, antes do congelamento, sobre as características de motilidade e cinética espermática.

Material e Métodos

Foram utilizados quatro touros da raça Nelore, com idades entre 24 e 38 meses, mantidos em regime de coleta de sêmen na Central de Congelamento de Sêmen Tairana (Presidente Prudente, SP).

Os ejaculados, quatro de cada animal, foram obtidos através de vagina artificial e analisados individualmente quanto à motilidade (M), vigor (V) e morfologia (analisando 200 células) em microscópio com contraste de fase (Carl Zeiss, Alemanha) e concentração espermática (C) através de espectrofotômetro (IMV, Accucell, França). Somente amostras com $M \geq 60\%$, $V \geq 3$, $C \geq 700 \times 10^3$ e espermatozoides normais $\geq 70\%$ (sendo no máximo 30% de defeitos totais e 10% de defeitos maiores) foram utilizadas no experimento.

Após a coleta, cada ejaculado foi dividido igualmente em três grupos. No grupo controle (CO) foi realizado o congelamento convencional do sêmen (sem centrifugação) após diluição (50×10^6 espermatozoides/mL) em meio de congelamento base (MCB – TRIS, frutose, ácido cítrico, gema e antibióticos) adicionado de 7% de glicerol. No grupo com centrifugação tradicional (CT; sem RedCushion®), a amostra de sêmen de cada touro foi diluída em tubo cônico de 15 mL, na concentração de 1 bilhão de espermatozoides, na proporção de 1:2 de sêmen e MCB, sendo, em seguida, centrifugada a $700 \times g/10$ min (TANAJURA NETO et al., 2008). Para o grupo centrifugação com adição de RedCushion® (CC) o sêmen foi diluído e centrifugado como descrito para o grupo CT, porém foi adicionado 1 mL de RedCushion® no fundo do tubo. Após a centrifugação, o sobrenadante e o RedCushion® foram retirados e o “pellet” contendo os espermatozoides diluído em MCB + glicerol na mesma concentração do grupo controle.

Imediatamente após o processamento do sêmen, as amostras foram refrigeradas por 5 horas em câmara fria a 5 °C, envasadas em palhetas de 0,5 mL (MRS1, IMV, França) e pré-congeladas em congelador programável (Digitcool, IMV, França) por 8 minutos, quando foram então mergulhadas em nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão isotérmico.

Para as análises de motilidade e cinética espermática, as palhetas de sêmen (duas/colheita/grupo) foram descongeladas em água a 37 °C/ 30s e avaliadas através de análise computadorizada (CASA; microscópio Eclipse E200 [Nikon, Japão], câmera Basler [Alemanha] e software MMC Sperm [São Petersburgo, Rússia]). Foram determinados os parâmetros: motilidade total (MT; %) e progressiva (MP; %), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade média de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), bem como amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH; μm), batimento flagelar (BCF; Hz), linearidade (LIN; %) e progressividade (STR; %).

Os resultados foram analisados através do emprego de ANOVA para avaliar diferenças estatísticas, sendo as médias comparadas através do teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como significativos.

Resultados e Discussão

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos controle e aqueles submetidos à centrifugação e remoção do PS, com ou sem o emprego de RedCushion®, para os parâmetros de motilidade e cinética espermática, a partir dos ejaculados dos touros utilizados no presente experimento (Tabela 1). No entanto, apesar de não observada em nosso estudo, redução da motilidade espermática pós-descongelamento era esperada no grupo controle (TANAJURA NETO et al., 2008), uma vez que a presença de PS durante o congelamento resulta em efeitos deletérios sobre o espermatozoide (MARTINUS et al., 1991). Assim como a remoção do plasma, devido a sua própria viscosidade, deveria contribuir para um aumento significativo nos valores de VAP, VSL (TANAJURA NETO et al., 2008; CAMPANHOLI et

al., 2017), VCL e rapidez (TANAJURA NETO et al., 2008). Em bovinos, os parâmetros de VAP, VSL, BCF, STR e LIN possuem alta correlação com a fertilidade *in vivo* (FARRELL et al., 1998) e *in vitro* (CAMPANHOLI et al., 2017).

Embora fosse esperado efeito benéfico do RedCushion® sobre a qualidade espermática, como observado em equinos, em que a centrifugação do sêmen utilizando iodixanol como “cushion” resultou em maior motilidade total e VCL (BLISS et al., 2012), nossos resultados corroboram com aqueles de Mari et al. (2015), os quais não observaram diferença nos parâmetros de movimento e cinética pós-descongelamento no sêmen equino centrifugado com iodixanol.

Tabela 1. Parâmetros de motilidade e cinética espermática pós-descongelamento de para os grupos controle (CO), com centrifugação tradicional (CT) e centrifugação com adição de RedCushion® (CC).

Variável	CO	CT	CC
	Média (± DP)	Média (± DP)	Média (± DP)
MT (%)	72,0 ± 11,7	70,8 ± 5,8	68,6 ± 6,5
MP (%)	36,6 ± 5,2	41,1 ± 5,5	41,4 ± 7,3
VCL (µm/s)	148,5 ± 21,7	132,2 ± 20,9	142,1 ± 32,2
VSL (µm/s)	65,8 ± 12,5	60,3 ± 12,1	64,1 ± 15,6
VAP (µm/s)	96,6 ± 17,0	86,2 ± 17,8	91,6 ± 22,5
ALH (µm)	2,0 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,3
BCF (Hz)	5,7 ± 0,5	5,7 ± 0,4	5,7 ± 0,4
LIN (%)	0,4 ± 0,04	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,04
STR (%)	0,7 ± 0,04	0,7 ± 0,02	0,7 ± 0,03

Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

A remoção do PS através de centrifugação do sêmen bovino na presença ou ausência de RedCushion®, antes do congelamento, não influenciou beneficemente os parâmetros de motilidade e cinética dos espermatozoides.

Agradecimentos

A CAPES, FAPESP (Processo nº 2015/20986-3), Central de Congelamento de Sêmen Tairana, Master Fertility Reprodução Animal Ltda.

Referências

- AKE-LOPEZ, R.; SANCHEZ-ENCALADA, W.; MERIDA, A. de Y. Efecto de la remoción parcial del plasma seminal sobre la congelabilidad del semen bovino. **Revista Biomedica**, v. 8, n. 1, p. 21-26, 1997.
- BLISS, S. B.; VOGEL, J. L.; HAYDEN, S. S.; TEAGUE, S. R.; BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1232-1239, 2012.
- CAMPANHOLI, S. P.; MONTEIRO, F. M.; DIAS, E. A. R.; MERCADANTE, M. E. Z.; PAZ, C. C. P. de; DELLAQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; DELAQUA, C. P. F.; VANTINI, R.; GARCIA, J. M. Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and *in vitro* fertility. **Theriogenology**, v. 89, p. 114-121, 2017.
- FARRELL, P. B.; PRESICCE, G. A.; BROCKETT, C. C.; FOOTE, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 871-879, 1998.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1, p. 3-22, 2000.
- MARI, G.; BUCCI, D.; LOVE, C. C.; MISLEI, B.; RIZZATO, G.; GIARRETA, E.; MERLO, B.; SPINACI, M. Effect of cushioned or single layer semen centrifugation before sex sorting on frozen stallion semen quality. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 953-958, 2015.

MARTINUS, R. D.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Deleterious effect of seminal plasma in the cryo-preservation of bovine spermatozoa. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 34, n. 3, p. 281-285, 1991.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKERS, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666, 1949, 1949.

SARAGUSTY, J.; GACITUA, H.; ROZENBOIM, I.; ARAV, A. Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1425-1432, 2009.

TANAJURA NETO, J. A.; CALEGARI, R. S.; CRESPILO, A. M.; SILVA, C.; MARTINS JUNIOR, A. Effects of centrifugation and removal of seminal plasma on post-thaw motility of bull spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 188, 2008.

WAITE, J. A.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; TEAGUE, S. R.; SALAZAR JUNIOR, J. L.; MANCILL, S. S.; VARNER, D. D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. **Theriogenology**, v. 70, n. 4, p. 704-714, 2008.

Temperaturas de superfície escrotal avaliadas por termografia de infravermelho e qualidade seminal de touros bubalinos em condições de clima tropical úmido

Lílian Kátia Ximenes Silva¹, Daniel Vale Barros¹, José de Brito Lourenço Junior¹, Aluizio Otávio Almeida da Silva¹, José Silva de Sousa¹, Cristian Fatur², Messy Hannear de Andrade Pantoja¹, Daniela Botta¹, Alexandre Rossetto Garcia^{3*}

Resumo: Os búfalos podem demonstrar estresse térmico e falta de eficiência reprodutiva se submetidos a altas temperaturas ambientais. Assim, o objetivo foi avaliar as temperaturas da superfície escrotal e a qualidade do sêmen dos búfalos criados em condições climáticas tropicais úmidas. O ensaio compreendeu o período mais chuvoso (abril e maio), período de transição (junho a agosto) e menor período de chuva (setembro a dezembro). Foram utilizados 11 búfalos como doadores de sêmen. Os touros foram submetidos mensalmente à avaliação da frequência respiratória (FR, respirações / min), frequência cardíaca (FC, batimentos / min), temperatura retal (TR, °C) e temperaturas da superfície escrotal (TSE, °C). Todas as amostras de sêmen de 15 dias foram coletadas usando vagina artificial. O índice de temperatura e umidade (ITU) e o índice de conforto de Benezra (ICB) foram calculados. ITU, ICB e TR não apresentaram diferença significativa. FR e FC permaneceram maiores durante o período de transição e à tarde. Foi observada maior temperatura do funículo espermático (TFE) e do polo testicular dorsal (TPTD) no período menos chuvoso. Não houve diferença entre os períodos observados para temperatura escrotal máxima (TEMax), média (TEMed) e mínima (TEMin), temperatura do polo testicular ventral (TPTV) e temperatura da cauda do epidídimo (TCE). Apesar do desafio térmico observado no ensaio, os touros bubalinos mostraram normalidade nos termogramas, caracterizados por gradientes positivos de temperatura, e conseguiram manter padrões normais de qualidade seminal durante as estações climáticas.

Palavras-chave: Andrologia animal. Análises termográficas. *Bubalus bubalis*. Sêmen. Estresse térmico. Amazônia.

Scrotal surface temperatures assessed by infrared thermography and semen quality of buffaloes bulls under humid tropical climate conditions

Abstract: Buffaloes can demonstrate thermal stress and lacks on reproductive efficiency if submitted to high environmental temperatures. Thus, the objective was to evaluate the scrotal surface temperatures and semen quality of buffaloes raised on humid tropical climate conditions. The essay comprised the rainiest period (April and May), transitional period (June to August) and less rainy period (September to December). Eleven buffaloes were used as semen donors. Bulls were monthly submitted to evaluation of respiratory rate (RR, breaths/min), heart rate (HR, beats/min), rectal temperature (RT, °C) and scrotal surface temperatures (TSE, °C). Every 15 days semen samples were collected using artificial vagina. The Temperature and Humidity Index (THI) and the Benezra's Thermal Comfort Index (BTCI) were calculated. THI, BTCI and RT did not present significant difference. RR and HR remained higher during the transitional period and in the afternoon. It was observed a higher temperature of the spermatic cord (SCT) and distal pole testicular temperature (DPT) in the less rainy period. There was no difference between the periods regarding the maximum (TEMax), average (TEMed) and minimum (TEMin) scrotal temperatures, proximal testicular pole temperature (PPT) and epididymal tail temperature (ETT). Despite the thermal challenge observed throughout the essay, buffalo bulls showed normal thermograms, characterized by positive temperature gradients, and were able to maintain normal patterns of seminal quality throughout the climatic seasons.

Keywords: Animal andrology. Thermographic analyses. *Bubalus bubalis*. Semen. Thermal stress. Amazonia.

¹ Universidade Federal do Pará, 68746-360, Castanhal, Pará.

² Universidade Federal Rural da Amazônia, 66077-830, Belém, Pará.

³ Embrapa Pecuária Sudeste, Caixa Postal 339, 13560-970, São Carlos, São Paulo.

*(alexandre.garcia@embrapa.br)

Introdução

A qualidade seminal de touros bubalinos pode ser negativamente influenciada por elevada temperatura e umidade relativa do ar, que são fatores que reduzem seu conforto térmico (SANTOS et al., 2014). Inicialmente, o estresse calórico causa sudorese e vasodilatação periférica, a qual resulta em queda da pressão arterial, compensada pelo aumento da frequência cardíaca (FC) e posterior elevação da frequência respiratória (FR) (MARAI; HAEEB, 2010). Nos mamíferos, esse estresse afeta as temperaturas de superfície escrotal (TSE), principalmente nas espécies que possuem os testículos localizados fora da cavidade abdominal, causando a deterioração da qualidade do sêmen (GABALDI; WOLF, 2002; KASTELIC; BRITO, 2012). A TSE mensurada pela termografia infravermelha constitui método rápido, preciso e não invasivo, que auxilia na avaliação andrológica (KASTELIC, 2014; MENEGASSI et al., 2015). A TSE sofre redução a partir do polo testicular dorsal, originando o gradiente de temperatura testicular, o qual indica a diferença entre a temperatura dos polos dorsal e ventral dos testículos (COULTER et al., 1988; KASTELIC et al., 1995). Em bovinos, a qualidade seminal apresenta correlação negativa com TSE e positiva com o gradiente de temperatura testicular (BERRY et al., 2011). Por isso, este estudo objetivou avaliar as condições de conforto térmico de touros bubalinos criados em ambiente tropical úmido, com especial atenção aos efeitos nas temperaturas de superfície escrotal e possíveis impactos na qualidade seminal.

Material e Métodos

O estudo foi realizado em região de clima tropical quente e úmido (Afi de Köppen) (ALVARES et al., 2013), no município de Castanhal, Estado do Pará, na Amazônia Brasileira. Com base nas condições meteorológicas, o experimento compreendeu os períodos mais chuvoso (abril e maio), de transição (junho a agosto) e menos chuvoso (setembro a dezembro) do ano. Onze touros bubalinos da raça Murrah, adultos e clinicamente saudáveis (55±9 meses; 701,4±82,8 kg) foram submetidos mensalmente à avaliação de frequência respiratória (FR; mov/min), frequência cardíaca (FC; bat/min), temperatura retal (TR; °C) e temperaturas de superfície escrotal (TSE; °C), nos turnos da manhã e tarde. Para a aferição da TSE foi utilizada câmera infravermelha (FLIR Série A320, FLIR Systems, Wilsonville, OR, EUA) acoplada a um monitor de tela plana para visualização das imagens. Os termogramas obtidos foram analisados com o programa Flir Tools + Versão 3.0 (FLIR Systems, Inc., Wilsonville, OR, EUA). A cada 15 dias foram realizadas colheitas de sêmen pelo método da vagina artificial. Foram coletados 16 ejaculados de cada animal, totalizando 176 ejaculados. Após a colheita, o sêmen foi submetido à análise de volume (VOL; mL), concentração espermática (CONC; x10⁹/mL) e motilidade espermática progressiva (MP; %) (VALE, 2002). Na sequência, foi avaliada a morfologia espermática, adotando-se o critério de classificação em defeitos maiores (DMA; %), defeitos menores (DME; %) e defeitos totais (DT; %) (BLOM, 1973). A integridade de membrana plasmática (IMP; %) foi avaliada pela técnica de eosina-nigrosina (IQBAL et al., 2010). Durante o experimento foram calculados, o Índice de Temperatura e Umidade (ITU) e o Índice de Conforto de Benezra (ICB) dos animais. Os dados foram submetidos à análise estatística com uso do software SAS. Os dados passaram por teste de normalidade, seguido de análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey. As correlações lineares de interesse foram calculadas pelo método de Pearson. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão

O ITU e o ICB não apresentaram diferenças significativas entre períodos. Entretanto, o ITU apontou situação de maior desafio térmico ao longo das tardes, quando seus valores foram superiores a 79, caracterizando condição de alto potencial de estresse calórico aos animais (SOMPARN et al., 2004). O ICB médio variou de 1,9 a 2,1 e este resultado permite pressupor que os touros bubalinos apresentaram alta resiliência ao clima local, uma vez que valores próximos a 2,0 indicam maior adaptabilidade do animal à condição térmica tropical. A FR apresentou incremento no turno da tarde, principalmente nos períodos de transição e menos chuvoso. A FC foi mais elevada no período de transição e à tarde. Estes resultados sugerem que o período de transição pode ser considerado o mais desafiador para os animais (SILVA et al., 2011), devido às altas temperatura e umidade relativa do ar, diminuição gradativa da nebulosidade e aumento paulatino da intensidade da radiação solar, conforme se aproxima o verão amazônico. A TR não sofreu alteração, corroborando o efeito observado no ICB e indicando que os animais foram eficientes na realização da termólise. Foi observada maior temperatura do funículo espermático (TFE) e do polo testicular dorsal (TPTD) no período menos chuvoso, o que provavelmente relaciona-se com a maior radiação solar direta sobre os animais e alta temperatura ambiente observada nesse período (MORAES et al., 2005). Não foram observadas diferenças significativas nas temperaturas escrotal máxima (TEMax), média (TEMed) e mínima (TEMin), temperatura do polo testicular ventral

(TPTV) e temperatura da cauda do epidídimo (TCE), entre períodos. Como esperado, no turno da tarde foram registrados maiores valores de TEMax, TEMed e TEMin. Os valores mais elevados de TFE e TPTD em relação às demais estruturas escrotais podem estar diretamente relacionadas à maior proximidade anatômica destas estruturas à cavidade abdominal (KASTELIC et al., 1995). O gradiente de temperatura testicular (GTEST = TPTD - TPTV) mostrou-se positivo variando entre 1,4 °C a 1,9 °C e próximo ao valor observado em bovinos portadores de termogramas considerados normais (1,6 °C) (KASTELIC et al., 1995). Relatos prévios indicam que o GTEST se relaciona diretamente com motilidade progressiva e reserva espermática epididimária (BERRY et al., 2011) e inversamente com a temperatura ambiente (KASTELIC, 2014). Contudo, no presente ensaio não foram observadas alterações nas variáveis seminais durante os períodos, sendo que as médias dos parâmetros seminais se encontram dentro das faixas consideradas normais para sêmen in natura de bubalinos (CBRA, 2013). A TCE e TEMin apresentaram correlações negativas com MP e IMP, indicando que podem ser variáveis auxiliares na avaliação da potencial fertilidade de touros bubalinos. A TFE foi influenciada pelo ITU e apresentou correlações de média intensidade com TR, VOL e CONC. O ITU e ICB influenciaram igualmente a TCE, a qual apresentou correlação de média intensidade e positiva com TR, além de apresentar correlação negativa com VOL, MP e IMP. As TEMed, TEMin, TEMax, apresentam correlações positivas com TR. A TEMed apresentou correlação negativa de média intensidade com MOT. A TEMin apresentou correlação negativa de média intensidade com VOL, MOT e IMP, enquanto a TEMax apresentou correlação positiva com CONC. Como esperado, a TEMed apresentou correlação negativa com IMP e positiva com DT, demonstrando que realmente a elevação na temperatura escrotal pode determinar deterioração na qualidade seminal (BERRY et al., 2011).

Conclusões

Os indicadores de adaptabilidade ao ambiente térmico tropical e as variáveis fisiológicas relacionada à termólise demonstraram que os animais foram capazes de dissipar eficientemente calor corpóreo e manter-se em condição de conforto térmico. O perfil de temperaturas de superfície escrotal nos diferentes períodos apontou normalidade nos termogramas, com temperaturas decrescentes do funículo espermático à cauda do epidídimo. Os gradientes positivos de temperatura foram associados à manutenção da normalidade na qualidade seminal. Por fim, foi constatado que TCE e TEMin são variáveis que podem auxiliar na avaliação da potencial fertilidade de touros bubalinos.

Agradecimentos

A Embrapa Pantanal forneceu apoio logístico e financeiro (Projetos SEG 02.07.50.003-02 e SEG 02.10.06.007.00.03); o Ministério de Ciência e Tecnologia-MCT e Centro de Pesquisa do Pantanal-CPP forneceram parte dos recursos financeiros (Projeto 2004/PPP/0008); a CAPES concedeu bolsa de pós-graduação a A.P. Nunes (processo no. 1028330); os proprietários das fazendas Alegria (Dr. Heitor Herrera) e Santo Expedito (Sr. Alfredo Marques Machado) permitiram a condução dos trabalhos de campo em suas propriedades.

Referências

- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- BERRY, D. P.; EVANS, R. D.; MC PARLAND, S. Evaluation of bull fertility in dairy and beef cattle using cow field data. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 172-181, 2011.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram (author's transl). **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 25, n. 7, p. 383-391, 1972.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. Belo Horizonte, MG: CBRA, 2013. 104 p.
- COULTER, G. H.; SINGER, P. L.; BAILEY, D. R. C. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, n. 2, p. 417-423, 1988.
- GABALDI, S. H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências Agrárias e da Saúde**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2002.

IQBAL, M.; ALEEM, M.; IJAZ, A.; IQBAL, M.; ALEEM, M.; REHMAN, H.; YOUSAF, M. S. Assessment of buffalo semen with the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide reduction assay. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 3, p. 922-925, 2010.

KASTELIC, J. P. Understanding and evaluating bovine testes. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 18-23, 2014.

KASTELIC, J. P.; BRITO, L. F. C. Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 3, p. 45-51, 2012.

KASTELIC, J. P.; COULTER, G. H.; COOK, R. B. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. **Theriogenology**, v. 44, n. 1, p. 147-152, 1995.

MARAI, I. F. M.; HAEED, A. A. M. Buffalo's biological functions as affected by heat stress: a review. **Livestock Science**, v. 127, n. 2, p. 89-109, 2010.

MENEGASSI, S. R. O.; BARCELLOS, J. O. J.; DIAS, E. A.; KOETZ JUNIOR, C.; PEREIRA, G. R.; PERIPOLLI, V.; MACMANUS, C.; CANOZZI, N. E. A.; LOPES, F. G. Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in Braford bulls. **International Journal of Biometeorology**, v. 59, n. 3, p. 357-364, 2015.

MORAES, B. C de; COSTA, J. M. R. da; COSTA, A. C. L. da; COSTA, M. H. Variação espacial e temporal da precipitação no estado do Pará. **Acta Amazonica**, v. 35, n. 2, p. 207-214, 2005.

SANTOS, A. X.; KAHWAGE, P. R.; FATURI, C.; QUINZEIRO NETO, T.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; JOELE, M. R. S. P.; GARCIA, A. R. Feed supplementation with palm kernel cake-based concentrate increases the quality of water buffalo semen. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 2, p. 85-95, 2014.

SILVA, J. A. R.; ARAUJO, A. A.; LOURENÇO JUNIOR, J. de B.; VIANA, R. B.; SANTOS, N. de F. A.; GARCIA, A. R. Perfil hematológico de búfalas da raça Murrah, criadas ao sol e à sombra, em clima tropical da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 425-430, 2011.

SOMPARN, P.; GIBB, M. J.; MARKVICHITR, K.; CHAIYABUTR, N.; THUMMABOOD, S.; VAJRABUKKA, C. Analysis of climatic risk for cattle and buffalo production in northeast Thailand. **International Journal of Biometeorology**, v. 49, n. 1, p. 59-64, 2004.

VALE, W. G. Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1., 2002, Belém, PA. **Proceedings**... Belém, PA: APCB, 2002. p. 156-171.

Tempo máximo de conservação de espermatozoides bovinos do epidídimo mantidos à temperatura de 5°C

Érika Talamonte Gonçalves Sousa¹, Matheus de Medeiros Rabelo¹, Carlos Frederico Martins², Carolina Gonzales da Silva^{1*}

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de avaliar por quanto tempo é possível obter espermatozoides viáveis do epidídimo refrigerados a 5°C. Para isso, foram coletados pares do complexo de testículo-epidídimo (CTE) em abatedouros, e os espermatozoides foram coletados e avaliados em estado fresco e após refrigeração. Foi possível obter espermatozoides vivos e viáveis de CTE submetidos até 11 dias de refrigeração e, no quarto dia, observou-se uma diminuição significativa da motilidade em comparação com os espermatozoides frescos. Embora a motilidade e o vigor diminuíssem com o resfriamento, a porcentagem de espermatozoides com membrana intacta não caiu significativamente. Os defeitos da cauda do espermatozoide aumentaram, significativamente, após o resfriamento, bem como as patologias totais. Assim, é possível afirmar que os espermatozoides bovinos mantidos refrigerados por até três dias a 5°C, nos epidídimos, não sofreram alterações significativas na sua motilidade.

Palavras-chave: Biotecnologia. Conservação. Refrigeração.

Maximum time of preservation bovine spermatozoa in the epididymides kept at 5°C

Abstract: The objective of this study was to evaluate for how long it is possible to obtain viable spermatozoa from epididymis cooled to 5°C. For this, pairs of epididymis testis complexes (ETC) were collected at slaughterhouses, and spermatozoa were collected and evaluated in fresh state, and after refrigeration. It was possible to obtain live and viable spermatozoa from ETC submitted to up to 11 days of refrigeration, and in the fourth day a significant decrease in motility was observed in comparison to the fresh spermatozoa. Although motility and vigor decreased with cooling, the percentage of spermatozoa with intact membrane did not fall significantly. Spermatozoon tail disorders increased significantly after cooling, as well as total pathologies. Thus, it is possible to affirm that bovine spermatozoa kept refrigerated for up to three days at 5°C in the epididymides do not suffer significant alteration in their motility.

Keywords: Biotechnology. Conservation. Refrigeration.

Introdução

A recuperação de espermatozoides obtidos do epidídimo bovino é uma alternativa viável para formação de um banco de germoplasma de animais mortos ou com alguma característica que impeça a obtenção do ejaculado, como ocorre nas espécies caprina e equina, nas quais existe um efeito deletério causado pela presença do plasma seminal no momento do congelamento do sêmen (SILVA et al., 2006). Desta maneira, acredita-se que garanhões subfêrteis e infêrteis também podem beneficiar-se da técnica de recuperação espermática do epidídimo (MONTEIRO et al., 2011), visto que os espermatozoides não têm contato com as secreções das glândulas anexas, e, portanto, não haverá o efeito deletério se esses espermatozoides forem criopreservados. Além disso, a utilização de espermatozoides obtidos do epidídimo é uma ferramenta importante na reprodução assistida (ALMEIDA, 2013), pois podem ser usados em diversas técnicas de biotecnologia da reprodução (ROLDAN; GOMENDIO, 2009). O nascimento de bezerros vivos e saudáveis provenientes de espermatozoides recuperados do epidídimo, refrigerados e criopreservados comprova a viabilidade da célula espermática e o sucesso da técnica (COSTA et al., 2011). Sendo assim, eventualmente, pode-se querer utilizar os espermatozoides de um bovino perante algum imprevisto que impossibilite a ejaculação, como óbito prematuro do reprodutor. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi verificar o tempo máximo de sobrevivência de espermatozoides bovinos recolhidos de epidídimo refrigerados a 5°C, como uma possibilidade de prolongar a utilização do material genético de um animal.

¹ Centro Universitário de Desenvolvimento do Centro-Oeste, 72800-000, Luziânia, Goiás.

² Embrapa Cerrados, Caixa Postal 08223, 73310-970, Planaltina, Distrito Federal

* carolina.silva@professor.unidesc.edu.br

Material e Métodos

O experimento foi realizado nas instalações do Centro de Tecnologias em Raças Zebuínas Leiteiras (CTZL), uma unidade experimental da Embrapa Cerrados.

A coleta do complexo testículo-epidídimo (CTE) foi realizada em abatedouro-frigorífico logo após a insensibilização, sangria e processamento da carcaça. Quarenta e quatro CTE foram coletados e avaliados em onze dias consecutivos de experimento, sendo quatro CTE por dia, caracterizando quatro repetições por dia. Os CTE foram transportados em aproximadamente uma hora até o laboratório em caixa de isopor com gelo. No laboratório um CTE à fresco de cada animal foi submetido a coleta de espermatozoides do epidídimo no dia da coleta e outro foi submetido a refrigeração a 5°C para avaliação posterior, constituindo assim um par de cada animal. Foram coletados os espermatozoides da região da cauda do epidídimo, de acordo com o descrito por Costa et al. (2011), que sugere várias incisões na cauda e pressão manual para liberação dos espermatozoides. O material coletado foi condicionado em microtubos cônicos com capacidade de 0,6mL (Eppendorf®) com 400µL de BotuBov®. As células recuperadas passaram por avaliação de motilidade (%), e vigor (0-5), em microscópio de contraste de fase (Nikon®). Posteriormente, os espermatozoides já diluídos foram corados com eosina e nigrosina na proporção 1:1 e incubados por 5 minutos, quando então confeccionou-se o esfregaço para avaliação de integridade de membrana plasmática. Foi realizada uma contagem de 100 espermatozoides em microscópio comum em aumento de 1000 vezes de forma a diferenciar as células vivas (não coradas) das mortas (coradas em rosa). A avaliação patológica foi realizada a partir da diluição dos espermatozoides em 400 µL de formol a 5% para avaliação em objetivas de 100x em microscópio de contraste de fase. As patologias foram classificadas em defeitos de cabeça, peça intermediária, cauda e totais. A contagem de alterações morfológicas foi realizada em 100 células, contando-se células normais e avaliando um defeito por célula anormal. Para comparação entre médias foram realizadas análise de variância (ANOVA) e o teste T a um nível de significância de 5% (P<0,05), por meio do programa estatístico Systat®.

Resultados e Discussão

Este estudo comprova ser possível isolar espermatozoides móveis provenientes da cauda do epidídimo sob refrigeração por até 11 dias quando foi observado que não havia motilidade dos espermatozoides obtidos de uma das quatro amostras. Não foram encontrados estudos, em base de dados nacionais, que realizassem a recuperação dos espermatozoides do epidídimo após refrigeração por tempo tão prolongado (11 dias). Os resultados de motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática antes e após refrigeração, do dia um até o dia 11 (tratamentos), além dos resultados da queda de motilidade ao longo dos dias (diferença) estão expressos na (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados das avaliações de motilidade (MOT), vigor (VIG) e integridade de membrana plasmática (IMP) em espermatozoides de epidídimos bovinos colhidos a fresco (FR) e refrigerados a 5°C e a diferença (DIF) entre as avaliações durante os dias de refrigeração (tempos de tratamento – T). Nas colunas, letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05).

DIA	MOT FR (%)	MOT 5°C (%)	MOT DIF	VIG FR	VIG 5°C	VIG DIF	IMP FR	IMP 5°C	IMP DIF
T1	56,66±25,16	43,33±20,81	13±5,77	4	2	2	76,33±17,22	64,33±19,23	12±18,19
T2	61,66±18,93	45,00±16,43	15±5,00	3,33	2	1,33	83,50±4,27	76,16±2,25	7,33±3,61
T3	56,66±25,10	48,33±19,40	3±5,77	3	1,66	1,34	80,66±3,68	67,00±9,98	13,67±6,35
T4	80,00±10,00 ^a	50,00±10,00 ^b	30±20,00	3,33	2	1,33	75,50±7,00	64,66±13,71	12,83±10,75
T5	65,00±19,14 ^a	40,00±8,16 ^b	25±20,81	2,75	2	0,75	85,37±5,26	73,62±9,38	11,75±4,92
T6	60,00±26,45 ^a	23,33±5,77 ^b	37±25,16	2,66	1,66	1,0	88,66±2,56	57,16±19,93	31,50±22,35
T7	60,00±16,33 ^a	30,00±18,25 ^b	30±14,14	3,25	2,25	1,00	67,62±21,04	44,00±24,50	23,63±18,86
T8	53,33±11,54	23,33±15,27	30±26,45	3	2,33	0,67	59,00±13,89	53,16±17,82	5,83±5,00
T9	47,50±9,54 ^a	4,75±3,86 ^b	43±8,26	3	1,25	1,75	64,00±4,91 ^a	42,75±14,71 ^b	21,25±13,14
T10	43,33±5,77 ^a	6,66±5,77 ^b	37±5,77	3	1,33	1,67	53,16±17,01	32,83±12,89	20,33±9,60
T11	58,33±10,40 ^a	8,66±7,09 ^b	50±8,26	3	1,66	1,34	59,19±19,28	34,33±14,83	24,67±6,25

Fonte: Elaborado pelos autores.

Mesmo havendo uma queda de motilidade significativa e progressiva a partir de quatro dias de refrigeração, os valores de viabilidade espermática, acessada por meio dos corantes eosina e nigrosina, apresentaram quedas que não foram significativas estatisticamente, com exceção da avaliação com nove dias de refrigeração. Esses resultados confirmam a afirmação de Fernandez-Santos et al. (2009) que citam que a cauda do epidídimo fornece um ambiente para estocar gametas em situações fisiológicas e, assim, pode prolongar a sobrevivência espermática. Além disso, Yu e Leibo (2002) ainda descrevem que a refrigeração do epidídimo minimiza os efeitos deletérios sobre os espermatozoides sendo que temperaturas mais baixas retardam o processo de degeneração e diminuem o seu metabolismo, mantendo-os viáveis por maior período de tempo (GRANEMANN, 2006). Ao retirar o valor médio da motilidade ao longo dos dias, observa-se que até cinco dias refrigerados, os espermatozoides mantiveram um valor de, aproximadamente, 45%, que poderia ser utilizado na fertilização *in vitro* (FIV) e até mesmo na inseminação artificial com alguma preparação para incrementar a quantidade de células. O vigor espermático também apresentou queda quando os CTE foram mantidos refrigerados, entretanto essa queda não foi progressiva, pois com 11 dias de refrigeração o vigor decaiu da mesma forma que o tratamento com três dias (1,34). Finalmente, foi observado um aumento significativo de espermatozoides patológicos quando estes foram refrigerados ($78,00 \pm 14,98\%$) comparados aos colhidos a fresco ($54,44 \pm 27,11\%$), sendo que foram as patologias de cauda que aumentaram significativamente com a refrigeração ($9,19 \pm 7,18\%$ fresco; $24,58 \pm 15,74\%$ refrigerado). Já as patologias de cabeça ($6,97 \pm 6,01\%$ fresco; $9,66 \pm 6,54\%$ refrigerado) e peça intermediária ($39,27 \pm 25,53\%$ fresco; $43,75 \pm 12,46\%$ refrigerado) não sofreram variação estatisticamente significativa. Costa et al. (2011) cita que a principal anormalidade encontrada em espermatozoides epididimários foi a gota citoplasmática distal, exatamente como neste experimento, onde foi possível observar grandes quantidades desta patologia no material avaliado. Segundo os autores, alterações de cauda (que aumentaram significativamente sob refrigeração) e a presença de gotas na peça intermediária refletem a imaturidade do material recuperado diretamente do epidídimo.

Conclusões

O experimento mostrou que em caso de morte prematura do reprodutor é possível fazer coleta post mortem de espermatozoides do epidídimo para formação de banco de germoplasma deste reprodutor, permitindo sua utilização posterior em programas de inseminação artificial. Para isso é necessário manter o CTE refrigerado a 5°C, temperatura na qual foi possível preservar espermatozoides com viabilidade semelhante aos espermatozoides frescos por até três dias.

Agradecimentos

A Embrapa.

Referências

- ALMEIDA, F. C. **Estudo in vitro da fertilidade de espermatozoides criopreservados obtidos na cauda do epidídimo de touros**. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns.
- COSTA, P. de M.; MARTINS, C. F.; FRANCO, V. O.; REZENDE, L. O. F.; SERENO, J. R. B.; CAMPOS, H. C. F. Nascimento de bezerros normais após inseminação artificial utilizando espermatozoides criopreservados obtidos de epidídimos refrigerados de bovinos após a morte. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 869-874, 2011.
- FERNANDEZ-SANTOS, M. R.; MARTINEZ-PASTOR, F.; MATIAS, D.; DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A. E.; ESTESO, M. C.; MONTORO, V.; GARDE, J. J. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 1, p. 93-104, 2009.
- GRANEMANN, L. C. **Avaliação comparativa do semen eqüino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia**. 2006. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O.; GUAISTI, P. N.; FREITAS, N. P. P.; MELO, C. M.; AVANZI, B. R.; VELLOSO, N. M.; DELLAQUA JUNIOR, J. A. Fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 2, p. 255-263, 2011.
- ROLDAN, E. R. S.; GOMENDIO, M. Sperm and conservation. In: BIRKHEAD T. R.; HOSKEN, D.J.; PITNICK, S. **Biology of sperm: an evolutionary perspective**. London: Academic Press, 2009. p. 539-564.

SILVA, A. F. da; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, F. A.; TORRES, C. A. A.; HASS, G. T. S.; NASCIMENTO, V. A. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 452-456, 2006.

YU, I.; LEIBO, S. P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1179-1190, 2002.

Utilização na IATF de sêmen congelado com incidência alta de patologias espermáticas com taxa satisfatória de concepção: relato de caso

Juliana Corrêa Borges Silva¹, José Roberto Potiens², Márcio Ribeiro Silva³, Eriklis Nogueira¹, Luiz Orcirio Fialho de Oliveira¹, Urbano Gomes Pinto de Abreu¹, Walvowitis Rodrigues¹, Deiler Sampaio Costa⁴

Resumo: A comercialização de sêmen congelado requer padrões de qualidade que, embora não sejam definidos pelo MAPA, seguem critérios CBRA (2013). Sabe-se que muitos touros têm este padrão e, portanto, são comercializados legalmente, podendo não ter uma taxa de prenhez satisfatória. Por outro lado, também há casos de touros que não cumprem as recomendações (especialmente as patologias espermáticas), e ainda apresentam uma taxa de prenhez satisfatória. Este relato de caso mostrou desempenho aceitável de um touro Nelore com patologias espermáticas de porcentagem elevada, discordando dos critérios atuais. O tema é relevante e muito importante, considerando a alta demanda comercial de touros geneticamente superiores, com características de importância econômica, para a melhoria dos rebanhos bovinos de corte e leite. Assim, novos estudos estão sendo realizados com o objetivo de identificar touros com diferentes padrões seminais e bom desempenho nas taxas de prenhez.

Palavras-chave: Sêmen congelado. Touro. Qualidade espermática.

Use in FTAI of frozen semen with high incidence of sperm pathologies with satisfactory pregnancy rate: case report

Abstract: The commercialization of frozen semen requires quality standards that, although not defined by MAPA, follow CBRA (2013) criteria. It is known that many bulls that have this standard, and therefore can be legally marketed, may not have the satisfactory pregnancy rate. On the other hand, there are also cases of bulls that do not comply with the recommendations (especially sperm pathologies), and yet present satisfactory pregnancy rate. This case report showed acceptable performance of a Nelore bull with high percentage sperm pathologies, disagreeing current criteria. The topic is relevant e very important, considering the high commercial demand for genetically superior bulls for characteristics economic importance for the improvement the beef and milk herds. Thus, new studies are being conducted with the objective to identify bulls with different seminal patterns and good performance in pregnancy rates.

Keywords: Cryopreservation. Bull. Quality sperm.

Introdução

A utilização de sêmen congelado no Brasil ainda é baixa, na ordem de 12% segundo a ASBIA (2014), com aumento expressivo devido a massificação do uso da IATF nos últimos anos. Tal cenário tendencia a continuidade de crescimento do mercado da IA em ambientes econômicos favoráveis para a pecuária de corte e leite, com a alta demanda por touros geneticamente superiores. Entretanto, as condições reprodutivas referentes a qualidade seminal do touro, a despeito do seu mérito genético, serão cruciais na capacidade fecundante e sucesso das IATFs. Assim, a qualidade espermática torna-se bastante relevante no entendimento de suas peculiaridades, incidência e consequência na taxa de concepção, sobretudo para touros de alto mérito genético, e com alta demanda comercial. Com este intuito, o sêmen de um touro Nelore, líder nos principais sumários da raça, e com alto percentual de patologia espermática, foi utilizado, exclusivamente, nos rebanhos do seu proprietário, em programa de IATF, em escala. Surpreendentemente, as taxas de prenhez resultantes foram satisfatórias, levando ao questionamento sobre o real desperdício de sêmen congelado de touros de alto mérito genético no atual padrão adotado para qualificação das doses para comercialização no país.

¹ Embrapa Pantanal, Caixa Postal 109, 79320-900, Corumbá, Mato Grosso do Sul. *(juliana.correa@embrapa.br)

² Seleon Biotecnologia, 18690-000, Itatinga, São Paulo.

³ Melhore Animal Consultoria Ltda, 14870-000, Jaboticabal, São Paulo.

⁴ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Material e Métodos

Um touro Nelore PO de 6 anos, de alto mérito genético nos principais sumários da raça, mantido em uma central de processamento de sêmen e com histórico de problemas espermáticos decorrente de traumatismo testicular, o qual o levou a orquiectomia unilateral (cirurgia realizada a mais de um ano) foi utilizado em um programa de IATF nas fazendas do seu proprietário. Os protocolos de IATF foram conduzidos em 3243 matrizes Nelore, novilhas e vacas, na estação de monta 2016/2017, com duração de 120 dias (outubro a fevereiro), manejadas em pastagens predominantes de brachiaria brizantha (*Urochloa brizantha*), com acesso a sal mineral e água ad libitum. As fazendas estão localizadas nos municípios de Cassilândia-MS, Três Lagoas-MS e Poconé-MT. O protocolo hormonal foi padronizado com a aplicação de 2mg de BE (FertilCare Sincronização, Valle, Argentina) e um dispositivo intravaginal com 0,6g de progesterona (FertilCare 600, Valle, Argentina), em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0). No Dia 8, momento da retirada do dispositivo de progesterona, os animais receberam 150µg de d-cloprostenol (Ciosin, Shering-Plough, Brasil), 300 UI de eCG (Folligon 5000 UI, Intervet, Holanda) e 1mg de BE (FertilCare Sincronização, Valle, Argentina). No Dia 10, 44 horas aproximadamente após a retirada do dispositivo, todas as matrizes foram inseminadas. Cada matriz foi acasalada distintamente com touros da raça Nelore selecionados para o programa, dentre estes o touro em questão, fora acasalado com 500 matrizes. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF por ultrassonografia (DP-2200 Vet®, Mindray, China).

O sêmen do touro citado foi coletado e congelado seguindo o processamento padrão da central de inseminação (por solicitação do proprietário do touro, especificamente para uso próprio), e apresentou 49% de defeitos totais, sendo 37% de defeitos maiores (14% de gota citoplasmática proximal; 3% de cauda fortemente dobrada; 2% de cabeça isolada patológica; 11% de fratura de peça intermediária; 7% de cauda dobrada com gota) e 12% de defeitos menores (2% de cabeça isolada normal; 7% de cauda dobrada; 3% de gota citoplasmática distal). A dose inseminante foi de 30x10⁶ espermatozoides, em palheta de 0,25 mL. Após descongelação observou-se 40% de motilidade e 3,5 de vigor espermático com 10 milhões de espermatozoides viáveis. Foram utilizadas duas coletas com o sêmen no mesmo padrão.

Resultados e Discussão

Foram inseminadas 3243 fêmeas, sendo 323 na fazenda 1, 1628 na fazenda 2 e 1292 na fazenda 3. A taxa de concepção foi de 56,6% (183/323), 50,2% (817/1628) e 52,9% (684/1292), para as fazendas 1, 2 e 3, respectivamente. No geral, a taxa de concepção foi 51,9% (1686/3243). 500 matrizes foram inseminadas com o touro citado, com taxa de concepção geral de 47,8% (239/500). Na figura 1 estão as médias de concepção do touro em questão nas três fazendas.

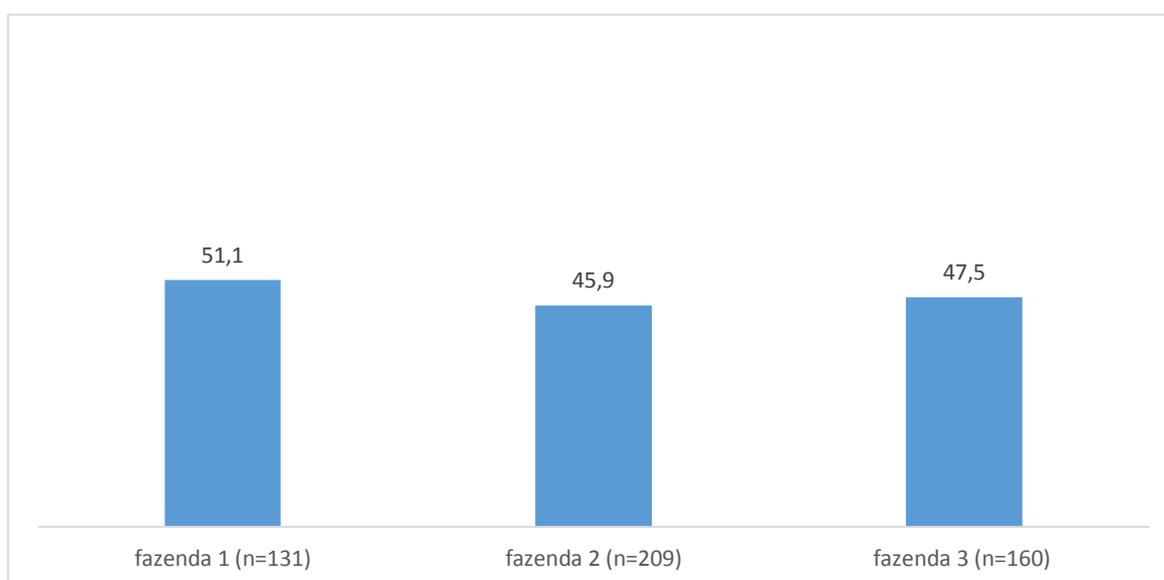


Figura 1. Taxa de concepção, por fazenda, do touro Nelore, com alta incidência de patologia espermática, na estação de monta 2016/2017. Fonte: Elaborado pelos autores.

Em análise comparativa aos demais touros, simultaneamente utilizados, constatou-se aceitável desempenho, próximo a média por fazenda, e média geral, conforme exposto na figura 2, identificando o touro citado como o número 4.

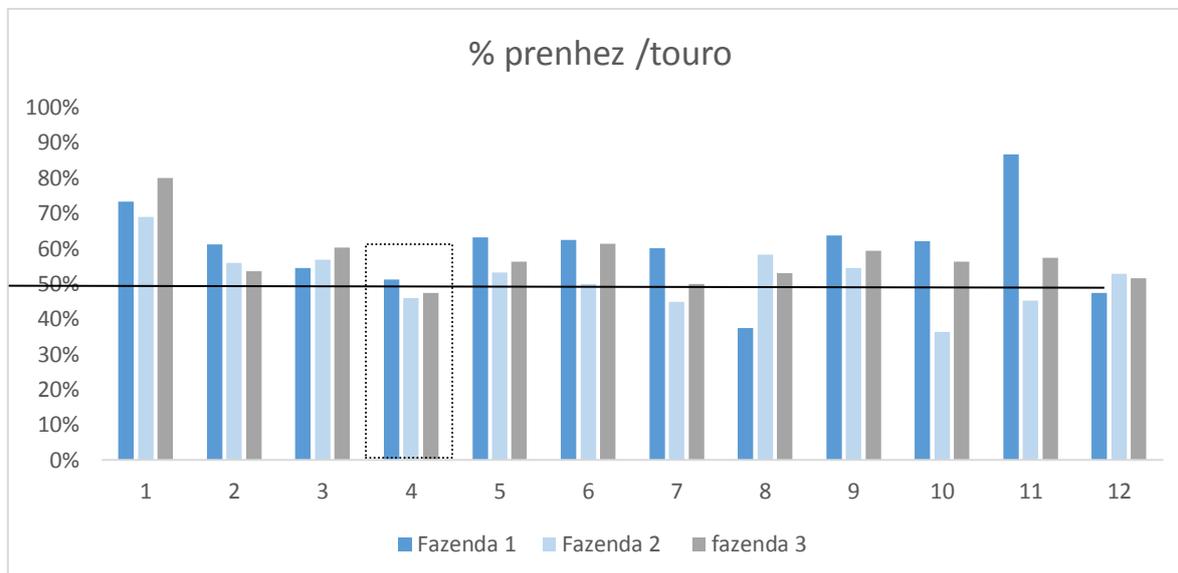


Figura 2. Taxa de concepção comparando 12 touros utilizados no programa de IATF, nas três fazendas, na estação de monta 2016/2017, sendo o touro em questão identificado como número 4. Fonte: Elaborado pelos autores.

Conclusões

O sêmen com alta porcentagem de patologia espermática apresentou índices de concepção satisfatórios no programa de IATF, gerando questionamentos sobre os atuais critérios de descarte de sêmen nas centrais de inseminação, sobretudo de touros de alto mérito genético.

Agradecimentos

A EMBRAPA, Melhore Animal Consultoria Ltda e Seleon Ltda.

Referências

ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Index ASBIA Mercado**. 2014. Disponível em:< <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2014.pdf> >. Acesso em: 20 de maio de 2017

CBRA - Colegio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.

Viabilidade do sêmen equino congelado com diferentes crioprotetores

Teresinha Inês Assumpção¹, Iury Kao Moretti Itoyama², Paula Caroline Pereira²

Resumo: O estudo foi conduzido com objetivo de testar o efeito de diferentes tipos e concentrações de crioprotetores no congelamento de sêmen equino e analisar a motilidade dos espermatozoides pós-descongelamento. Foram utilizados oito garanhões. O sêmen foi coletado por vagina artificial e, após centrifugação, foi diluído em uma solução de gema de ovo/lactose e 6 porções diferentes de crioprotetores (4 e 6% de glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido). O sêmen foi armazenado em palhetas de 0,5 mL com 100×10^6 de espermatozoides/palheta e submetido a congelamento lento. O descongelamento foi feito a $37^\circ\text{C}/30$ segundos. O sêmen congelado com 6% de glicerol apresentou motilidade mais alta, porém os valores são inferiores a 11% de motilidade (de $0,43 \pm 0,17\%$ até $10,88 \pm 3,61$), o que descreve a caracterização do sêmen descongelado como fora do padrão para doadores de sêmen. O processo de descongelação causou lesões na membrana espermática, comprovada pelos testes supravital e hiposmótico, o dano foi em torno de 63% e 93%, respectivamente.

Palavras-chave: Equinos. Reprodução. Criopreservação. Diluente.

Viability of equine semen freezing with different cryoprotectants

Abstract: This study aimed to test the effect of different types and concentrations of cryoprotectants on equine semen freezing, and analyze the motility of spermatozoa post-thawing. Eight stallions were used. Their semen was collected by artificial vagina, and after centrifugation it was diluted in a solution of egg yolk/lactose and 6 different portions of cryoprotectants (4 and 6% of glycerol, ethyleneglycol and dimethylsulfoxide). The semen was stored in straws of 0.5 mL with 100×10^6 sperm/straw, and subjected to slow freezing. The thawing was done at $37^\circ\text{C}/30$ seconds. For the frozen semen glycerol 6% showed the highest motility, but the values were inferior to 11% (from $0.43 \pm 0.17\%$ until 10.88 ± 3.61), which characterizes the characterizing the unfrozen semen as out of standard for semen donors. The thawing process caused injuries to the sperm membrane, proven by the supra-vital and hiposmotic tests, the damage was around 63% and 93%, respectively.

Keywords: Horses. Reproduction. Cryopreservation. Diluente.

Introdução

A seleção de reprodutores equinos é realizada basicamente pelas características fenotípicas como desempenho e conformação e não por suas características reprodutivas. Assim, é muito importante desenvolver processos para aumentar a qualidade e fertilidade do sêmen fresco, refrigerado e congelado dos garanhões (ALVARENGA et al., 2014). Um dos principais entraves no processo de congelamento do sêmen é a ausência de seleção genética para características de fertilidade e os fatores biofísicos e bioquímicos peculiares dos espermatozoides dos equinos (GOMES, G. M.; GOMES, L. P. M., 2009). Os crioprotetores são substâncias adicionadas ao meio de congelamento com a finalidade de diminuir e impedir injúrias aos espermatozoides, mas podem acarretar sequelas e queda de qualidade. As curvas de resfriamento e congelamento também causam danos às células, podendo provocar alterações nos padrões de motilidade, metabolismo, membrana plasmática e acrossoma dos espermatozoides (SQUIRES et al., 1999).

O objetivo deste estudo foi testar o efeito de diferentes tipos e concentrações de crioprotetores no congelamento do sêmen de equinos e analisar a viabilidade dos espermatozoides pós-congelamento.

¹ Universidade Federal de Uberlândia, 38408-100, Uberlândia, Minas Gerais.

* teassumpcao@ufu.br

Material e Métodos

Utilizou-se oito garanhões da raça quarto de milha, com idades entre 5 e 15 anos, provenientes de um haras do município de Uberlândia, MG. A coleta do sêmen foi realizada por vagina artificial (modelo Botucatu), método fechado, temperatura entre 45 e 50°C e uma égua em cio, como manequim. As amostras de sêmen foram analisadas física e morfológicamente, pelos métodos de rotina, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). O transporte do sêmen até o laboratório foi feito em temperatura constante de 37°C.

O sêmen foi centrifugado puro a uma velocidade de 600 x g por 10 minutos. As amostras foram ressuspendidas em diluente contendo: gema de ovo (20%), lactose (5,5%), glicose (1,5%) e dodecil sulfato de sódio (0,25%) e com os crioprotetores glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 4% e 6%, testado no sêmen dos 8 animais. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, na concentração de 100 x 10⁶ espermatozoides/palheta, estas foram lacradas, refrigeradas e congeladas no programa P2S3 da máquina de congelamento TK3000® (TK equipamentos, Uberaba, MG). O descongelamento das palhetas foi feito a temperatura de 37°C/ 30 segundos em descongelador de sêmen WTA® (WTA, Cravinhos, SP). Pós-descongelamento, foram realizadas as avaliações de motilidade através de microscopia óptica com aumento de 400 X, o teste supravital com eosina-nigrosina (BARTH; OKO, 1991) e o teste hiposmótico com solução hiposmótica de citrato de sódio (7,35g) (MELO, 1999). A análise estatística foi realizada pelo software SAS®, utilizando procedimento Glimmix e o teste de Bartlett, com P<0,05.

Resultados e Discussão

No sêmen fresco verificamos motilidade de 70-80% (média de 75%), vigor de 2 a 4, defeitos totais de 22 a 41% e concentração de espermatozoides de 120 a 302 x 10⁶ células/ml. Os valores médios de motilidade pós-descongelamento do sêmen (Tabela 1), mostraram valores inferiores a 11% (de 0,43 ± 0.17% até 10,88 ± 3.61), sendo o melhor resultado para glicerol 6%, caracterizando o sêmen descongelado como fora do padrão para doadores de sêmen, que deve ter motilidade igual ou superior a 30% (CBRA, 2013). Estes resultados foram inferiores aos de Fayer-Hosken et al. (2008) que encontraram para glicerol 4% e 6% motilidades de 57,93% e 66,50%, respectivamente, assim como Álvarez et al. (2014) que obtiveram motilidade de 24,06%, quando utilizaram uma concentração de 5% de glicerol. Já Snoeck et al. (2007) utilizando uma concentração de 3,5% de etilenoglicol encontraram 37,9 % de motilidade e Juliani e Henry (2008) usando o mesmo crioprotetor na concentração de 5 % verificaram motilidade de 34,7 %, resultados estes superiores aos desta pesquisa. O pior resultado foi para o DMSO com motilidade menor de 2%, difere do observado por Landim-Alvarenga et al. (2001) que encontraram valores superiores aos deste estudo utilizando 1,0 M de DMSO (25,8% de motilidade).

Tabela 1. Médias ± desvio padrão de motilidade do sêmen pós-descongelamento para os diferentes crioprotetores avaliados no sêmen de oito garanhões da raça quarto de milha. Letras diferentes indicam que diferem estatisticamente (P<0,05).

Crioprotetor	Motilidade (%)
Glicerol 4%	8,62 ± 3.87 ^{ab}
Glicerol 6%	10,88 ± 3.61 ^a
Etilenoglicol 4%	3,37 ± 2.05 ^{bc}
Etilenoglicol 6%	2,56 ± 1.62 ^{bc}
Dimetilsulfóxido 4%	1,81 ± 0.77 ^{bc}
Dimetilsulfóxido 6%	0,43 ± 0.17 ^c

Fonte: Elaborado pelos autores.

No teste hiposmótico não foi verificada diferença significativa (P=0,84) entre os diferentes crioprotetores, com variação de 92,75 ± 1,34 a 94,75 ± 0,99 de células não reativas ao teste, indicando uma elevada quantidade de células com injúrias. Valores superiores a estes foram encontrados por Juliani e Henry (2008), que utilizando concentrações de 5% de glicerol verificaram 25,3 % de células reativas ao teste e com etilenoglicol foi de 29,3 %. Também Snoeck et al. (2007) obtiveram valores mais elevados que os deste estudo, sendo 34,3 % de células reativas quando utilizaram 3,5% de etilenoglicol, porém quando reduziram as concentrações de gema de ovo e açúcares do diluente, o número de células reativas caiu para 2,8 %, resultado este semelhante ao de nossa pesquisa.

No teste supravital, também não foi verificada diferença (P=0,88) entre os diferentes crioprotetores. Verificamos neste estudo, valores elevados de células mortas (59,00 ± 7,40 a 65,63 ± 2,49 %), ou seja, a maior parte das células sofreu lesão em suas membranas durante o processo de criopreservação. Valores inferiores a este foi observado por Pugliesi et al. (2012), comparando diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação, com 19,2% de células mortas.

Conclusões

Os garanhões quarto de milha apresentaram boa qualidade de sêmen fresco, porém baixa motilidade pós-congelamento, sendo que o crioprotetor glicerol 6 % apresentou melhor resultado. O processo de criopreservação causou grandes lesões à membrana dos espermatozoides, comprovadas pelos testes hiposmótico e supravital. O congelamento de sêmen em equinos ainda é um desafio para uso desta biotecnologia na espécie.

Referências

- ALVARENGA, M. A.; RAMIRES NETO, C.; PAPA, F. O. Estratégias para melhorar a qualidade e fertilidade do sêmen de reprodutores equinos. **Spermova**, v. 4, n. 2, p. 172-178, 2014.
- ALVAREZ, C.; GIL, L.; GONZALEZ, N.; OLACIREGUI, M.; LUNO, V. Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® extender. **Cryobiology**, v. 69, n. 1, p. 144-148, 2014.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa, U.S.A.: Iowa State University Press, 1991. 285 p.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, MG: CBRA, 2013. 104 p.
- FAYRER-HOSKEN, R.; ABREU-BARBOSA, C.; HEUSNER, G.; JONES, L. Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and glycerol. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, p. 672-676, 2008.
- GOMES, G. M.; GOMES, L. P. M. Problemas e soluções com o uso de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 210-215, 2009.
- JULIANI, G. C.; HENRY, M. Efeito do glicerol, etilenoglicol, acetamida e leite desnatado na criopreservação de espermatozoides eqüinos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1103-1109, 2008.
- LANDIM-ALVARENGA, F. C.; ALVARENGA, M. A.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Viability and ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with glycerol and DMSO. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 341-342, 2001.
- MELO, M. I. V. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino**. 1999. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- PUGLIESI, G.; FURST, R.; CARVALHO, G. R. de. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação de sêmen de garanhões. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 172-177, 2012.
- SNOECK, P. P. N.; HENRY, M.; MELO, M. I. V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 56-64, 2007.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins, Colorado, USA: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999.

Embrapa

Pantanal



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

