

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

SAMARA DIAS CARDOSO RODRIGUES

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO
Coleta, Avaliação e Criopreservação de Sêmen de Ruminantes

ARAGUAÍNA – TO
2017

SAMARA DIAS CARDOSO RODRIGUES

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO
Coleta, Avaliação e Criopreservação de Sêmen de Ruminantes**

Relatório de estágio curricular supervisionado apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Tocantins para obtenção do grau de Médica Veterinária

Orientador (a): Profa. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias

ARAGUAÍNA – TO
2017

SAMARA DIAS CARDOSO RODRIGUES

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO
Coleta, Avaliação e Criopreservação de Sêmen de Ruminantes**

Relatório de estágio curricular supervisionado apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Tocantins para obtenção do grau de Médica Veterinária

Orientador (a): Profa. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias

Aprovada em: 04/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias - Orientadora

Profa. Dra. Ana Kelen Felipe de Lima

Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova

Dedico a Deus, a força maior para a concretização desse trabalho e à minha mãe Solange, e aos meus avós Carlos e Maria dos Anjos, os quais foram os principais responsáveis pela minha chegada até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primariamente a DEUS, pela graça de viver, por ter-me concedido, saúde, força e por ter cuidado de todos os detalhes na minha vida, e na realização deste sonho, pela a qual foi idealizado sonhado por ele, e esperado por mim e minha família.

A Universidade Federal do Tocantins-UFT, na qual estou graduando em medicina veterinária.

A Universidade Federal do Piauí-UFPI que me possibilitou a realização do estágio curricular supervisionado.

A todos membros integrantes do grupo do Laboratório de Biotecnologias de Reprodução Animal-LBRA do Centro de Ciências Agrárias-CCA, na pessoa do meu supervisor Prof. Dr. José Adalmir Torres de Sousa.

Aos meus familiares; tios (a) e primos (a), em memória ao meu querido tio José Carlos que não está mais aqui conosco, mas que torceu pela minha vitória.

Aos meus pais e avós, Carlos e Maria dos Anjos os quais desde a infância, são os meus verdadeiros heróis.

E em especial, a minha mãe Solange, a qual lutou incansavelmente, superando junto a mim, todas as dificuldades, para manter-me durante estes 5 anos de graduação.

Aos meus amigos e colegas de graduação, em que passamos juntos por muitos obstáculos e dias árduos, mas que hoje compartilhamos uma linda vitória.

Ao meu querido e amado namorado Natanael Gustavo, pelo carinho e paciência despedida durante esse tempo ao meu lado.

Aos meus mestres que me instruíram, não só aos assuntos inerentes ao curso, mas também a agir com ética e boa índole, aqui destaco profa. Dra. Clarissa Amorim de Cordova; prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova e Médico Veterinário Gervasio Quintanilha Failde de Azevedo.

E não menos, a minha orientadora profa. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias por ter dispensado seu tempo, me instruindo formidavelmente a idealizar este trabalho de conclusão de curso, e por ter demonstrado muito zelo e cuidados para comigo.

Sou grata a cada um que se fez presente nestas linhas. A vocês o meu muito obrigado!

“Esperei com paciência no senhor, e ele se
inclinou para mim, e ouviu meu clamor”

Salmo 40;1

RESUMO

O estágio curricular supervisionado foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina-PI, no período de 14 de março a 31 de maio de 2017, nas áreas de Reprodução e Biotecnologias da Reprodução Animal, totalizado 432 horas sob a orientação da Profa. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias e supervisão do Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza. Durante esse período foram desenvolvidas inúmeras atividades relacionadas à reprodução animal e biotecnologias da reprodução. O grupo de trabalho do LBRA tem como principal linha de pesquisa o desenvolvimento de crioprotetores e antioxidantes, visando à criopreservação de sêmen de ruminantes. Desta forma, as atividades desempenhadas durante o estágio, foram de acompanhar Médicos Veterinários Residentes e Pós-graduandos do PPG de Ciência Animal. As atividades, foram desenvolvidas no LBRA e em propriedades rurais localizadas na região de Teresina-PI e municípios do Maranhão. A ênfase das atividades foi no manejo reprodutivo do macho, tais como: exame andrológico, coleta e avaliação seminal, diluidores seminais, criopreservação do sêmen de bovino e caprino, além de inseminação artificial em tempo fixo em cabras e diagnóstico de gestação, que serão descritas mais detalhadamente e referenciadas neste relatório.

Palavras-chave- Biotecnologias da Reprodução; IATF; Exame Andrológico.

ABSTRACT

The supervised curricular stage was carried out at the Animal Reproduction Biotechnology Laboratory (LBRA), located at the Agricultural Sciences Center (CCA) of the Federal University of Piauí (UFPI), Petrônio Portela Campus, Teresina-PI, in the period of March 14 On May 31, 2017, in the areas of Reproduction and Biotechnologies of Animal Reproduction, totaling 432 hours under the guidance of Profa. Dr. Francisca Elda Ferreira Dias and supervision of Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza. During this period numerous activities related to animal reproduction and reproduction biotechnologies were developed. The LBRA working group has as main research line the development of cryoprotectants and antioxidants, aiming at the cryopreservation of semen of ruminants. In this way, the activities performed during the internship were to accompany Resident Veterinarians and Postgraduates of the Animal Science PPG. The activities were developed in the LBRA and in rural properties located in the region of Teresina-PI and municipalities of Maranhão. The emphasis of the activities was on the male reproductive management, such as: andrological examination, seminal collection and evaluation, seminal diluents, cryopreservation of bovine and goat semen, as well as fixed-time artificial insemination in goats and gestation diagnosis, which will be described More detailed and referenced in this report.

Keywords - Reproduction Biotechnologies; IATF; Andrological Examination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pág.
Figura 1	Fachada principal do LBRA (A); área externa de coleta em geral (B).	13
Figura 2	Dependências internas do LBRA: local usado também para estudo e aulas práticas (A); Corredor de acesso ao laboratório e demais dependências (B); Sala de tecnologia de embriões (C).	13
Figura 3	Área de manejo constituído por (A); Tronco de contenção (B); Seis baias (C).	14
Figura 4	Sala de botijões e freezers(A); Sala de esterilização(B).	14
Figura 5	Laboratório Central do LBRA.	15
Figura 6	Sala de tecnologia de embriões (A); Sala de tecnologia de sêmen (B).	15
Figura 7	Aferição do perímetro e simetria escrotal (A); Etapa de seleção dos touros Nelore (B).	17
Figura 8	Ficha utilizada para colheita de dados individuais durante o exame andrológico.	18
Figura 9	Eletroejaculador para coleta de sêmen.	19
Figura 10	Coleta de sêmen CPD.	19
Figura 11	Cortejo entre reprodutor e fêmea no cio, para coleta de sêmen de caprinos Anglonubiana.	20
Figura 12	Máquina de TK em processo de criopreservação.	21
Figura 13	Membrana intacta coradas em verde, e com membrana danificada coradas em vermelho (A); Caudas dobradas pós teste de funcionalidade da membrana (B).	24
Figura 14	Acrossoma intactos corados em fluorescência verde (A);	25

Células coradas em alaranjado com alto potencial de membrana, e células coradas em verde com baixo potencial de membrana (B).

- Figura 15** Protocolo de sincronização de estro em cabras utilizando, P4, PGF2 α e eCG. 26
- Figura 16** Material utilizado para inseminação artificial em cabra (A); Inseminação artificial por via cervical em cabra (B). 27
- Figura 17** Diagnostico de gestação em cabra através de Ultrassonografia. 28

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular Obrigatório Supervisionado em Medicina Veterinária, entre março e maio de 2017, em laboratórios e em propriedades rurais em municípios de Teresina e no Maranhão.	16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CPD	Curraleiro Pé-Duro
DCF	Diacetato de caboxifluoresceína
DCCV	Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária
DG	Diagnóstico de Gestaçã
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FITC-PNA	Isotiacianato de fluoresceína conjugada a <i>Peanut agglutinin</i>
HOST	<i>Hypoosmotic Swelling Test</i> (Teste Hiposmótico)
Hz	Hertz
IP	Iodeto de propídio
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
JC-1	Iodeto de tetraetilbenzimidazolil carbocianina
LBRA	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal
LOPU	Videolaparoscopia
Mm	Milímetro
µL	Microlitro
MHz	Megahertz
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PPG	Programa de Pós-Graduação
PGF _{2α}	Prostaglandina F2 alfa
Sptz	Espermatozoide
TE	Transferência de embrião
TTR	Teste de Termorresistência
TRIS	Hidroximetil-aminometano
UI	Unidade internacional
UFPI	Universidade Federal do Piauí
US	Ultrassonografia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	13
2.1 EXAME ANDROLÓGICO, COLETA E AVALIAÇÃO SEMINAL	17
2.2 RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO	21
2.3 AVALIAÇÃO DO SÊMEN PÓS-DESCONGELAÇÃO	22
2.3.1 Teste de Temorresistência (TTR)	22
2.3.2 Avaliação de Morfologia Espermática	23
2.3.3 Avaliação da Integridade e Funcionalidade da Membrana Plasmática	23
2.3.4 Teste de Integridade Acrossomal e Atividade Mitocondrial	24
2.4 SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO NAS CABRAS	26
2.5 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM CABRAS	26
2.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO DAS CABRAS	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
6 REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

O estágio curricular supervisionado, disciplina obrigatória do curso de Medicina Veterinária foi realizado integralmente no período de 14 de março a 31 de maio de 2017, totalizando uma carga horária de 432 horas, sob orientação da Profa. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias e supervisão de Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza.

O estágio teve como objetivo principal o aperfeiçoamento teórico/prático das principais biotecnologias da reprodução animal, desde aquelas desenvolvidas nas mediações laboratoriais, até aquelas a campo. O mesmo teve como base as atividades desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), e também foram acompanhadas atividades em propriedades na região de Teresina-PI e em municípios do estado do Maranhão.

O Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA) integra o Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (DCCV) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI); Campos da Socopo S/N; CEP: 64049-550; Teresina – PI. Desenvolve atividades relacionadas às pesquisas em Biotecnologia da Reprodução, e no apoio para casos encaminhados da clínica de grandes animais e na análise de materiais colhidos a campo.

O LBRA, sob a chefia do Professor Dr. José Adalmir Torres de Souza, atua na realização de exames andrológicos, coleta e avaliação seminal, sincronização de estro e inseminação artificial em tempo fixo (IATF), manipulação de oócitos e embriões *in vitro*, visando a realização de Transferência de Embriões (TE) e Produção *in vitro* de embriões (PIVe) e Diagnóstico de Gestação.

As atividades a campo, desenvolvidas durante o estágio, foram realizadas nas Fazendas Sucupira município União-PI, Fazenda Santa Luzia no município de Elesbão Veloso-PI, Fazenda Maliças no município de Coelho Neto-MA, ainda na Fazenda Nacional/ da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA Meio Norte no município de Campo Maior-PI. Além de outras atividades a nível prático, que foram conduzidas no Departamento de Zootecnia do CCA/UFPI.

O estágio centralizou as atividades na área de reprodução animal, especificadamente em Biotecnologia da Reprodução, em destaque as atividades relacionadas ao manejo reprodutivo do macho dentre elas, o exame andrológico, coleta e avaliação seminal, diluidores seminais, criopreservação do sêmen de bovino e caprino, além de técnicas de IATF em cabras e diagnóstico de gestação.

2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As figuras 1 a 6 ilustram as áreas externas e internas do local de estágio Laboratório de Biotecnologias e Reprodução Animal do Centro de Ciências Agrárias-UFPI.



Figura 1 - Faixada principal do LBRA (A); área externa de coleta em geral (B). **Fonte:** Arquivo pessoal, 2017.



Figura 2 - Dependências internas do LBRA: local usado também para estudo e aulas práticas (A); corredor de acesso ao laboratórios e demais dependências (B); sala de tecnologia de embriões (C). **Fonte:** Arquivo pessoal, 2017.

As dependências do LBRA, contam com uma área externa de coleta em geral, duas salas para análises seminais imediatas e uma área de manejo, constituída por um tronco de contenção e seis baias (Figura 3), dispendo também de uma área interna composta por uma secretaria, duas salas de professores, dois banheiros, uma copa, uma sala de botijões e freezers, uma sala de esterilização (Figura 4), o laboratório central (Figura 5), espaço reservado para atividades diversas associadas a tecnologias de sêmen e embriões, contando com duas salas, uma de tecnologia de embriões e outra de tecnologia de sêmen (Figura 6), e por fim, um setor reservado para biologia molecular.



Figura 3 - Área de manejo constituída por (A); Tronco de contenção (B), Seis baias (C). **Fonte:** Arquivo pessoal,2017.

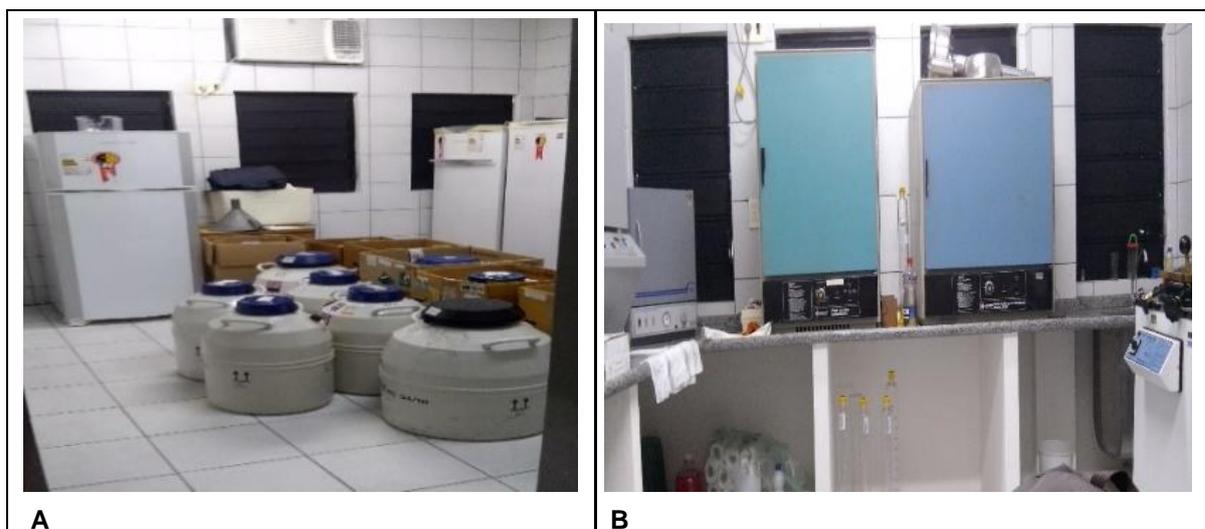


Figura 4 - Sala de botijões e freezers (A); Sala de esterilização (B). **Fonte:** Arquivo pessoal,2017.



Figura 5 - Laboratório Central do LBRA. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2017.



Figura 6 – Sala de tecnologia de embriões (A); Sala de tecnologia de sêmen (B). **Fonte:** Arquivo pessoal, 2017.

As atividades desenvolvidas durante o período de estágio foram distribuídas em atividades realizadas a campo e atividades laboratoriais (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular Obrigatório Supervisionado em Medicina Veterinária, entre março e maio de 2017, em laboratórios e em propriedades rurais em municípios de Teresina e no Maranhão.

Atividades Desenvolvidas			
Fêmeas	Nº	Machos	Nº
Coleta de ovários bovinos em abatedouro	3	Coleta de sêmen caprino (raça Anglo Nubiana);	6
Aspiração folicular (com agulha e seringas);	2	Coleta de sêmen bovino (raça Curraleiro Pé Duro-CPD) / exame andrológico;	4
Aspiração folicular (por bomba de vácuo)	1	Coleta de sêmen bovino (raça Nelore) / exame andrológico	3
Produção de meios para MIV	3	Coleta de sêmen bovino / CPD (amostra do plasma);	2
Swab e citologia vaginal canino	1	Coleta de sêmen canino (raça Bulldog);	1
Rastreamento folicular	3	Avaliação seminal imediatas;	13
Maturação de <i>in vitro</i> (MIV)	3	Análise de integridade acrossomal (sondas fluorescentes);	3
Produção de meios FIV;	3	Teste de Termo resistência lenta (TTR);	3
Fertilização <i>in vitro</i> (FIV);	3	Avaliação de integridade de membrana plasmática e mitocondrial;	3
Cultivo <i>in vitro</i> (CIV);	3	Produção de diluidor TRIS-GEMA;	5
Sincronização do estro em caprinos;	1	Análise morfológica de patologias espermáticas;	3
IATF em caprinos;	1	Envase de sêmen;	13
Diagnóstico de gestação em cabras;	2	Resfriamento de Sêmen;	2
Diagnóstico de gestação em bovinos;	1	Criopreservação de Sêmen;	13
Laparoscopia para aplicação de células tronco;	1	Preparo de meio para sêmen.	3
Pós-operatório das cabras da cirurgia da LOPU.	7		

Durante o estágio foi possível acompanhar outras atividades em paralelo com as atividades da área de reprodução animal (desvermifugação, OPG, eutanásia, etc.)

Nas propriedades foram desempenhadas atividades centralizadas na melhoria dos índices reprodutivos e para seleção de reprodutores, através: exames andrológicos, coleta e avaliação seminal, implantação de protocolos de sincronização de estro e IATF utilizando de sêmen fresco e congelado e realização de diagnóstico de gestação. A vista disso, conseguiu-se observar como estas técnicas são empregadas na prática e na rotina de uma propriedade e os resultados e benefícios de sua implantação.

Posteriormente, atividades relacionadas às análises seminais eram desenvolvidas nas mediações do LBRA. À qual, além das análises relacionadas ao macho, também foram desenvolvidas atividades relacionadas à fêmea, entre elas manipulação de oócitos e a PIV.

2.1 EXAME ANDROLÓGICO, COLETA E AVALIAÇÃO SEMINAL

O exame andrológico completo fundamenta-se na avaliação de todos os fatores que contribuem para a função reprodutiva normal do touro (BARBOSA; MACHADO, 2005). Constitui-se numa ferramenta fundamental para avaliação e seleção de reprodutores visando aumentar a capacidade reprodutiva do plantel e obter descendentes com alto potencial genético (FONSECA et al., 1992).

Foram realizados exames andrológicos em 12 touros da raça Curraleiro Pé-Duro (CPD) na Embrapa Meio-Norte / Fazenda Experimental no Município de Campo Maior-PI, e em 6 touros da raça Nelore na Fazenda Santa Luzia no Município de Elesbão Veloso-PI (Figura 7) com intuito de seleção dos animais para participação dos projetos em andamento pelo grupo de pesquisa do LBRA, e para análises e criopreservação do sêmen dos mesmos. Também foi realizado exame andrológico em caprinos da raça Anglonubiana, na fazenda Sucupira, município de União- PI, com os mesmos propósitos descritos anteriormente.



Figura 7 - Aferição do perímetro e simetria escrotal(A); Etapa de seleção dos touros Nelore (B).
Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

A escolha correta do macho reprodutor é essencial para a prática da inseminação artificial, visando à obtenção de sêmen de boa qualidade, de animais com boa capacidade reprodutiva (NUNES, 2002). Nos exames andrológicos

realizados, os reprodutores selecionados foram classificados como aptos à reprodução, segundo os parâmetros do CBRA (2013).

O manejo que foi realizado nos touros tanto da raça Curraleiro Pé-Duro, quanto Nelore, foram facilitados pelo uso de um tronco de contenção nas próprias instalações das propriedades citadas, seguindo-se com a disposição de uma ficha para exame andrológico padronizada (Figura 8), identificando inicialmente os dados da propriedade e a numeração de cada animal. Segundo Barbosa et al. (2005), na realização do exame andrológico a adoção de um formulário apropriado é fundamental para a condução das etapas do mesmo.

FICHA DE CAMPO PARA ANDROLÓGICO				
PROPRIETÁRIO:		FAZENDA:		
ENDEREÇO:		DATA:		Nº da FOLHA:
Amostra				
Número				
Registro				
Nome				
Nasc./Idade				
Raça				
Peso(kg)				
Cond. Corporal				
CE(cm)				
Histórico				
Clinico Geral				
Aprumos				
Escroto				
Prepúcio				
Pênis				
Cordões Esperm				
Epidídimo Dir.				
Epidídimo Esq.				
Genitália Interna				
TD Consistência				
TE Consistência				
TD Comp. X Larg.				
TE Comp. X Larg.				
Método Coleta				
Volume (ml)				
Turbilhão (0-5)				
Motilidade (%)				
Vigor (0-5)				
Conc. (diluição)				
Observação				
Técnico responsável pela coleta:				

Figura 8 - Ficha utilizada para colheita de dados individuais durante o exame andrológico.

O peso foi estabelecido através de estimativa subjetiva com o auxílio dos tratadores e a seguir foram preenchidos os demais itens da resenha, anamnese, exame clínico geral, e posterior ao mesmo, exame específico do aparelho reprodutor, dando ênfase às características testiculares e aos parâmetros de avaliação seminal.

Segundo o CBRA (2013) a avaliação da aptidão reprodutiva de um macho destinado à reprodução fundamenta-se na observação da saúde geral, saúde hereditária, saúde genital, *potentia coenundi* (capacidade de cópula) e *potentia generandi* (capacidade de fertilização).

A coleta do sêmen era realizada pelo método da eletroejaculação (Figura 9), sendo um método rápido e seguro de coleta em bovinos, visando a realização de

exame andrológico em um lote de animais. A eletroejaculação é indicada para animais férteis, impossibilitados de efetuar a monta ou na avaliação de touros a campo que ainda não são condicionados à vagina artificial (GONÇALVES, et al., 2008).

A coleta do sêmen foi então realizada com o auxílio de um eletroestimulador controlado automaticamente utilizando um tubo de ensaio graduado de 15 mL, estéril, acoplado a uma mucosa (Figura 10).



Figura 9 - Eletroejaculador para coleta de sêmen. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2017.



Figura 10 - Coleta de sêmen de CPD. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2017.

As análises dos parâmetros seminais imediatos foram avaliadas macroscopicamente quanto às características de cor, aspecto, volume, e, microscopicamente, quanto ao turbilhonamento, vigor e motilidade, realizados nas próprias fazendas, com o auxílio de um microscópio. O exame do sêmen é feito inicialmente de forma macroscópica, sem auxílio de qualquer instrumento, seguindo com a avaliação do sêmen por métodos laboratoriais e microscopia (REICHENBACH et al., 2008).

Em seguida adicionou-se 10 µl de sêmen em 2 mL de formol salino na diluição de 1:200 em microtubos de 1,5 mL para análise de concentração espermática realizada por meio da câmara de Neubauer, e morfologia através da técnica de câmara úmida, realizadas posteriormente em laboratório.

No momento da realização do exame andrológico foi realizada coleta de sangue na prega caudal de cada animal, com objetivo de diagnóstico sorológico de leptospirose e brucelose. Neste momento, fez-se também a escarificação da mucosa

do prepúcio com o auxílio de uma vassourinha ginecológica e imediatamente realizado um *print* em lâmina, para posterior diagnóstico de *Tritrichomonas fetus*. Além deste, foi realizado o lavado prepucial introduzindo-se cerca de 50 mL de solução salina tamponada no prepúcio, massageando-o com o óstio fechado por uma das mãos e recoletando-se o material por um sistema de sifão com o objetivo de coleta de material para diagnóstico de *Campylobacter fetus*.

O manejo realizado na coleta de sêmen dos caprinos da raça Anglonubiana, ocorreu por contenção física por auxílio dos tratadores da fazenda. Ao total foram submetidos seis animais à coleta de sêmen pelo método de vagina artificial. O preparo desta consistiu de: água morna em temperatura aproximada de 42,5 °C, pressão de ar para que se assemelhasse a vagina da fêmea e lubrificação da mucosa de látex com vaselina. O método da vagina artificial associado ao uso de um manequim ou fêmea em cio (Figura 11) é o mais empregado, e o que obtém as características seminais mais próximas do ejaculado (MIES FILHO,1987).

A vagina artificial foi acoplada a um tubo de ensaio graduado de 15 mL estéril; imediatamente após cada colheita o sêmen foi avaliado microscopicamente quanto ao turbilhonamento, motilidade e vigor. Posteriormente foi avaliada a concentração espermática pela técnica da câmara de Neubauer, na diluição de 1:400, em solução de citrato de sódio em formol a 4 %, e a morfologia espermática pela técnica da câmara úmida (CBRA, 2013).



Figura 11 - Cortejo entre reprodutor e fêmea no cio, para coleta de sêmen de caprinos da raça Anglonubiana. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2017.

Além destas, as análises de integridade do acrossoma e membrana citoplasmática utilizando sondas fluorescentes, foram realizados no laboratório.

2.2 RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação seminal é um processo complexo e deve levar em consideração alguns fatores como o processo de diluição, descongelamento e os fatores fisiológicos que atuam no sêmen de cada espécie (CASTELO et al., 2008).

A vista disso, os ejaculados coletados dos caprinos eram manipulados cuidadosamente a 37°C e misturados formando um pool. Em seguida eram fracionados em duas metades, na qual um seria resfriada por um período de 12h e a outra metade seria criopreservadas. Foi utilizado o meio diluidor TRIS Gema + 20% gema de ovo. Gonçalves et al. (2008) relata que o objetivo primário na diluição do sêmen é proteger os espermatozoides, preservando sua vitalidade e elevando a um grau máximo o volume total do ejaculado.

O sêmen então diluído era envasado em palhetas de 0,25 mL e congelados em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em Congelação Ltda. Uberaba, Brasil) (Figura 12), na curva de congelação lenta (-0,25°C/min., de 25°C a 5°C e - 20°C/min., de 5° - 120°C) e, após atingir -120°C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-190°C) seguindo com armazenamento em botijão de nitrogênio.

Embora os processos de congelação e descongelação induzam danos à integridade dos espermatozoides (WATSON, 2000), o processo de criopreservação faz com que os espermatozoides permaneçam em anabiose, estado que o metabolismo espermático está temporariamente suspenso, até sua reativação à descongelação, tornando a congelação um método eficiente por conseguir manter o potencial genético de reprodutores por tempo indeterminado (GONÇALVES et al., 2008).



Figura 12 - Máquina de TK em processo de criopreservação.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

A diluição e congelamento usado no sêmen de bovinos não diferiram muito das utilizadas para caprinos. As amostras também foram diluídas em meio TRIS-Gema (Tris; ácido cítrico; frutose; água destilada; gema de ovo e glicerol), congeladas em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em Congelação Ltda. Uberaba, Brasil), na curva de congelação lenta (-0,25° C/min, de 25°C a 5°C e -20°C/min, de 5°C a -120°C) e após atingir -120°C, as palhetas então foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). Para Gonçalves et al. (2008), a refrigeração e congelação do sêmen têm a finalidade de manutenção da vitalidade espermática por períodos variados, objetivando sua utilização futura, o qual consistia no objetivo principal das coletas de sêmen aqui mencionadas.

2.3 AVALIAÇÃO DO SÊMEN PÓS-DESCONGELAÇÃO

Duas semanas após a criopreservação das amostras de sêmen coletadas tanto de bovinos quanto de caprinos, foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto ao Tempo de Termorresistencia (TTR), Morfologia espermática, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, integridade do acrossoma, atividade mitocondrial e posteriormente testados *in vivo* através da IATF. Segundo Gonçalves et al. (2008), avaliação do sêmen pós-descongelação é uma das etapas principais no processamento tecnológico do sêmen, pois a partir da avaliação das características seminais de uma dose descongelada pode-se atestar a qualidade da partida do sêmen e conseqüentemente do macho reprodutor testado.

2.3.1 Teste de Termorresistência (TTR)

O TTR foi realizado de acordo com Viana et al. (2009), que consiste em avaliar a longevidade dos espermatozoides das amostras do sêmen descongelado incubando-os em banho-maria a 37°C por um período de 3 horas.

As mostras descongeladas foram então acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e incubadas a 37°C e posteriormente avaliadas quanto à motilidade total (MT - %) e o vigor espermático (1-5) por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora acoplada, com aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelamento (CBRA, 2013).

2.3.2 Avaliação de Morfologia Espermática

Na avaliação de danos na morfologia espermática (alterações de cabeça e cauda), foram adicionadas alíquotas de 20 μ L de sêmen pós-criopreservação em tubos com 2 mL de citrato de sódio formulado a 4%. Posteriormente essas alíquotas foram avaliadas através de preparação úmida entre lâmina e lamínula, por meio de microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x com óleo de imersão. Dessa forma, foram contadas 100 células espermáticas, classificando-as individualmente de acordo com as alterações encontradas. Dentro de dois grupos, classificaram-se defeitos menores e defeitos maiores segundo Blom (1973).

2.3.3 Avaliação da Integridade e Funcionalidade da Membrana Plasmática

Para avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizado o método de coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídio (IP), em que alíquotas de 50 μ L de sêmen pós-descongelamento foram diluídos em 150 μ L de Tris (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g de frutose; 100 mL de água destilada) contendo 5 μ L de DCF e 20 μ L de IP e incubadas por 10 minutos a 37°C. Um total de 200 espermatozoides eram avaliados em microscópio de epifluorescência com aumento de 400x, usando-se filtro de emissão. O DCF, por conter radicais acetil, consegue transpor a membrana intacta, sendo imediatamente desacetilada por esterases intracelulares, tornando a sonda impermeável e fazendo com que as células íntegras se coram em verde. Já o IP somente penetra através de células que contenham membrana plasmática lesada, tendo afinidade pelo DNA e corando o núcleo da célula em vermelho (ARRUDA; CELEGHINI, 2003). Desta forma os espermatozoides foram classificados em membrana intacta quando se apresentarem corados em verde, e com membrana danificada quando corados em vermelho.

Para o teste de funcionalidade da membrana, uma proporção de 10 μ L de sêmen descongelado foi misturado a 1 mL da solução hiposmótica constituída por citrato tri- sódico e frutose, obedecendo a uma concentração de 150 mOsm/L, conforme Fonseca et al. (2005) e incubados em Banho-Maria a 37°C, durante 60

minutos. Posteriormente, 10µL desta suspensão foi inserido sobre lâmina, coberta com lamínula, e observada em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000x. Este teste se caracteriza pelo influxo de fluidos para o interior da célula espermática, sob condições hiposmóticas, até que o equilíbrio entre os compartimentos seja alcançado, sendo um indicativo de que o transporte de água através da membrana está ocorrendo normalmente (INAMASSU et al., 1999). Os resultados foram expressos em percentual pela diferença de caudas dobradas antes e após o teste (Figura 13), em 200 espermatozoides contados, de acordo com fórmula citada por Melo (1999).

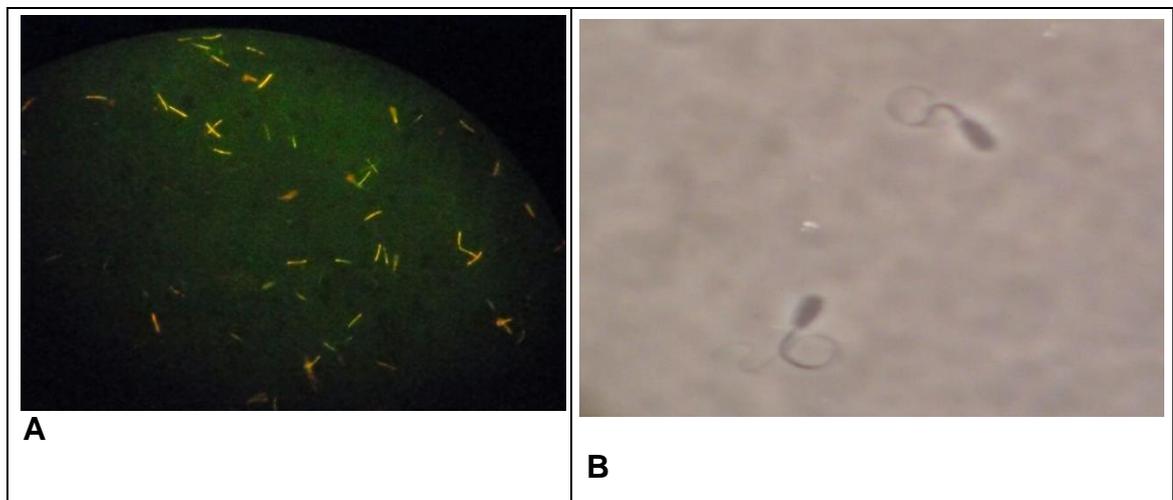


Figura 13 - Membrana intacta corados em verde, e com membrana danificada corados em vermelho (A); Caudas dobradas pós teste de funcionalidade da membrana (B). **Fonte:** LBRA, 2017.

2.3.4 Teste de Integridade Acrossomal e Atividade Mitocondrial

Para avaliação da integridade do acrossoma, foi utilizado o corante isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA), no qual uma alíquota de 20 µL da solução estoque de FITC-PNA foi descongelado e adicionada a 480 µL de PBS. Alíquotas de 20 µL desta solução foram colocadas sobre lâminas e assim confeccionados os esfregaços, nos quais foram incubadas por 20 minutos em câmara úmida a 4°C, na ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS refrigerado (4°C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 µL de meio de montagem foi colocado sobre a lâmina e coberto com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, em

microscópio de epifluorescência, usando filtro de emissão. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentaram a região acrossomal corada em verde fluorescente ou acrossoma reagido quando apresentaram uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentaram fluorescência verde em toda região da cabeça.

A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico (JC-1). Para tanto, alíquotas de 50 μL de sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150 μL de Tris contendo 5 μL de JC-1 e incubadas por 10 minutos a 37°C. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência, com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando-se filtro de emissão. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, e aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana (Figura 14). Visto que mitocôndrias com respiração pouco ativa acumulam pouco corante e fluorescem em verde, ao passo que mitocôndrias com respiração bastante ativa acumulam mais corante, formando um agregado e fluorescendo em laranja.

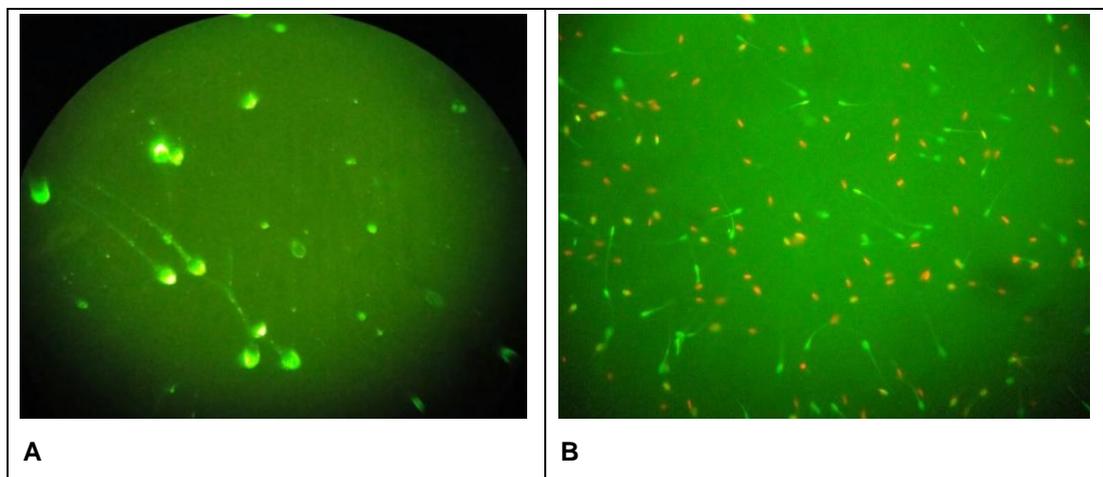


Figura 14 - Acrossomas intactos corados em fluorescência verde (A). Células coradas em alaranjado com alto potencial de membrana, e células coradas em verde com baixo potencial de membrana (B). **Fonte:** LBRA, 2017.

2.4 SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO NAS CABRAS

A sincronização do estro das cabras foi realizada com a utilização de esponjas intravaginais impregnadas com 60mg de acetato de medroxiprogesterona-MAP (Progespon[®], Syntex, Argentina) e adicionado oxitetraciclina com hidrocortisona (Terra-Cortril[®], Pfizer, Brasil) permanecendo na porção cranial da vagina dos animais por 11 dias. No nono dia as fêmeas receberam 300 UI de gonadotrofina coriônica equina - eCG (Novormon[®] 5.000 UI, Intervet, Holanda) e 75 µg de Cloprostenol Sódico - PGF2α (Ciosin[®], Coopers, Brasil), via intramuscular. As inseminações artificiais foram realizadas 48 horas após a retirada das esponjas em tempo fixo (Figura 15).

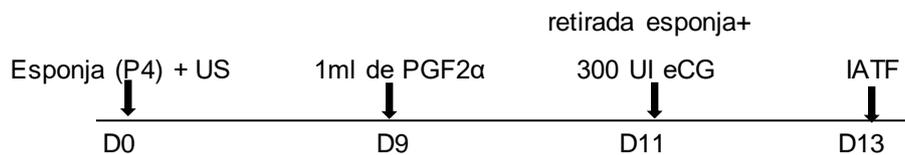


Figura 15 - Protocolo de sincronização de estro em cabras utilizando, P4, PGF2α e eCG.

2.5 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM CABRAS

Foram inseminadas 43 cabras da raça Anglonubiana com fertilidade comprovada em exames ginecológicos realizados anteriormente, selecionadas dentre 80 fêmeas. As demais estavam prenhes constatadas através de diagnóstico de prenhes (DG) por ultrassonografia (US) transretal. Cada fêmea passou por uma pequena triagem, em que se coletou dados sobre idade, escore corporal (0-5), e estado geral dos animais. Além de coleta de sangue e fezes para exames posteriores.

As IATF foram por via cervical o mais profundo possível (Figura 16). Pois segundo Baltassare; Karatzas, (2004) o local de deposição do sêmen em programas de IA e IATF na espécie caprina e ovina influenciam diretamente no número de prenhez. Desta forma, as inseminações realizadas no ótico caudal da cérvix (vaginal), possuem fertilidade menor em comparação as intrauterinas, principalmente, quando se utiliza sêmen criopreservado. Assim as inseminações foram realizadas o mais próximo do útero.



Figura 16 - Material utilizado para inseminação artificial em cabra (A); e Inseminação artificial por via cervical em cabra (B). **Fonte:** Arquivo pessoal, 2017.

Durante o procedimento as fêmeas foram contidas com o posterior elevado num ângulo de 90° , auxiliado pelos tratadores da propriedade. Para visualização da cérvix e passagem do aplicador de sêmen para inseminação de caprino e ovinos, foi também utilizado espelho vaginal e foco de luz. O procedimento de inseminação propriamente dito foi realizado por inseminadores (Doutorando, Residente e estagiário), utilizando uma única dose de sêmen congelado-descongelado em palheta de 0,25 ml por inseminação.

2.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO DAS CABRAS

De acordo Hafez; Hafez (2004), o DG é imprescindível para a melhoria da eficiência reprodutiva, pois possibilita a identificação precoce das fêmeas que não ficaram prenhes durante a estação de monta ou por IA.

O DG foi realizado 30 dias após a IA com a utilização de aparelho de ultrassom (Pie Medical 100®, Pie Medical, Maastricht, Holanda) equipado com transdutor trans retal de 5 MHz (Figura 17). Por se tornar inviável o DG via palpação retal nessa espécie, optou-se pela técnica de ultrassonografia, por ser uma técnica não invasiva e não provocar modificações biológicas, além de permitir a avaliação do tamanho, da forma, da localização e da consistência, e ainda possibilitar o registro de imagens para serem utilizadas em atestados ou laudos clínicos (GONÇALVES et al., 2008).

Os resultados do diagnóstico não foram satisfatórios, tendo em vista que as matrizes usadas no protocolo da IATF não foram as melhores do plantel, pois os

bodes da propriedade acabaram cobrindo as melhores matrizes. Desta forma, acredita-se que devido as condições das cabras inseminadas serem inferiores, e ainda não terem passado por um manejo sanitário e nutricional adequado, estes fatores somados vieram a influenciar nos resultados, os quais foram negativos quanto a prenhes, detectados através da ultrassonografia.

Todavia outros fatores podem ter contribuído para estes resultados, como a qualidade do próprio sêmen utilizado, já que estes nas análises pós-descongelamento apresentaram-se também inferiores.



Figura 17 - Diagnostico de gestação em cabra através de Ultrassonografia.
Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Estágio Curricular Supervisionado constitui uma etapa fundamental na aquisição e aprimoramento de conhecimentos e moldagem das habilidades essenciais para atuação como Médica Veterinária.

Com o estágio foi possível conhecer como se faz reprodução animal assistida com a aplicação destas biotecnologias na propriedade e também proporcionou a oportunidade de vivenciar a busca de soluções no laboratório ou melhorar a eficiência destas no campo.

Portanto, poder vivenciar as atividades desempenhadas cotidianamente na vida profissional de um médico veterinário e pesquisador na área da reprodução animal fomentou ainda mais o interesse de ingressar na área científica, observando sua funcionalidade prática, alinhada à dinâmica dos trabalhos a campo.

6 REFERÊNCIAS

- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.l.], v. 31, p. 230-231, 2003. Suplemento.
- BARBOSA, R.T.; MACHADO, R. A importância do exame andrológico em bovinos. Circular Técnica, **Embrapa Pecuária Sudeste**. São Carlos- SP. P. 1-13, 2005.
- BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 255-266, 2004.
- BLOM E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord Vet Med**, v.25, p.383-339, 1973.
- CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S.l.], v. 2, p. 67-75, 2008.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J. J. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. Belo Horizonte - MG. p. 1-79, 1992.
- FONSECA, J. F.; TORRES, C.A.A.; MAFFILI, V.V.; BORGES, A.M.; SANTOS, A.D.F.; RODRIGUES, M.T.; OLIVEIRA, R.F.M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 2, n. 2, p. 139-144, 2005.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**: 2. Ed. São Paulo: Editora Roca, 2008.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. São Paulo, Brasil Manole, 7ed, 2004.

INAMASSU, A.; VECHI, E.; LOPES, M. D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S.l.], v. 23, p. 302-304, 1999

MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.51, p.71-78, 1999.

NEVES, J. P.; NUNES, J.F.; MORAIS, J. C. F. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds.). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2. ed. São Paulo, SP: Roca, p. 83-101, 2008.

NUNES, J. F. Inseminação artificial em caprinos. In: GONÇALVES, P. B.D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, p. 340. 2002.

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