

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

CAROLINA DOS REIS NUNES

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO: ÁREA DE
REPRODUÇÃO ANIMAL**

**CAXIAS DO SUL
2021**

CAROLINA DOS REIS NUNES

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO: ÁREA DE
REPRODUÇÃO ANIMAL**

Relatório de estágio curricular obrigatório
apresentado como requisito para obtenção de
título de bacharel em Medicina Veterinária na
Área do Conhecimento de Ciências da Vida
pela Universidade de Caxias do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Caetano de
Oliveira

**CAXIAS DO SUL
2021**

CAROLINA DOS REIS NUNES

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO: ÁREA DE
REPRODUÇÃO ANIMAL**

Relatório de estágio curricular obrigatório
apresentado como requisito para obtenção de
título de bacharel em Medicina Veterinária na
Área do Conhecimento de Ciências da Vida
pela Universidade de Caxias do Sul.

Aprovado em: 02/07/21

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fabio Antunes Rizzo
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Médica Veterinária Larissa Cecconello do Amaral
Universidade de Caxias do Sul – UCS

**CAXIAS DO SUL
2021**

RESUMO

O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular obrigatório em medicina veterinária, realizado na central de coleta e processamento de sêmen bovino Renascer Biotecnologia, localizada em Barra do Quaraí – Rio Grande do Sul. O estágio foi realizado no período de 8 de março à 28 de maio de 2021 totalizando 464 horas, sob supervisão da médica veterinária Cecília Machado Pavin e orientação do professor Fernando Caetano de Oliveira. Neste relatório foi descrito o local de realização do estágio, sua infraestrutura, equipe de trabalho e atividades desenvolvidas e acompanhadas. O estágio curricular obrigatório em medicina veterinária foi uma importante experiência que pôde ser vivenciada, possibilitando o desenvolvimento de valores como a ética, profissionalismo e trabalho em equipe. Além de ser de grande importância na formação acadêmica do estudante e crescimento pessoal para um futuro profissional.

Palavras-chave: Estágio curricular. Criopreservação. CCPS. Biotecnologia reprodutiva.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Central de Coleta e Processamento de sêmen (CCPS) Renascer Biotecnologia.....	7
Figura 2 – Estrutura Física da Central de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) da Renascer Biotecnologia.	8
Figura 3 – Área de coleta da Central de Coleta e Processamento de Sêmen Renascer Biotecnologia.....	9
Figura 4 – Laboratório de Processamento e Congelamento de Sêmen	11
Figura 5 – Montagem de Vagina Artificial (A) e Manutenção de Temperatura em Estufa (B)	17
Figura 6 – Coleta de Sêmen Realizada Através do Eletroejaculador	18
Figura 7 – Visualização de Defeitos em Morfologia Espermática Através da Técnica de Câmara Úmida.....	21
Figura 8 – Preparação de Diluente	22
Figura 9 – Envasadoras: MRS4 (A) e MRS1 (B).....	23
Figura 10 – Contagem de Palhetas e Controle de Qualidade do Envase.....	24
Figura 11 – Sistema de Análise Seminal Computadorizada (CASA)	25
Figura 12 – Mesa preparada para realização de TTR.....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	7
2.1 ÁREA DE COLETA.....	9
2.2 LABORATÓRIO	10
3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	11
3.1 ADMISSÃO DE REPRODUTORES	15
3.2 MANEJO SANITÁRIO E QUARENTENÁRIO	15
3.3 MONTAGEM DE VAGINAS ARTIFICIAIS	16
3.4 COLETA COM VAGINA ARTIFICIAL.....	17
3.5 COLETA COM ELETROEJACULADOR	18
3.6 RECEPÇÃO DO SÊMEN	19
3.7 CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA	19
3.7.1 Espectrofotômetro.....	19
3.7.2 Câmara de Neubauer	19
3.8 AVALIAÇÕES PRÉ-CONGELAMENTO	20
3.8.1 Análises Imediatas.....	20
3.8.2 Avaliação da Morfologia Espermática	20
3.9 DILUIÇÃO	22
3.10 ENVASE E CONGELAMENTO	23
3.11 AVALIAÇÃO PÓS-CONGELAMENTO.....	25
3.12 TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA	26
4 DISCUSSÃO	27
4.1 CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMÊN BOVINO.....	27
4.1.1 Análises Físicas e Morfológicas.....	27
4.1.2 Diluição.....	28
4.1.3 Congelamento	29
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
ANEXO A – FICHA DE ADMISSÃO DO REPRODUTOR.....	36
ANEXO B – FOLHA DE AVALIAÇÃO DE EXAME ANDROLÓGICO.....	37
ANEXO C – FOLHA DE AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	38

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, com 214,7 milhões de cabeças e é considerado o principal exportador de carne bovina (IBGE, 2020). Isso faz com que o setor pecuário possua grande importância na economia do país, tendo em vista que a pecuária de corte representou 8,5% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro em 2019, movimentando 618,50 bilhões de reais (ABIEC, 2020). Diante deste cenário, os investimentos em reprodução animal aumentaram, para suprir a demanda existente, chegando a R\$ 606,2 milhões investidos somente em protocolos, materiais e sêmen. (ABIEC, 2020).

Devido a importância da bovinocultura brasileira, cada vez mais se faz necessário o uso de ferramentas capazes de melhorar os sistemas de criação, como o uso de biotécnicas reprodutivas. Entre elas, pode-se citar a Inseminação Artificial (IA) e a criopreservação de sêmen, duas técnicas que revolucionaram a indústria da reprodução e produção animal. Segundo os dados mais recentes da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), em 2020 houve um aumento de 38% na produção de doses de sêmen bovino de corte em relação ao ano anterior. (ASBIA,2020).

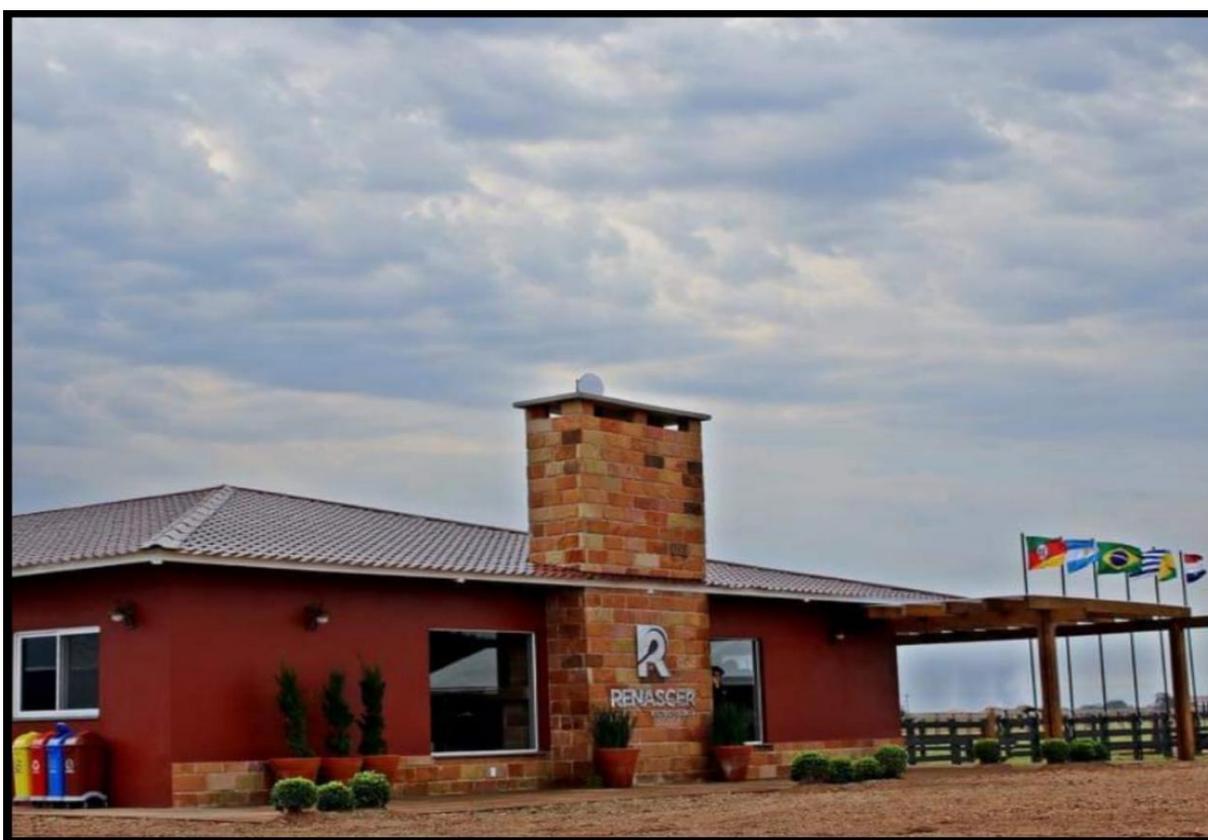
Dentro do mercado da IA, a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) tem um papel de destaque, onde tudo indica ser responsável por 89,8% das inseminações realizadas no Brasil em 2020, demonstrando ser uma biotécnica já consolidada no mercado. (BARUSELLI, 2021). Mesmo diante de um ano desafiador que foi 2020, a IA teve resultados positivos em relação ao ano de 2019, fazendo com que se deposite grandes expectativas para 2021, com um crescimento que pode ultrapassar os 25%. (ASBIA, 2020).

Tendo em vista o crescimento do setor pecuário brasileiro e a crescente demanda por tecnologias que otimizem a produção nos sistemas de criação, optou-se por realizar o estágio curricular obrigatório na Renacer Biotecnologia, empresa em ascensão no mercado de produção e comercialização de sêmen de bovinos de corte no Rio Grande do Sul. Além disso, o estágio curricular obrigatório é uma etapa de grande importância na vida acadêmica do estudante, pois nele é possível acompanhar profissionais da área de interesse e iniciar o envolvimento com a vida profissional.

2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio curricular obrigatório foi realizado no período de 08 de março a 28 de maio de 2021 na empresa Renascer Biotecnologia (Figura 1), uma Central de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) bovino, localizada na BR 472, Km 615 no Distrito de Guterrez, Barra do Quaraí – Rio Grande do Sul. O local tinha seu funcionamento das 08:00 às 12:00 e das 14:00 às 18:00 de segunda a sexta-feira. O estágio foi realizado na área de biotecnologia aplicada à reprodução de bovinos de corte, totalizando 464 horas, sob supervisão da Médica Veterinária (MV) Cecília Machado Pavin e orientação do professor MV Fernando Caetano de Oliveira.

Figura 1 – Central de Coleta e Processamento de Sêmen Renascer Biotecnologia



Fonte: Renascer Biotecnologia (2018)

A Renascer Biotecnologia deu início as suas atividades no ano de 2017, com uma proposta de difundir a genética de bovinos de corte no sul do país. Sua estrutura física é composta por uma recepção (Figura 2 – A), área de coleta (Figura 2 – B), laboratório (Figura 2 – C), estoque (Figura – D) e uma área externa de 15 hectares que comporta 60 piquetes destinados a touros residentes e 20 piquetes destinados ao quarentenário.

Figura 2 – Estrutura Física da Central de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) da Renascer Biotecnologia: Recepção (A), Área de Coleta (B), Laboratório (C), Estoque (D).



Fonte: Arquivo Pessoal (2021)

A CCPS conta com uma equipe de 19 profissionais distribuídos entre diversas funções, dentre estes, 5 são MV. A presença de MV na rotina acompanhando as coletas, e dentro do laboratório realizando todo o processo de avaliações e congelamento de sêmen, é de extrema importância para a qualidade do produto final. Além do mais, o MV é o profissional capacitado a conseguir identificar as particularidades de cada reprodutor, perceber possíveis alterações de padrões seminais e a relevância do encontrado.

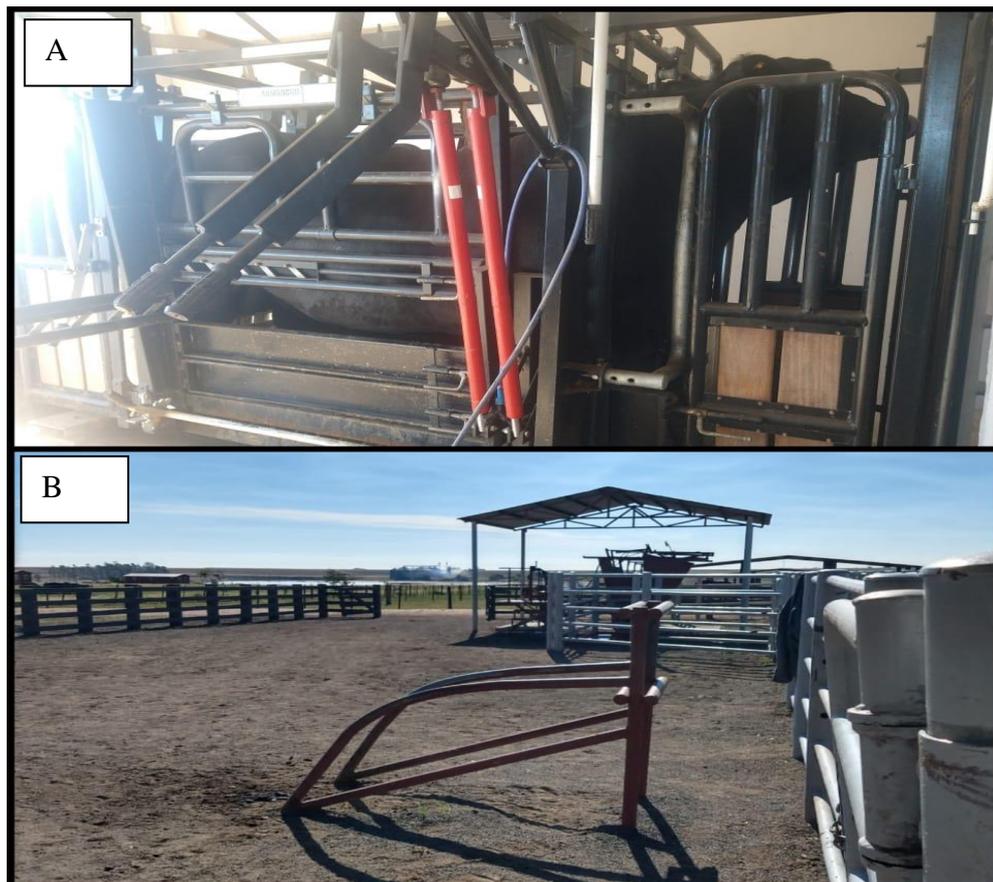
A empresa trabalha com a utilização de palhetas finas de 0,25ml para comercialização e com uma concentração de 20×10^6 espermatozoides por dose. No período acompanhado contava com, em torno de, 30 reprodutores em regime de coleta e uma produção de mais de 35.000 palhetas mensais. A CCPS possui como diferencial encaminhar ao comprador,

juntamente com a partida de sêmen adquirida, dois laudos, um contendo as avaliações realizadas pelo MV e outro fornecido pelo Sistema Computadorizado de Análise Seminal (CASA) na análise pós-congelamento.

2.1 ÁREA DE COLETA

Neste local eram realizadas todas as coletas de sêmen bovino da CCPS. O mesmo possuía um tronco de contenção, onde era realizada a coleta através do eletroejaculador (Figura 3 – A) e uma área cercada onde ficavam os animais utilizados como manequins para estímulo dos reprodutores, local onde também era realizada a coleta utilizando a Vagina Artificial (VA) (Figura 3 – B). Previamente ao momento da coleta, os touros eram mantidos em pequenos piquetes de espera individuais onde tinham visibilidade de todo o processo, como mais uma forma de estimulação do reprodutor. Havia também uma sala para o preparo das VA, que possuía uma secadora onde as mesmas eram alocadas após passarem pelo processo de lavagem. Após a sua montagem, eram postas em uma estufa para manutenção da temperatura.

Figura 3 – Área de coleta da Central de Coleta e Processamento de Sêmen Renascer Biotecnologia



Fonte: Arquivo pessoal (2021)

Os reprodutores eram divididos em 2 grupos distintos, trazidos à coleta 2 vezes na semana, respeitando-se um intervalo de 2 dias entre cada uma delas: Grupo 1, coletas nas segundas e quintas-feiras; Grupo 2, coletas nas terças e sextas-feiras, podendo este esquema ser ajustado de acordo com as particularidades de cada reprodutor. O local ainda possuía esquemas de coletas ajustados de acordo com a produção de cada reprodutor. O esquema mais utilizado é o de duas coletas no primeiro dia da semana e duas no segundo dia, havendo a possibilidade de aumento nas coletas para touros de alta produção e diminuição para touros que apresentem problemas de morfologia espermática.

As coletas eram realizadas prioritariamente através da utilização da VA, caso não fosse possível, por temperamento do reprodutor, baixo libido ou alguma injúria era realizada a coleta através do eletroejaculador.

2.2 LABORATÓRIO

O laboratório era o local onde se realizava a recepção, processamento, congelamento e avaliações do sêmen. Ele era subdividido em três áreas, um espaço destinado ao processo de análise imediata e de criopreservação (Figura 4 – A), um segundo espaço destinado a realização das avaliações e testes pós-congelamento (Figura 4 – B) e sala anexa destinada a realização da impressão das palhetas, limpeza e esterilização dos materiais (Figura 4 – C).

O laboratório contava com um espectrofotômetro (ACCUCCEL – IMV Technologies) para leitura de concentração espermática, banho-maria seco a 37°C, úmido a 33°C e mesas aquecedoras para manutenção de temperatura do ejaculado a fresco, microscópios utilizados para avaliações iniciais de motilidade e vigor, morfologia e pós-congelamento. Além disso, possuía uma impressora de palhetas, um balcão refrigerador onde se encontravam duas envasadoras (MRS1 e MRS4 – IMV Technologies), um freezer de curva programada (DIGITCOOL – IMV Technologies) para realizar a refrigeração das partidas de ejaculados. Possuía também o CASA (IVOS II – HAMILTON TORN) para avaliação pós-congelamento, descongeladores, esterilizadora e estufa.

Figura 4 – Laboratório de Processamento e Congelamento de Sêmen: Área Destinada ao Processo de Análise Imediata e de Criopreservação (A), Área Destinada a Realização das Avaliações e Testes Pós-congelamento (B) e Área Destinada a Realização da Impressão das Palhetas, Limpeza e Esterilização dos Materiais (C).



Fonte: Arquivo pessoal (2021)

3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de estágio puderam ser acompanhadas e realizadas diversas atividades da rotina de uma CCPS. Dentre as atividades acompanhadas e/ou desenvolvidas estão a admissão de reprodutores, coleta de material para exames, aplicações de medicamentos, coletas de sêmen através de VA e eletroejaculador, montagem de VA, congelamento de sêmen e avaliações pré e pós-congelamento, conforme demonstrado na Tabela 1.

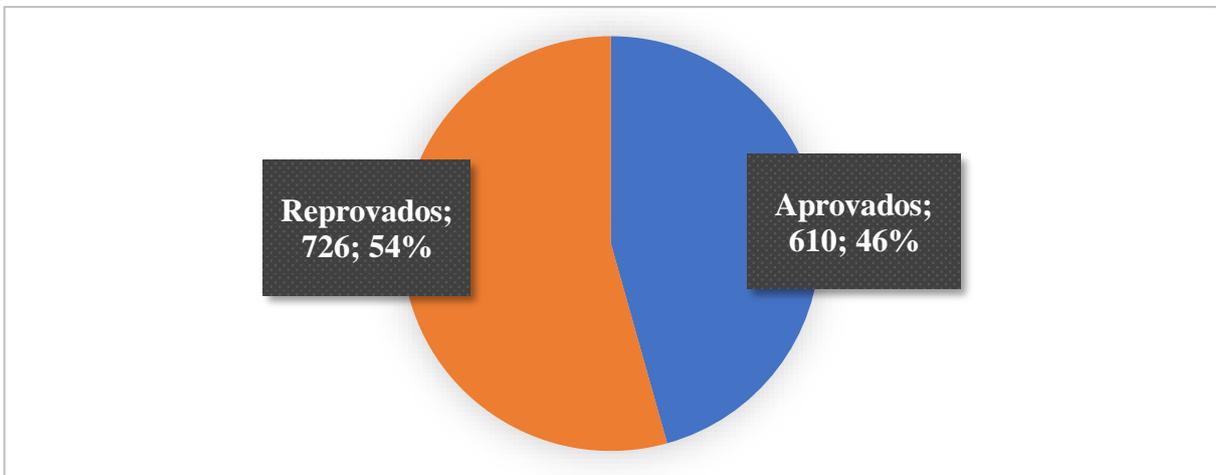
Tabela 1 – Descrição das Atividades Desenvolvidas e/ou Acompanhadas

Atividade	Número	%
Concentração espermática (espectrofotometria)	1336	17,2%
Avaliação imediata motilidade/vigor	1336	17,2%
Coleta vagina artificial	1187	15,2%
Montagem vaginas artificiais	1187	15,2%
Avaliação morfologia espermática	658	8,4%
Avaliação pós congelamento (CASA)	610	7,8%
Diluições	610	7,8%
Teste de termoresistência	487	6,3%
Coleta eletroejaculador	149	1,9%
Envase	50	0,6%
Congelamentos	50	0,6%
Teste brucelose	19	0,2%
Teste tuberculose	19	0,2%
Coleta de lavado prepucial para tricomonose	19	0,2%
Coleta de lavado prepucial para campilobacteriose	19	0,2%
Aplicação de protocolo medicamentoso contra leptospirose	19	0,2%
Coleta de sangue para exame de BVD	19	0,2%
Concentração espermática (câmara de Neubauer)	6	0,1%
Admissão de reprodutores	4	0,1%
Coleta de amostra para realização de DNA	4	0,1%
Total	7740	100%

Fonte: Arquivo pessoal (2021)

No período em que o estágio foi realizado, puderam ser acompanhados um total de 1336 ejaculados, onde, dentre estes, 46% (n=610) foram aprovados nas análises pré congelamento e 54% (n= 726) foram reprovados (Gráfico 1).

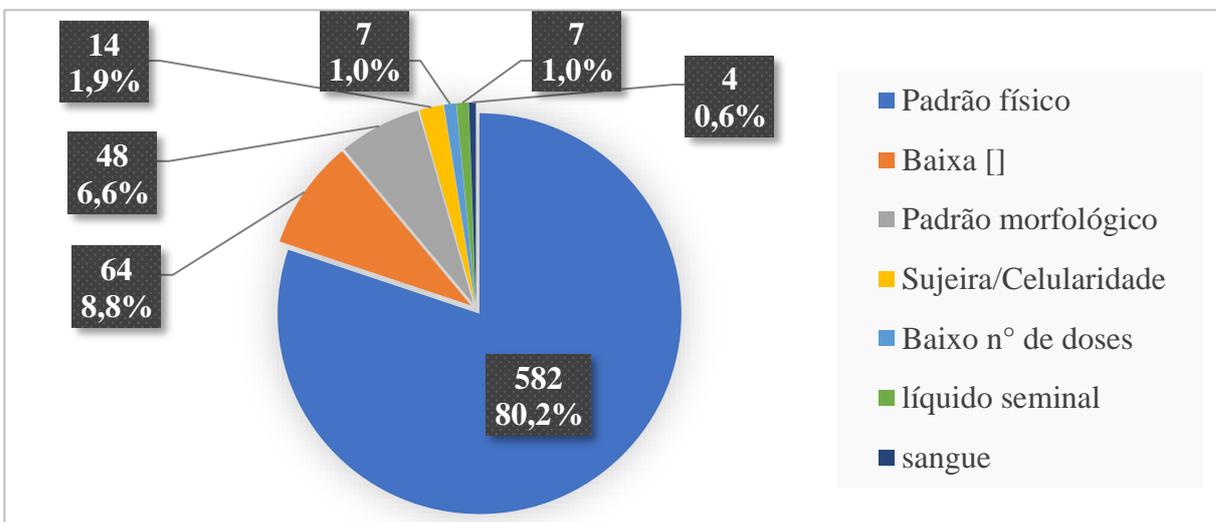
Gráfico 1 – Taxa de Aprovação de Ejaculados Acompanhados (n=1336) Durante o Período de Estágio Curricular Obrigatório.



Fonte: Arquivo pessoal (2021)

Dentre os ejaculados que foram reprovados (n=726), 80,2% (n= 582) obtiveram reprovação em decorrência do padrão físico da central para aprovação nas análises pré congelamento, de 70% de motilidade total e 3 de vigor (Gráfico 2).

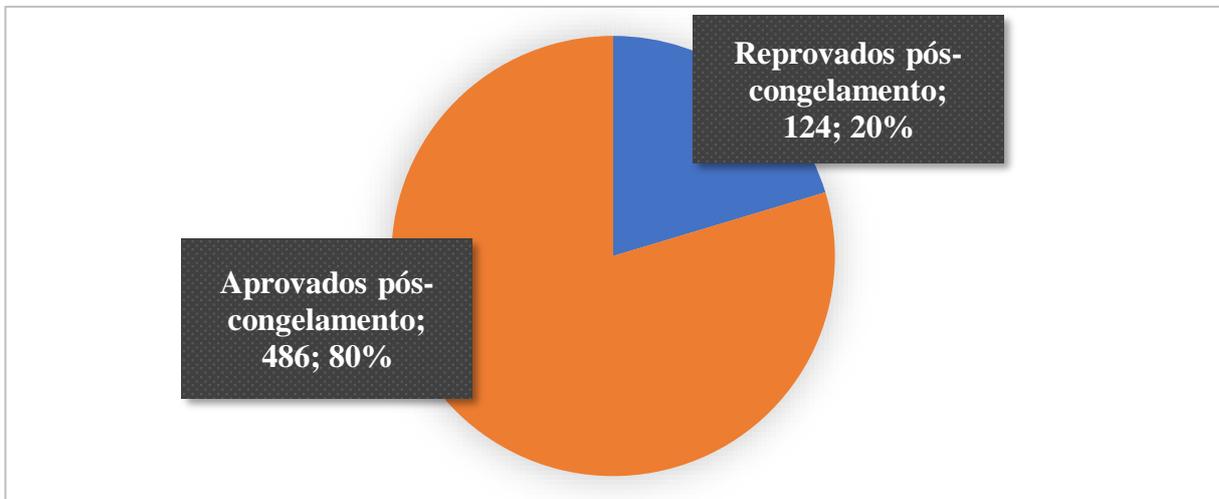
Gráfico 2 – Classificação por Motivos Pelos Quais os Ejaculados Foram Reprovados nas Análises pré Congelamento Durante Período de Estágio Curricular Obrigatório (n=726).



Fonte: Arquivo pessoal (2021)

Dentre os ejaculados aprovados e congelados (n=610) ouve uma taxa de aproveitamento de 80% (n=486) do congelamento, com apenas 20% (n=124) de reprovação na análise pós-congelamento através do CASA e teste de termoresistência (TTR). (Gráfico 3).

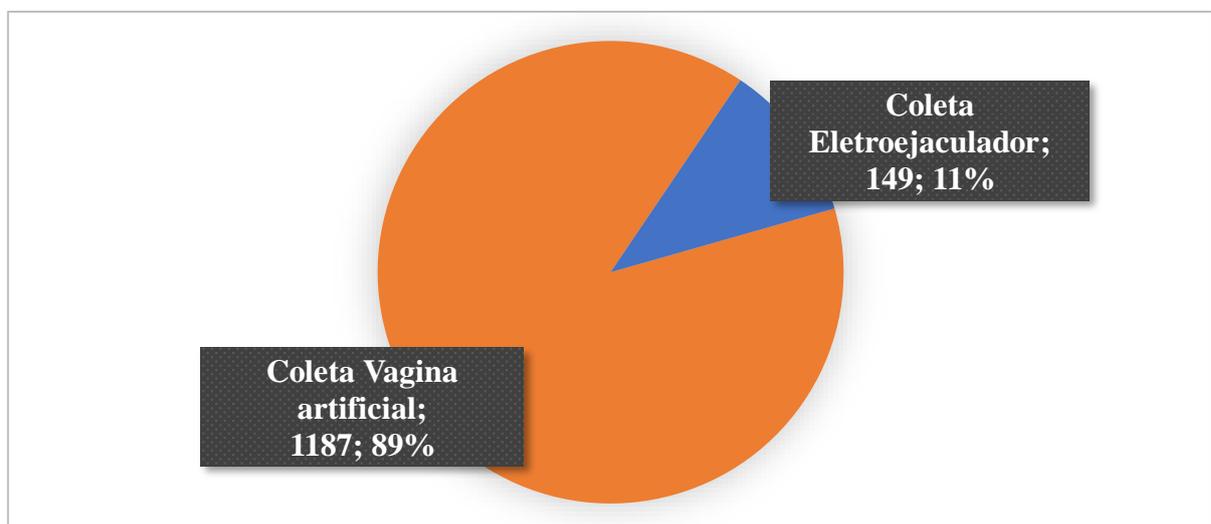
Gráfico 3 – Taxa de Aproveitamento pós Congelamento dos Ejaculados Congelados (=610)



Fonte: Arquivo pessoal (2021)

Além disso, do total de ejaculado acompanhados (n=1336), 89% (n=1187) foram coletados através da VA e apenas 11% (n= 149) coletados através do eletroejaculador. (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Percentual de Coletas Realizadas Através da VA e Através do Eletroejaculador (n=1336)



Fonte: Arquivo Pessoal (2021)

3.1 ADMISSÃO DE REPRODUTORES

Durante o estágio foi possível acompanhar a admissão de touros que chegaram a CCPS para entrarem para o grupo de animais doadores de sêmen. No momento em que o reprodutor chegava era realizada a conferência, pelo MV responsável, da documentação obrigatória exigida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para adentrar a CCPS. Essa documentação era a Guia de Trânsito Animal (GTA), a nota fiscal de origem, o atestado de animal negativo para brucelose e tuberculose e laudo emitido por um MV respaldando que na propriedade de origem não houve notificação de ocorrências de doenças transmissíveis pelo sêmen nos últimos noventa dias.

O touro era trazido ao tronco de contenção, onde era realizada coleta de material para exames do quarentenário, medidas físicas do animal como altura de garupa, profundidade do tórax, comprimento corporal, perímetro torácico, comprimento de garupa, altura dos ísquios, Circunferência Escrotal (CE) e Escore de Condição Corporal (ECC), informações necessárias para preenchimento da ficha de admissão do reprodutor (Anexo A). Após, era realizado o exame andrológico com avaliação clínica de pênis, prepúcio, escroto, testículos e epidídimos. Era realizada uma coleta de sêmen para avaliação laboratorial dos aspectos físicos e morfológicos do ejaculado e todas essas informações eram passadas para uma ficha de exame andrológico (Anexo B). Também era realizada a retirada uma amostra de pelos da base da cauda para ser realizado o exame de DNA do animal.

3.2 MANEJO SANITÁRIO E QUARENTENÁRIO

Quando o reprodutor chegava à CCPS era submetido ao período de quarentenário durante 4 semanas, onde eram realizados os testes para brucelose e tuberculose, os exames para campilobacteriose genital bovina e tricomose genital bovina, no qual são necessário três testes negativos com intervalos de 7 dias cada teste e um teste para Diarreia Viral Bovina (BVD), podendo ser realizado um segundo teste com intervalo de 21 dias caso o primeiro dê positivo Além disso, era realizada aplicação de vacinas para clostridioses e protocolo de aplicação de antibiótico para leptospirose.

Para a brucelose se realizava o Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), era realizada a coleta de sangue em um tubo de coleta sem anticoagulante, após repouso desse material, era colhida uma amostra do soro sanguíneo e posta sobre uma placa de vidro específica para a realização do teste, em seguida se adicionava o antígeno corado com rosa de bengala.

Uma homogeneização suave era realizada por 4 minutos e aquelas amostras onde houvesse a formação de grumos era considerada reagente ao teste.

Para tuberculose era realizado o Teste Cervical Simples (TCS), como teste de triagem. Era realizada uma tricotomia do local a ser realizado o teste e medida a espessura da pele com a utilização de um cutímetro, logo após era realizada a inoculação de 0,1ml de tuberculina por via intradérmica. A leitura do teste é realizada após 72 horas realizando novamente a medida da dobra de pele e subtraindo a primeira medida da segunda, sendo que, para ser considerado não reagente ao teste essa diferença deve ser $\leq 1,9$ mm.

Para campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina era realizado um lavado prepucial. Com o auxílio de uma pipeta de inseminação era instilado 50ml de solução fisiológica para o interior do prepúcio, mantido este líquido no interior enquanto se realiza uma massagem externa e após coletado esse material em um tubo falcon e distribuído entre os tubos de coleta com os meios para transporte e encaminhado ao laboratório para identificação da presença dos agentes.

Para a realização do exame de BVD era feita a coleta de sangue em um tubo de coleta com anticoagulante e encaminhado para o laboratório responsável, onde é realizado o PCR para identificação de fragmento viral. O PCR era o teste de escolha neste caso para identificação de animais persistentemente infectados (PI), que são aqueles que não desenvolvem anticorpos contra a doença. Os animais PI eles são filhos de fêmeas PI, ou então, fêmeas que adquiriram a infecção pelo vírus da BVD na fase da gestação em que o sistema imune do filhote está em formação, sendo que, nos dois casos o sistema imunológico deste animal reconhece o vírus como sendo próprio do organismo e não desenvolve o anticorpo contra a doença.

Após, passado pelo período de quarentena e estes animais forem considerados negativos ou não reagentes aos exames realizados, os touros eram considerados residentes da CCPS e então, eram submetidos a exames sanitários semestralmente. No período acompanhado nenhum reprodutor foi considerado positivo ou reagente a nenhum dos exames submetidos.

3.3 MONTAGEM DE VAGINAS ARTIFICIAIS

As VA eram montadas previamente ao início das coletas (Figura 5 – A). Para sua montagem, era acoplada na VA uma mucosa de látex e, na extremidade próxima a válvula era realizada a acoplagem do cone, na outra extremidade do mesmo era encaixado um tubo falcon que serviria de reservatório para o ejaculado. Posteriormente a montagem, a VA era preenchida

com água a uma temperatura de 40 - 45°C e então, mantidas em estufa aquecida para manutenção da sua temperatura até o momento em que seriam utilizadas (Figura 5 – B).

Após o uso as VA eram deixadas em um balde com água com a válvula aberta para que fosse realizada sua limpeza. Elas eram desmontadas e lavadas em uma solução de limpeza com detergente neutro a 3%, enxugadas e colocadas na secadora para posterior reutilização.

Figura 5 – Montagem de Vagina Artificial (A) e Manutenção de Temperatura em Estufa (B)



Fonte: Luciano Alves da Silva Júnior (2021)

3.4 COLETA COM VAGINA ARTIFICIAL

Para se realizar a coleta utilizando a VA, primeiramente devia ser realizar a limpeza do prepúcio do touro a ser coletado, a fim de evitar presença de sujidades no ejaculado. O reprodutor era trazido até a área de coleta junto às manequins para que ocorresse estimulação sexual. A coleta era realizada utilizando luvas descartáveis no momento do 3º salto, após realização de dois desvios penianos sendo estes realizados para que ocorra a limpeza do ducto espermático e liberação do pré-ejaculado. No momento da coleta o pênis era desviado e direcionado à VA, que deveria estar protegida e lubrificada, onde o ejaculado seria depositado. Após coleta, o tubo contendo o ejaculado seria identificado com o nome do touro, o número do

ejaculado e o nome do coletador, este ejaculado era então entregue ao laboratório através de um óculo e a VA deixada no local onde seria realizada limpeza.

3.5 COLETA COM ELETROEJACULADOR

Para se realizar a coleta utilizando o eletroejaculador, assim como na coleta com VA, primeiramente era realizada uma estimulação no animal através da utilização de manequins e depois, este touro era encaminhado ao tronco de contenção, onde era realizada uma limpeza do reto e prepúcio. O eletroejaculador era introduzido no reto do animal com os eletrodos direcionados ventralmente para que os estímulos elétricos atinjam as glândulas acessórias, com a intensidade sendo aumentada de forma gradativa, culminando com a ejaculação. O ejaculado era então coletado através da utilização de um cone aquecido e protegido (Figura 6) e, posteriormente, encaminhado ao laboratório.

Figura 6 – Coleta de Sêmen Realizada Através do Eletroejaculador



Fonte: Luciano Alves da Silva Júnior (2021)

3.6 RECEPÇÃO DO SÊMEN

Após a coleta, o ejaculado era encaminhado ao laboratório para ser submetido às avaliações e processamento. Em um primeiro momento, eram observados aspectos físicos, como coloração e volume, buscando identificar quaisquer possíveis alterações no sêmen. Todos os dados referentes ao sêmen e à sua coleta, eram passados para uma ficha de controle de rotina. Assim como, sua concentração, que era obtida através da utilização de espectrofotometria (ACCUCCELL – IMV Technologies), além de informações referentes ao número de palhetas e volume de diluente a ser adicionado ao ejaculado para que se obtivesse uma concentração de 20×10^6 espermatozoides por dose. Em seguida, o mesmo era submetido às avaliações a fresco.

3.7 CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

3.7.1 Espectrofotômetro

A concentração espermática na rotina era realizada através do espectrofotômetro (ACCUCCELL– IMV Technologies), um aparelho que mensura a concentração por meio da transmissão ou absorvância de luz através de uma amostra. Para a realização da concentração era utilizada uma cubeta contendo $3960 \mu\text{l}$ de solução fisiológica, adicionada uma amostra de $40 \mu\text{l}$ do ejaculado a ser analisado, feita a homogeneização do conteúdo e realizada a leitura. Para que o aparelho pudesse nos fornecer os dados de número de palhetas e volume de diluente a se acrescentar, era necessário adicionar ao espectrofotômetro o volume do ejaculado e a concentração desejada por palheta.

3.7.2 Câmara de Neubauer

A concentração espermática através da câmara de Neubauer não era realizada na rotina da CCPS, porém como tinha disponível no local, foram realizadas algumas concentrações através dessa técnica, a fim de poder realizar a comparação com o espectrofotômetro. Para a contagem da câmara de Neubauer era adicionado em um tubo falcon $3980 \mu\text{l}$ de água destilada e $20 \mu\text{l}$ do sêmen a ser avaliado. Após a homogeneização e montagem da câmara com a lamínula era realizado o preenchimento dos dois lados dela com um amostra deste conteúdo. A câmara era mantida em repouso por 5 minutos para que ocorra a sedimentação das células e posteriormente contado 5 quadrados grandes de cada um dos seus lados em microscópio, sendo aceita uma variação na contagem de até 10% entre os lados. O valor obtido de cada lado é somado e realizada uma média, onde o resultado será em milhões/ml.

3.8 AVALIAÇÕES PRÉ-CONGELAMENTO

3.8.1 Análises Imediatas

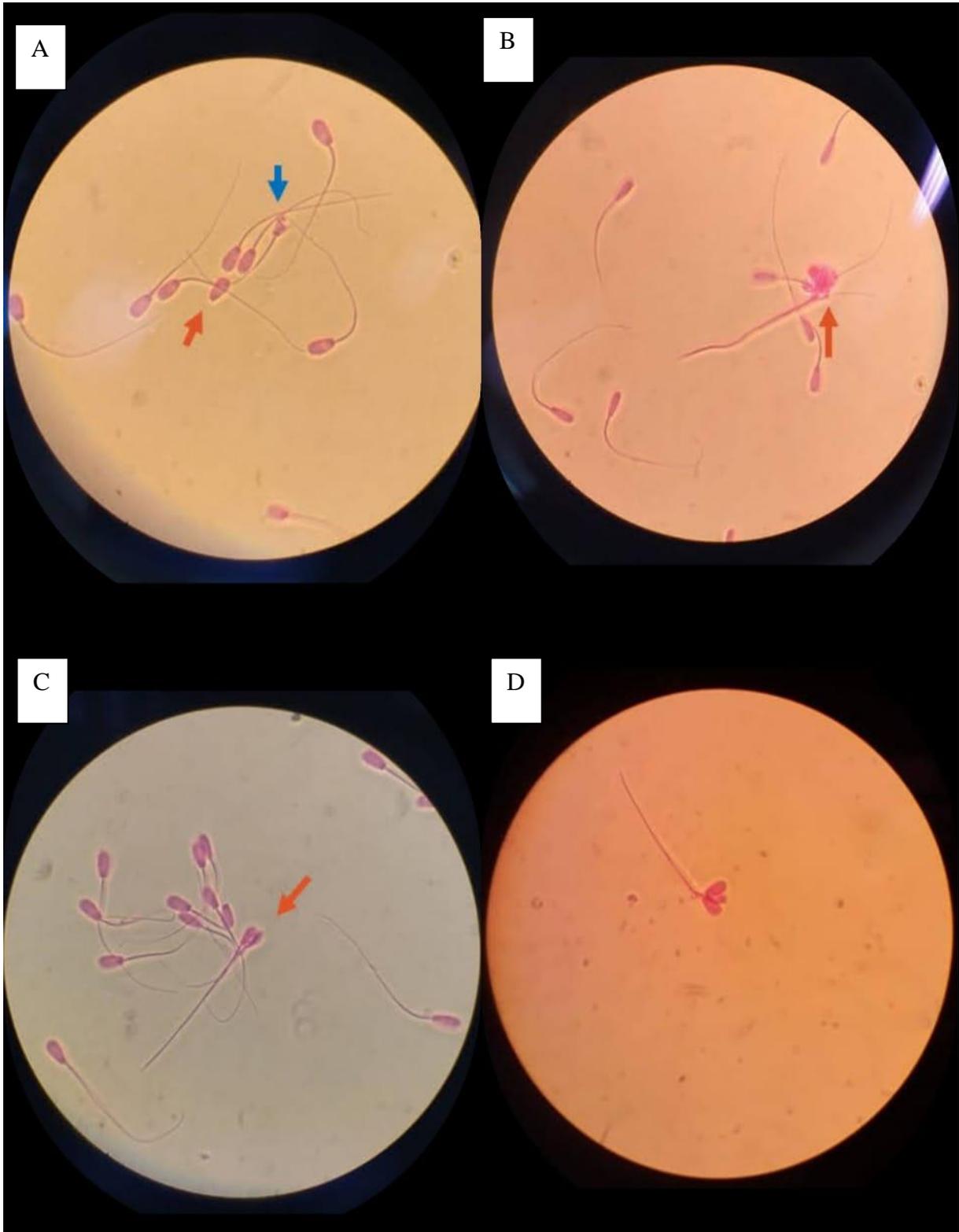
Após a recepção, o ejaculado passava por uma série de avaliações para que fosse verificado se o mesmo possuía qualidade suficiente para resistir ao processo de congelamento. Para isto, era pega uma amostra de 10 μ l de sêmen e diluída em 100 μ l de diluente, após uma amostra de 10 μ l desse sêmen diluído era posta entre lâmina e lamínula e observada em microscópio óptico em aumento de 10X. Neste momento, era realizada avaliação de motilidade e vigor, onde a CCPS exigia motilidade total $\geq 70\%$, sendo ela avaliada em uma escala de 0 a 100%, e vigor ≥ 3 , em uma escala de 0 a 5, para considerar um ejaculado aprovado.

3.8.2 Avaliação da Morfologia Espermática

Os ejaculados aprovados na análise imediata eram encaminhados à morfologia espermática. Para realização desta avaliação coletava-se uma amostra de 10 μ l do ejaculado para ser colocado em um micro tubo com 250 μ l de rosa de bengala previamente diluído com formol citrato a 4%. Era realizada a homogeneização da amostra e retirada uma quantidade de 10 μ l para ser observado em microscópio óptico através da técnica de câmara úmida (Figura 7).

Era realizada a contagem de 200 células, avaliando sua morfologia. Nessa avaliação era necessário que se tivesse $\geq 70\%$ de espermatozoides normais, já a quantidade de células defeituosas não pode ultrapassar 30%, sendo que, destes defeitos não pode ultrapassar de 20% de defeitos maiores e também nenhum defeito muito discrepante dos demais. Essas informações eram anotadas na folha de morfologia espermática de todos os ejaculados analisados (Anexo C). Caso o ejaculado fosse aprovado na avaliação morfológica era realizada a sua diluição e congelamento.

Figura 7 – Visualização de Defeitos em Morfologia Espermática Através da Técnica de Câmara Úmida: Defeito de Acrossoma Indicado Pela Seta em Azul e Cabeça Isolada Normal Indicada Pela Seta em Vermelho (A), Forma Teratogênica Indicada Pela Seta em Vermelho (B), Forma Dupla Indicada Pela Seta em Vermelho (C) e Forma Tripla (D)



Fonte: Arquivo pessoal (2021)

3.9 DILUIÇÃO

Na CCPS Renascer Biotecnologia, utilizava-se na rotina o diluente comercial (OptiXcell – IMV Technologies), sem proteína de origem animal. O preparo do mesmo era realizado a partir da diluição de 250mL de diluente em 500mL de água deionizada e posteriormente mantido em banho-maria a 34°C. (Figura 8).

Figura 8 – Preparação de Diluente



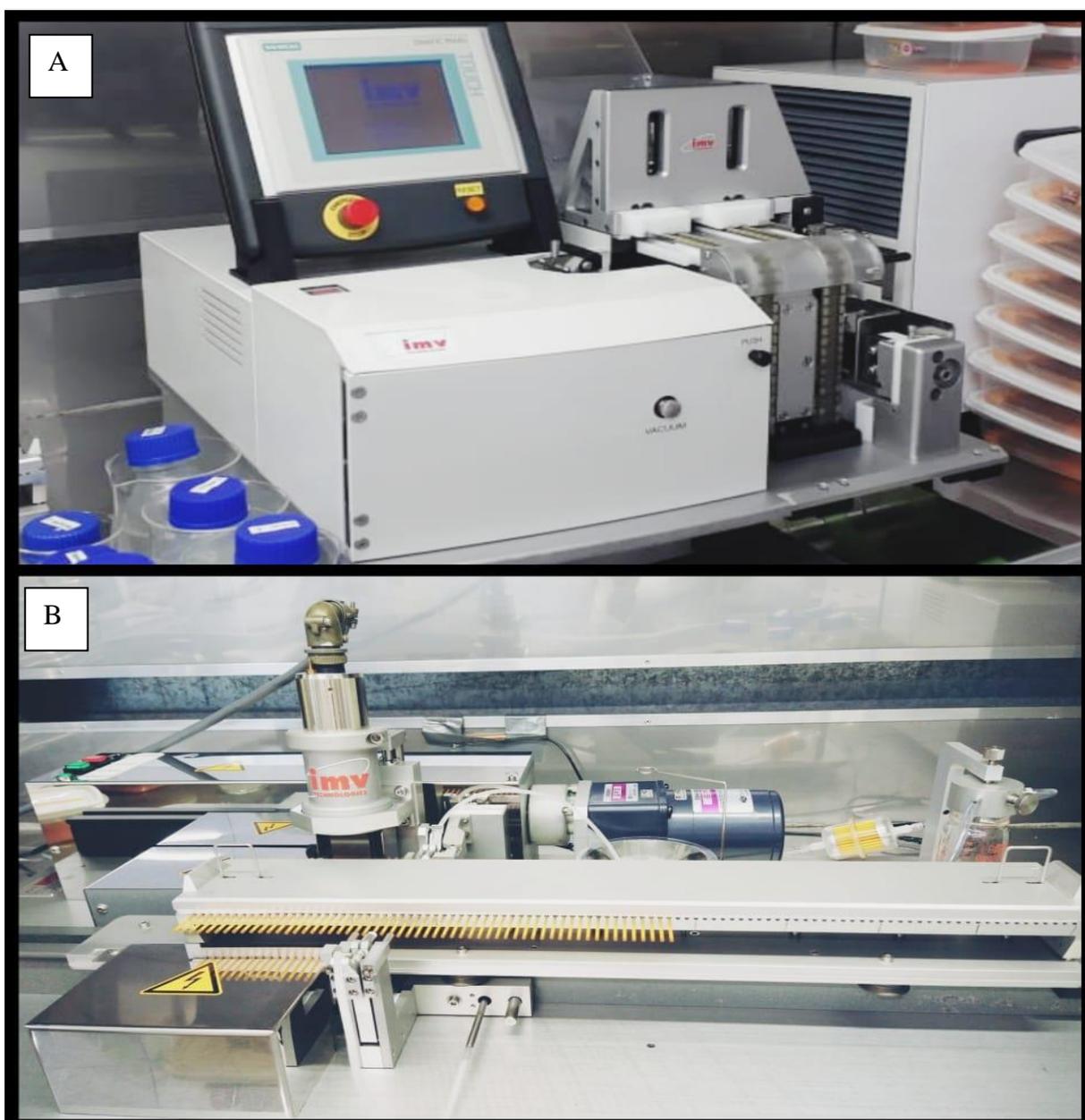
Fonte: Arquivo pessoal (2021)

Os ejaculados aprovados em todas as análises pré-congelamento passavam por processo de diluição, que era dividido em duas etapas, a diluição inicial, onde adicionava-se ao sêmen volume de diluente igual do ejaculado (1:1) e, 15 minutos após a mesma, dado tempo para o ejaculado adaptar-se ao meio, era realizada a diluição final, onde acrescentava-se o volume restante de diluente. Após este processo, o ejaculado era encaminhado ao processo de resfriamento, que ocorria no balcão refrigerador, onde permanecia por um período mínimo de 4 horas, atingindo uma temperatura de 4°C para posterior congelamento.

3.10 ENVASE E CONGELAMENTO

Para realizar o congelamento deve ser aguardado um período mínimo de resfriamento do ejaculado diluído de 4 horas. Neste período, era realizada a impressão das palhetas e realizada a montagem das agulhas que serão utilizadas para o envase. O envase e congelamento era realizado no período da tarde com utilização de 2 envasadoras automáticas, a MRS4(Figura 9 – A), para ejaculados com número de doses superior a 150 palhetas e a MRS1(Figura 9 – B), para envase de ejaculados com número de doses inferior a 150 palhetas.

Figura 9 – Envasadoras: MRS4 (A) e MRS1 (B)



Fonte: Arquivo pessoal (2021)

Após envase, as palhetas são dispostas em grades, onde era realizada contagem e controle de qualidade do envase e selagem das mesmas (Figura 10). Posteriormente, estas grades eram levadas a um freezer de temperatura controlada (DIGITCOOL – IMV Technologies), estabilizado a uma temperatura igual a de resfriamento (4°C) para que não haja choque de temperatura na transferência das palhetas do refrigerador ao freezer. No freezer elas eram congeladas utilizando vapor de nitrogênio e permaneciam por cerca de 8 a 10 minutos, até atingirem uma temperatura de -140 °C e posteriormente, retiradas e imersas em nitrogênio líquido a -196 °C nos botijões criogênicos. No momento da retirada do freezer eram separadas 3 palhetas de cada partida, que seriam utilizadas na avaliação pós congelamento e no TTR.

Figura 10 – Contagem de Palhetas e Controle de Qualidade do Envase

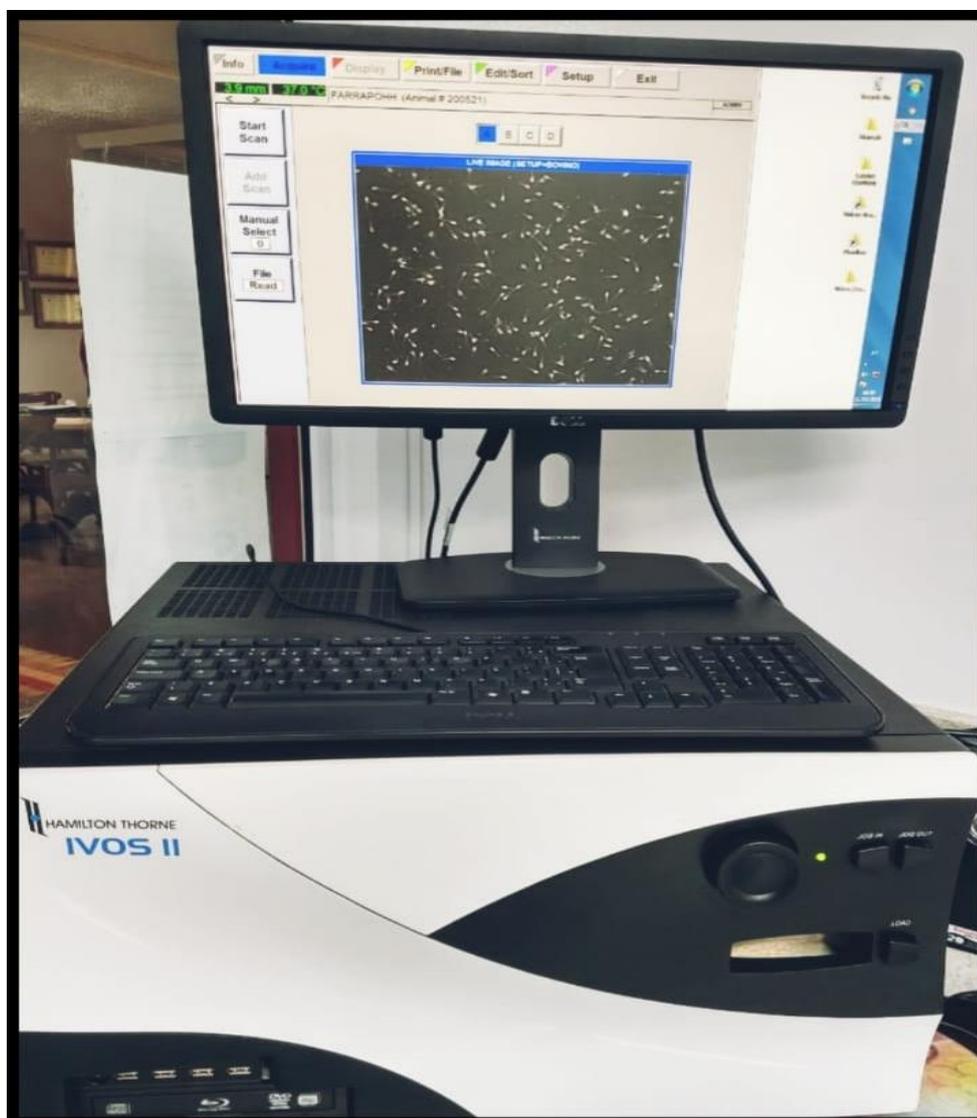


Fonte: Arquivo Pessoal (2021)

3.11 AVALIAÇÃO PÓS-CONGELAMENTO

Para a avaliação pós-congelamento duas palhetas de cada touro, escolhidas ao acaso, eram descongeladas em banho-maria a 36°C por um período de 15 minutos. Era realizado em micro tubo um *pool* de seu conteúdo e o sêmen era diluído em OptiXcell em uma proporção de 1:2 (sêmen: diluente) para que pudesse ser submetido às avaliações computadorizada e subjetiva. Desta amostra, 3 μ L eram levados em lâmina específica (Leja – IMV Technologies) ao CASA (IVOS II Hamilton Thorne) (Figura 11) onde eram avaliadas a concentração, que deve ser $\geq 20 \times 10^6$ espermatozoides por palheta, motilidade total e progressiva, ambas avaliadas em uma escala de 0 a 100%, sendo considerados aprovados ejaculados com motilidade total $\geq 35\%$ e progressiva $\geq 20\%$.

Figura 11 – Sistema de Análise Seminal Computadorizada (CASA)



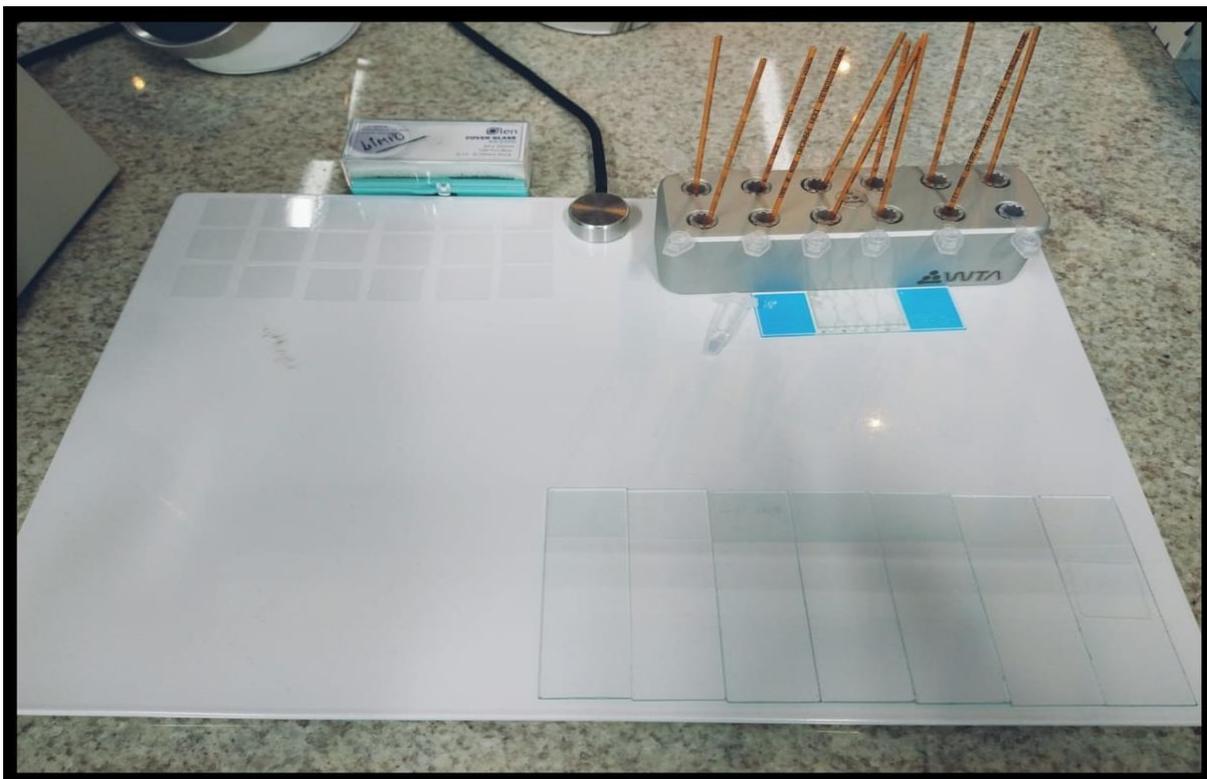
Fonte: Luciano Alves da Silva Júnior (2021)

Simultaneamente a avaliação computadorizada, era feita por um MV a avaliação subjetiva de motilidade e vigor em microscópio óptico onde, segundo o padrão da CCPS, para obter aprovação nesta avaliação era necessário que se obtivesse no mínimo 30% de motilidade total e 2 de vigor. Aquelas partidas reprovadas nas avaliações pós-congelamento eram descartadas.

3.12 TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA

Os ejaculados aprovados na análise pós-congelamento, eram submetidos ao TTR (Figura 12). O TTR utilizado na Renascer Biotecnologia era considerado o fisiológico, para realização do teste uma palheta de sêmen de cada touro era colocada em um descongelador a 36°C, onde permanecia durante 3 horas, a fim de, mimetizar algumas das condições que seriam encontradas pelo espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea, no momento da inseminação. Passado o período das 3 horas o sêmen tinha sua motilidade e vigor avaliados sob microscopia óptica, onde, para ser considerado aprovado, era necessário que o mesmo apresentasse motilidade total $\geq 20\%$ e um vigor ≥ 2 , sendo dessa forma liberado para o raqueamento e posterior comercialização.

Figura 12 – Mesa preparada para realização de TTR



Fonte: Arquivo pessoal (2021)

4 DISCUSSÃO

4.1 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

A criopreservação de sêmen é o método pelo qual é possível manter o potencial genético, de touros superiores, armazenados por tempo indeterminado. A técnica consiste em diminuir a atividade metabólica do espermatozoide até que ele entre em estado de anabiose, onde o metabolismo é suspenso temporariamente até que seja reativado, através do descongelamento. (GONÇALVES et al, 2016, p. 71 – 81).

Esse processo tem como principal objetivo a obtenção de gestações, através da inseminação artificial, de maneira tão eficaz quanto através da monta natura. (HAFEZ; HAFEZ, 2004, p. 435 – 445). Contudo, esse impacto genético pode ser limitado, pelo fato de o processo de criopreservação danificar organelas e membranas dos espermatozoides além de induzir a capacitação espermática precocemente, sendo necessário que ocorra uma modernização dos protocolos e processos. (WATSON, 1995, p. 871 – 891) (GARNER et al., 2001, p. 31 – 40) (KUMAR et al., 2003, p. 24 – 53).

O processo de criopreservação tem como início as avaliações imediatas do ejaculado, observando padrões físicos e morfológicos, segue através da diluição, refrigeração e congelamento do ejaculado, e finaliza através da realização da análise pós congelamento. Após a análise pós congelamento a CCPS acompanhada também realizava o TTR como mais uma forma de avaliação deste ejaculado.

4.1.1 Análises Físicas e Morfológicas

Nas avaliações físicas são observados o volume do ejaculado, coloração, odor, concentração, motilidade total e vigor. A classificação de motilidade do ejaculado é medida em porcentagem de 0% a 100%, onde é desejável que se possua $\geq 60\%$ de motilidade, o vigor é classificado em uma escala de 1 a 5, onde é desejável que possua ≥ 3 de vigor. (CBRA, 2013, p. 15 -30).

Na avaliação morfológica se observam a presença de anormalidades nos espermatozoides, onde é realizada a contagem de 200 células e necessário que se tenha $\geq 70\%$ de células normais e $\leq 30\%$ de células com defeitos, sendo que, destes defeitos $\leq 20\%$ podem ser maiores e $\leq 10\%$ menores. (CBRA, 2013, p. 79 -90). A morfologia espermática é importante para identificação de ejaculados com baixo potencial de fertilização. (JANUSKAUSKAS; ZILINSKAS, 2002, p. 1 – 8).

A CCPS acompanhada utilizava como padrões para aprovação, uma motilidade total de $\geq 70\%$ e o padrão de vigor o mesmo indicado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). A morfologia espermática era realizada baseada na classificação de BLOM (1972 p. 1-36) também indicada pelo CBRA, de defeitos maiores e menores.

BLOOM (1972 p. 1-36) considera como defeitos maiores aqueles que possam causar prejuízos a fertilidade como: subdesenvolvimento, formas duplas, diadema, estreito na base, contorno anormal, cabeça isolada anormal, defeitos de peça intermediária, defeitos de acrossoma, cabeça pequena anormal, cabeça piriforme e cauda fortemente dobrada ou enrolada. Como defeitos menores considera cabeça pequena normal, cabeça gigante, curta e achatada, cabeça isolada normal e cauda dobrada ou enrolada.

A avaliação da morfologia espermática possui duas técnicas de realização preconizadas, a avaliação através de esfregaço corado e através da câmara úmida. (CBRA, 2013, p. 79 - 90). A técnica utilizada no local de estágio era a de câmara úmida corada com rosa de bengala, essa técnica segundo FRENEAU (2010, p. 176 – 181) possui vantagens em relação ao esfregaço corado por ter uma maior detecção de defeitos de acrossoma, crateras e *pouch formation*. Além disso, a técnica de esfregaço corado possui uma maior interferência do emprego da técnica, com um aumento no encontro de defeitos de cauda e cabeças isoladas normais.

4.1.2 Diluição

Para que o sêmen possa passar pelo processo de congelamento é necessário a adição de meios diluidores, que serão responsáveis por fornecer uma fonte de energia para esse espermatozoide, a fim de que, ele armazene a sua própria energia, presente nas mitocôndrias, para a posterior fertilização. Além disso os diluentes são responsáveis também, por manter o equilíbrio eletrolítico e osmótico, inibir crescimento bacteriano com a presença de antibióticos, evitar variações de pH, aumentar o volume do ejaculado e realizar a proteção do espermatozoide ao processo de congelamento. (HAFEZ; HAFEZ, 2004, p. 435 – 445).

Os diluentes podem ser classificados em crioprotetores intracelulares e crioprotetores extracelulares ou de membrana. Os crioprotetores intracelulares mais utilizados são o glicerol, acetamida, dimetilsulfóxido e etilenoglicol, e os crioprotetores extracelulares mais difundidos são a gema de ovo, o leite e o extrato de soja. (FICKEL et al., 2007, p. 81 – 89). Os protetores de membrana têm como ação a ligação das lipoproteínas com a membrana da célula espermática conferindo proteção ao espermatozoide durante o choque térmico. (BOUCHARD et al., 1990).

Durante o estágio, a diluição era realizada utilizando o OptiXcell[®], um diluente a base de lipossomas sintéticos caracterizado como um crioprotetor de membrana. Possui todas as condições necessárias que um bom diluente necessita, com o diferencial de possuir uma base crioprotetora sintética, fazendo com que se tenha uma maior biossegurança, comparados a outros que possuem como crioprotetor, um produto de origem animal.

Os diluentes possuem como desvantagem uma antecipação na capacitação do espermatozoide, através da perda da reorganização da membrana plasmática, isso faz com que se tenha uma diminuição no tempo de sobrevivência da célula e uma menor capacidade de interação com o trato reprodutivo da fêmea. (MEDEIROS et al, 2002, p. 327 – 344)

4.1.3 Congelamento

Existem diversos meios utilizados para o congelamento de sêmen, utilizando gelo seco, ar líquido, oxigênio líquido e nitrogênio líquido. O local utilizava vapor de nitrogênio para o processo de congelamento e nitrogênio líquido para o armazenamento. O nitrogênio líquido ganhou espaço por, além de poder ser utilizado no processo de congelamento, ser também, o refrigerador de eleição para estocagem a longo prazo. (HAFEZ; HAFEZ, 2004, p. 435 – 445).

O sêmen necessita de um intervalo de algumas horas antes da realização do congelamento, esse processo é chamado de resfriamento. Essa etapa se faz necessária para que o espermatozoide interaja com o meio diluidor, diminua seu metabolismo e desenvolva uma máxima resistência ao congelamento evitando o choque térmico. (ENGLAND,1992) (WATSON, 1979, p.283-330) (JASKO, 1994, p. 156 – 165).

Durante o resfriamento existe uma faixa de temperatura considerada crítica ao espermatozoide bovino, que está compreendida entre os 15°C e 5°C. (DE LEEUW et al., 1990, p. 171 – 183) (WATSON, 2000, p. 481 – 492) (AGCA; CRITSER, 2002. p. 15-23). Nesta faixa de temperatura ocorre a transição do ejaculado de estado líquido para o estado de gel e, caso não seja resfriado adequadamente, pode levar a danos celulares que resultaram em perda de motilidade e conseqüentemente fertilidade. (GRAHAM, 1996) (WATSON, 1995, p. 871 – 891).

Nas etapas de resfriamento acompanhadas, os ejaculados, após sua diluição final, eram mantidos em um balcão refrigerador a uma temperatura de 4-5°C, eram alocados em um Becker de vidro com água para que não ocorresse choque de temperatura e o ejaculado fosse resfriando de maneira gradual. Neste balcão refrigerador eram mantidos por um período mínimo de 4 horas para posterior congelamento.

Segundo WATSON (2000, p. 481 – 492) os efeitos deletérios das condições impostas aos espermatozoides pelo processo de criopreservação possuem uma relação direta com a velocidade da curva de congelamento utilizada. Quando a curva é lenta possui tempo hábil para que ocorra a desidratação do espermatozoide evitando a formação de cristais de gelo intracelulares, porém a concentração de solutos elevada pode causar danos a célula. E quando a curva é rápida ocorre a formação de cristais de gelo intracelulares, pela não ocorrência de desidratação do espermatozoide, além das concentrações intra e extracelulares se manterem semelhantes gerando um estresse osmótico e danos a célula. (WATSON, 2000, p. 481 – 492) (LEITE et al., 2011, p. 31 – 38) (SIEME et al., 2015, p. 20 – 26).

No local de estágio era utilizado para o congelamento de sêmen um freezer de curva programada específica para sêmen bovino com as seguintes temperaturas de congelamento, partindo dos 4°C, 10°C/min até atingir -20°C, após 20-40°C/min até atingir -140°C. Considerada uma curva de congelamento intermediária, com o intuito de minimizar os danos causados tanto pelo congelamento rápido quanto pelo congelamento lento, estando de acordo com MAZUR (1977, p.251-272) que diz que uma curva de congelação ótima deve ser lenta o suficiente para prevenir a formação do gelo intracelular, porém rápida o bastante para prevenir as crioinjúrias ligadas aos efeitos osmóticos.

Dentre os danos causados pelo processo de congelamento, caso não seja conduzido de forma adequada com respeito aos protocolos e curvas, pode se observar um aumento no número de patologias encontradas como danos no acrossoma e em outras estruturas, fragmentação do DNA e redução da capacidade fecundante por alterações da concentração de eletrólitos intracelulares. (BARBAS; MASCARENHAS, 2009) (KÜÇÜK et al., 2014, p. 327 – 331).

Segundo FILHO (1970, p. 375 – 394) em média 50% dos espermatozoides são perdidos durante esse processo, deste modo deve se realizar uma nova avaliação após o congelamento. Comumente essa avaliação é realizada de forma subjetiva por meio da visualização sob microscopia óptica, porém existe a possibilidade de utilização do CASA, um sistema computadorizado que elimina a subjetividade da avaliação, além trazer dados relacionados a cinética espermática. (ARRUDA, et al., 2005, p.145-150) (CRESPILHO, et al., 2006, p. 1507 – 1510) (FERREIRA, et al., 1997, p. 131 – 132) (JANUSKAUSKA; ZILINSKAS, 2002, p. 1 – 8).

Para isso a CCPS acompanhada utilizava as duas formas de avaliações, a subjetiva realizada pelo MV e a computadorizada através do CASA. Na avaliação subjetiva era observada motilidade total e vigor, enquanto no CASA se observava motilidade total e motilidade

progressiva. Além disso, o CASA gera diversos dados em relação a cinética espermática que ainda necessitam ser estudado, por esse motivo era armazenado em um banco de dados todas as informações geradas para posterior utilização em futuros estudos. Apesar de, segundo VERSTEGEM, et al. (2002, p. 149 – 179) ainda existirem controvérsias em relação a correlação da cinética espermática com índices de fertilidade a campo, pode se observar diferenças expressivas nos padrões de movimento em sêmens que alcançaram altas e baixas taxas de fertilização.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As biotecnologias reprodutivas estão em constante aumento, acompanhando o cenário de crescimento da pecuária brasileira e exigindo cada vez mais do mercado, mão de obra qualificada. A criopreservação de sêmen tem como vantagem a manutenção de material genético por longos períodos de tempo, porém necessita ainda de muitos estudos em relação a manutenção da qualidade seminal após o congelamento e descongelamento.

Durante o estágio tive a oportunidade de conhecer um pouco sobre o processo de criopreservação de sêmen e conhecer, também, a realidade de uma central de coleta e processamento de sêmen bovino. Além disso pude aprender e conviver com profissionais extremamente competentes em suas funções, o que tornou a escolha do local fundamental para o bom andamento do estágio, aperfeiçoamento acadêmico e profissional.

REFERÊNCIAS

- AGCA, D. V. M.Y.; CRITSER, J. K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. **Seminars in Reproductive Medicine**, p. 15-23, 2002.
- ARRUDA, R. P. *et al.* Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Sci Vet**, p.145-150, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Beef report 2020**: Perfil da pecuária no Brasil. Disponível em < <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/>>.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. **Produção de doses de sêmen cresce 36% no Brasil em 2020**. Minas Gerais, 2020. Disponível em < <http://www.asbia.org.br/producao-de-doses-de-semen-cresce-36-no-brasil-em-2020/>>.
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, 2009.
- BARUSELLI, P.S. **Mercado da IATF cresce 30% em 2020 e supera 21 milhões de procedimentos**. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 5. ed., 2021. Disponível em < <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>>
- BLOOM, E. **A systematic search for abnormalities in testis-epididymis in pedigree bulls in Denmark**. Copenhagen: Royal Veterinary and Agricultural University, p. 1-36, 1972.
- BOUCHARD, G. F. *et al.* Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. **Theriogenology**, 1990.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, p. 15 -30, 2013.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, p. 79 - 90, 2013.
- CRESPILHO, A. M., LANDIM-ALVARENGA, F.C., PAPA, F. O. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. **Ciênc Rural**, p. 1507 – 1510, 2006.
- DE LEEUW, F.E. *et al.* Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, p. 171 – 183, 1990.
- ENGLAND, G.C.W. **The criopreservation of dog semen**. Thesis submitted for Fellowship of Royal College of Veterinary Surgeons. London, 1992.
- FERREIRA, J. C. P., NEVES NETO, J. R., PAPA, F. O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Rev Bras Reprod Anim**, p. 131 – 132, 1997

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **Eur J Wildl Res**, p. 81 – 89, 2007.

FILHO, A. M. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 2. ed. Porto Alegre, RS: Sulina, p. 375 – 394, 1970.

FRENEAU, G. E.; CHENOWETH, P. J.; RUPP, E. R. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Anim Reprod Sci**, p. 176 – 181, 2010

GARNER, D.L. *et al.* Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, p. 31 – 40, 2001.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicada à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, p. 71 – 81, 2016.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Veterinarian Clinical of North America Equine Practice**, 1996.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. [coordenador de tradução da 7.ed. original Renato Campanarut Barnabe]. – Barueri, SP: Manole, p. 435 – 445, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Censo 2021**: Rebanho brasileiro tem leve alta em 2019, após dois anos seguidos de queda. Disponível em <<https://censo2021.ibge.gov.br/2012-agencia-de-noticias/noticias/29164-rebanho-bovino-tem-leve-alta-em-2019-apos-dois-anos-seguidos-de-queda.html>>.

JANUSKAUSKAS, A; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Vet Zootech**, p. 1 – 8, 2002.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars. Veterinaria**, p. 156 – 165, 1994.

KÜÇÜK, N. *et al.* Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. **Cryobiology**, p. 327 – 331, 2014.

KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**. p. 24 – 53, 2003.

LEITE, T.G. *et al.* Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, p. 31 – 38, 2010.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, p.251-272, 1977.

MEDEIROS, C. M. O. *et al.* Current status of sperm cryopreservation: why isn't better? **Theriogenology**, p. 327 – 344, 2002.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, p. 215 – 225, 2006.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 20 – 26, 2015.

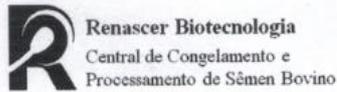
VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M, ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, p. 149 – 179, 2002.

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

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility Development**, p. 871 – 891, 1995.

WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. In: FINN, C. A. **Oxford reviews of reproductive biology**. New York: Oxford Univ Press., p.283-330, 1979.

ANEXO A – FICHA DE ADMISSÃO DO REPRODUTOR

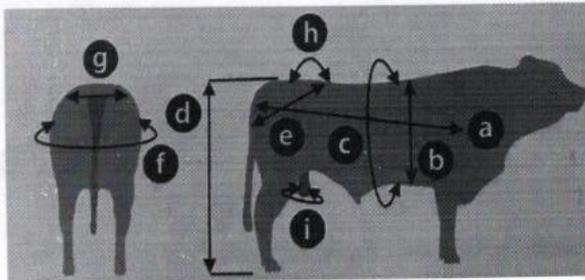


ADMISSÃO DO REPRODUTOR

Data:		
Nome do Touro:		
Raça:	Registro:	Nascimento:
Proprietário:		Contato:
Profissional responsável:		Contato:

Peso: _____ Kg

Tatuagem: _____



- | |
|---------------------------------|
| a - Comprimento Corporal (cm): |
| b - Profundidade de Tórax (cm): |
| c - Perímetro torácico (cm): |
| d - Altura de Garupa (cm): |
| e - Comprimento de Garupa (cm): |
| f - Distância dos ísquios (cm): |
| g - Distância dos ísquios (cm): |
| i - Perímetro Escrotal (cm): |

Escore Corporal:

1 () 2 () 3 () 4 () 5 ()

Exame Clínico:

Intervenção Farmacológica:

BR 472 - Km 615 - Barra do Quaraí/RS – Brasil

contato@renascerbiotecnologia.com.br
 (55) 99999-3141
 Renascer Biotecnologia

ANEXO B – FICHA DE AVALIAÇÃO DE EXAME ANDROLÓGICO



Renascer Biotecnologia
Central de Congelamento e
Processamento de Sêmen Bovino

Exame Andrológico

Nome do Touro:		
Raça:	Registro:	Nascimento:
Proprietário:		Contato:

Exame Clínico Específico

PREPÚCIO:	PÊNIS:	
ESCROTO:	CE:	
	Esquerdo	Direito
TESTÍCULOS		
Consistência		
Mobilidade		
EPIDÍDIMO (Consistência / Sensibilidade)		
Cabeça		
Corpo		
Cauda		
AMPOLAS do Ducto Deferente:		
GLANDULAS VESICULARES		
Sensibilidade		
Mobilidade		
PRÓSTATA (cm)		

Sêmen

Volume:	Aspecto:
Motilidade:	Vigor:

Observações:

FE: Fibro Elástica

* S/A: Sem alterações

BR 472 - Km 615 - Barra do Quaraí/RS – Brasil



contato@renascerbiotecnologia.com.br



(55) 99999-3141



Renascer Biotecnologia

ANEXO C – FOLHA DE AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

ROTINA:					
MORFOLOGIA ESPERMÁTICA					
TOURO					
DEFEITOS MAIORES: (%)					
Estreito na base					
Cabeça piriforme					
Contorno anormal					
Cabeça pequena anormal					
Cabeça isolada anormal					
Subdesenvolvido					
Formas duplas					
Gota citoplasmática proximal					
Defeitos de acrossoma					
Diadema (pouch formation)					
Defeitos na peça intermediária					
Cauda fortemente dobrada					
Cauda enrolada na Cabeça					
Cauda enrolada c/ GCD					
DEFEITOS MENORES (%)					
Cabeça estreita/gigante					
Implantação oblíqua, retroaxial					
Cabeça isolada normal					
Cauda dobrada ou enrolada					
Outros					
Gota citoplasmática distal					
Implantação Abaxial					
TOTAL NORMAIS: %					
DEFEITOS MAIORES: %					
DEFEITOS MENORES %					
Responsável pelo Exame:					