

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Orientador: Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas

Diego do Nascimento Couto

Uruguaiana, junho de 2018

DIEGO DO NASCIMENTO COUTO

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária

Orientador: Fabio Gallas Leivas
Médico Veterinário, Msc, Dr.

**Uruguaiana
2018**

DIEGO DO NASCIMENTO COUTO

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Bovina e Biotecnologia da Reprodução.

Relatório apresentado e defendido em 06 de junho de 2018.

Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas
Orientador

Prof.^a Dr.^a. Daniela dos Santos Brum
Medicina Veterinária/ Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita
Medicina Veterinária/ Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Dedico esta conquista a minha família, meus pais Franco e Mariza, meus irmãos Flávio e Murillo e minha esposa Emily, vocês foram meus alicerces nessa longa e difícil caminhada. Obrigado pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

AGRADECIMENTO

Quero agradecer primeiramente a Deus, pela força, coragem e persistência, por me guiar e iluminar durante essa difícil caminhada até este momento.

Em especial a minha família, meus pais Franco e Mariza, pois diante de todas as dificuldades estiveram presentes apoiando e incentivando para que eu pudesse concluir o sonho da graduação, e ainda serviram de exemplos de dedicação, garra e persistência na busca de seus objetivos. Aos meus irmãos Flávio e Murillo, por todo o carinho e amizade despendidos durante o transcorrer da graduação, pelos incentivos e as palavras de apoio nos momentos difíceis. A minha esposa Emily pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio incondicional e pela dedicação com qual tratou dos assuntos familiares, praticamente sozinha nesses anos de minha graduação. Obrigado por serem o alicerce ao qual pude sustentar-me durante esta difícil e cansativa jornada entre trabalho e os bancos acadêmicos.

Ao Comando do 1º Batalhão de Policiamento de Área de Fronteira, em especial ao Comandante da 2ª Companhia de Policiamento Capitão Gruner pela compreensão e apoio durante minha graduação, auxiliando e adequando meus horários de labuta diária.

Ao meu orientador Prof. Dr Fabio Gallas Leivas, por ter aceitado o convite à orientação, pelos conhecimentos transmitidos durante minha jornada acadêmica, pela dedicação, confiança, paciência e pela enorme contribuição durante meu processo de formação.

À Renascer Biotecnologia por ter proporcionado a oportunidade de estagiar neste local, pela hospitalidade, pela amizade de toda a equipe e pelos grandes ensinamentos adquiridos através dos excelentes profissionais que ali desempenham suas atividades, em especial aos Médicos Veterinários Cecília Machado Pavin e Leandro Rocha do Amaral.

A todos os professores do Curso de Medicina Veterinária da Unipampa, pela compreensão dos momentos de dificuldades na conciliação da graduação e de meu trabalho, que em muitos momentos fundiram-se e tornaram essa jornada exaustiva, pelo apoio, incentivo e principalmente pelos conhecimentos compartilhados com seus discentes.

Aos meus amigos e colegas, pessoas especiais as quais tive a oportunidade de conhecer durante esse período, compartilhando momentos de tristezas, alegrias, angústias e ansiedade, mas que sempre estiveram lado a lado, apoiando uns aos outros na busca da realização de seus sonhos, vocês tornaram esse período muito melhor.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA – ÁREA DE REPRODUÇÃO BOVINA E BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) tem por objetivo descrever as atividades desenvolvidas e acompanhadas durante o período de realização do ECSMV. O local escolhido para a realização do estágio supervisionado foi a Central de Coleta e Processamento de Sêmen Bovino Renascer Biotecnologia, situada no Km 615 da BR 472, Distrito de Guterrez, município de Barra do Quaraí-RS. As atividades referentes ao estágio curricular supervisionado desenvolveram-se entre os dias 05 de fevereiro e 30 de abril de 2018, sendo oito horas diárias, das 08:00 às 12:00 e das 14:00 às 18:00h, perfazendo uma carga horária total de 488 horas e foram concentradas na Central de Coleta e Processamento de Sêmen Bovino Renascer Biotecnologia. O ECSMV teve como supervisora a Médica Veterinária Cecilia Izabel Inês Urquiza Machado Pavin e orientação institucional do Profº Dr. Fabio Gallas Leivas. Foram acompanhadas 2.331 atividades de coleta de material biológico para análise laboratorial, manejo sanitário, coleta de sêmen, manejo de touros e demais atividades de campo, além atividades laboratoriais como análise, processamento e criopreservação de sêmen. O ECSMV foi de extrema importância como complemento na formação técnica das atividades da graduação, sendo possível colocar em prática os conhecimentos adquiridos durante o curso e obter uma melhor preparação para a inserção no mercado de trabalho, além da aquisição de novos aprendizados.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01: Fachada Renascer Biotecnologia Centro de Coleta e Processamento de Sêmen Agropecuária Pavin Ltda.	13
FIGURA 02: Sala de limpeza e esterilização do material.	16
FIGURA 03: Congelador de sêmen Digitcool IMV (a); Interior do Digitcool (b); Digitcool com as palhetas de sêmen após o processo de congelamento (c)	16
FIGURA 04: Unidade de coleta (a); Tronco de contenção com balança digital (b); Tronco tombador para casqueamento (c).	17
FIGURA 05: Alojamento dos reprodutores.	18
FIGURA 06: Unidade de armazenamento de sêmen contendo 03 bancos de sêmen com capacidade de 320mil doses armazenadas em raques (a); Interior de um dos bancos de armazenamento (b).	19
FIGURA 07: Vagina artificial (VA) sendo preparada para a utilização, seta preta – tubo rígido da VA, seta branca - tubo flexível ou mucosa e seta vermelha – funil de silicone (a); VA pronta para utilização (b).	22
FIGURA 08: Tronco de contenção de vacas manequins para a coleta de sêmen utilizando vagina artificial.	24
FIGURA 09: Sala de análise espermática e preparação de meios.	28
FIGURA 10: Diluente OptiXcell 2 da IMV Technologies em frasco comercial (a); Frasco com diluente OptiXcell 2 diluído em água ultrapura na proporção de 1:2 (b)	29
FIGURA 11: Câmara de resfriamento contendo a máquina envasadora de palhetas MRS4; b) Detalhe da a máquina envasadora de palhetas MRS4 em funcionamento.	30
FIGURA 12: Sala de controle de qualidade de sêmen.	33
FIGURA 13: Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA) IVOS II	43
FIGURA 14: Espermatozoide com fratura da peça intermediária (seta preta) e espermatozoide com cabeça isolada (seta branca) (a); Espermatozoide com gota citoplasmática distal (b); Espermatozoide com cauda dobrada (c); Espermatozoide com cauda fortemente dobrada e gota citoplasmática (d); Espermatozoide com cauda enrolada (e); Espermatozoide com cauda fortemente enrolada (f). Fonte (Martins, Done e Silva, 2016).	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 01:	Atividades desenvolvidas/acompanhadas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária realizado no período de 05 de fevereiro à 30 de abril de 2018.	20
TABELA 02:	Padrão seminal para seleção de reprodutores para monta natural.	44
TABELA 03:	Defeitos Primários e Secundários segundo Blom, (1950).....	47
TABELA 04:	Classificação dos espermatozoides de acordo com os Defeitos Maiores e Menores, segundo Blom, (1973).	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRAA	Associação Brasileira de Andrologia Animal
ATP	Trifosfato de Adenosina
BVD	Diarreia Viral Bovina
CASA	Sistema Computadorizado de Análise Espermática
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CCPS	Centro de Coleta e Processamento de Sêmen
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECSMV	Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
IA	Inseminação Artificial
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PBS	Tampão Fosfato-Salino
SBTE	Sociedade Brasileira de Tecnologias de Embriões
TGB	Tricomonose Genital Bovina
TTR	Teste de Termo Resistência
VA	Vagina Artificial
VA'S	Vaginas Artificiais
mg	Miligramas (10 ⁻³)
mL	Mililitro (10 ⁻³)
µg	Microgramas (10 ⁻⁶)
µm	Micrometros (10 ⁻⁶)
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	12
2 - DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES	13
2.1 - Local De Realização Do Estágio.....	13
2.1.1 - Equipe	14
2.1.2 – Infraestrutura	14
2.1.3 – Laboratório	15
2.1.4 – Unidade de Coleta	16
2.1.5 – Alojamento dos Reprodutores	17
2.1.6 – Quarentenário	18
2.1.7 – Depósito de Rações	18
2.1.8 – Unidade de Armazenamento de Sêmen.....	19
2.2 - Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas	19
2.2.1 - Exame andrológico em bovinos	20
2.2.2 - Preparação de vagina artificial	22
2.2.3 - Preparação dos touros para a coleta de sêmen	23
2.2.4 - Coleta de sêmen com vagina artificial	23
2.2.5 - Coleta de sêmen com eletroejaculador.....	25
2.2.6 - Análise espermática (volume, concentração, motilidade e vigor)	26
2.2.7 - Diluição/congelamento de sêmen.....	28
2.2.8 - Análise de morfologia e patologia espermática	32
2.2.9 - Teste de Termo Resistência	32
2.2.10 - Análise de sêmen no CASA-IVOS II – Hamilton Thorne	33
3 - DISCUSSÃO.....	35
3.1 - Importância da coleta e análise na qualidade do sêmen.....	35
3.2 - Coleta de sêmen	35
3.3 - Sistema computadorizado de análise espermática (CASA)	41
3.4 - Análise da morfologia espermática	45
4 - CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO A	60

ANEXO B	61
ANEXO C	62

1 – INTRODUÇÃO

A utilização das biotécnicas aplicadas à reprodução animal tem aumentado significativamente nos últimos anos contribuindo muito para o melhoramento genético dos rebanhos, otimização dos manejos reprodutivos e maximização dos lucros. A inseminação artificial é uma técnica desenvolvida há muitos anos e de acordo com Gonçalves (2008) a primeira inseminação artificial bem-sucedida em mamíferos é datada de 1779 e foi obtida em cães da raça Poodle pelo monge italiano e professor da Universidade de Pavia, Lazzaro Spallanzani. Atualmente é uma das principais técnicas utilizadas na reprodução bovina, que por sua vez, impulsiona a produção e o mercado do sêmen bovino.

A escolha do local de estágio foi estrategicamente estudada para que corroborasse com o aprendizado adquirido na Universidade, unindo a reprodução a campo e a biotecnologia empregada nos laboratórios. A Central de Coleta e Processamento de Sêmen Bovino Renascer Biotecnologia foi escolhida como o local de estágio, porque o estabelecimento emprega as principais técnicas reprodutivas utilizadas na atualidade, utilizando o que há de mais inovador e moderno do mercado da biotecnologia da reprodução.

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) é um componente curricular obrigatório na graduação de Medicina Veterinária. O ECSMV foi realizado entre os dias 05 de fevereiro e 30 de abril de 2018, sendo oito horas diárias, das 08:00 às 12:00 e das 14:00 às 18:00h, e 40 horas semanais, perfazendo uma carga horária total de 488 horas, sob a orientação do Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas e a supervisão da Médica Veterinária Me. Cecilia Izabel Inês Urquiza Machado Pavin. O presente trabalho tem por objetivo descrever e apresentar as atividades acompanhadas e realizadas durante o ECSMV na área de reprodução bovina e biotecnologia da reprodução.

2 – DESCRIÇÕES DAS ATIVIDADES

2.1 Local de Realização do estágio

O local escolhido para a realização do estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV), foi a Renascer Biotecnologia Centro de Coleta e Processamento de Sêmen Agropecuária Pavin Ltda. A supervisão do ECSMV ficou a cargo da Responsável Técnica do Centro, Médica Veterinária Me. Cecília Izabel Inês Urquiza Machado Pavin e orientação acadêmica do professor Dr. Fabio Gallas Leivas.

A Renascer Biotecnologia Centro de Coleta e Processamento de Sêmen Agropecuária Pavin Ltda, está localizada na Rodovia BR 472, Km 613-615, Estância Renascer, Distrito de Guterrez - Barra do Quaraí –RS. Teve o início de suas atividades em 11 de agosto de 2017 com o objetivo de comercialização de sêmen bovino para o Brasil e exterior e insumos para inseminação artificial. Após a análise da viabilidade econômica e da necessidade de mercado, iniciou-se a construção da empresa, que contou com a consultoria do Médico Veterinário Neimar Correa Severo, atualmente gerente de produção da Alta Genetics do Brasil, que orientou para que o projeto da Central estivesse pautado na qualidade em todos os aspectos.



FIGURA 01 – Fachada Renascer Biotecnologia Centro de Coleta e Processamento de Sêmen Agropecuária Pavin Ltda.

2.1.1 Equipe

A equipe é composta pelo Diretor Executivo da empresa Paulo Roberto Pavin, agropecuarista e empresário com mais de 35 anos de atuação no mercado; Consultor Técnico Neimar Correa Severo, Médico Veterinário, membro do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA); sócio da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE); membro-fundador da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) e atualmente diretor comercial da ABRAA, desde sua fundação;

Paulo Roberto Pavin Filho, Engenheiro Agrônomo, responsável pelo manejo nutricional e pela área administrativa da Renascer Biotecnologia; Leonardo Pavin, Médico Veterinário, responsável pelo manejo nutricional e pela área comercial da Renascer Biotecnologia; Natasha Frasson Pavin, Farmacêutica e mestre em Bioquímica, responsável pelo laboratório de processamento e congelamento de sêmen; Cecilia Izabel Inês Urquiza Machado Pavin, Médica Veterinária e Mestre em Ciência Animal, responsável pelo laboratório de processamento e congelamento de sêmen e responsável técnica da Renascer Biotecnologia. Leandro Rocha do Amaral, Médico Veterinário, responsável pelo manejo sanitário e coletas dos reprodutores da Renascer Biotecnologia. Mayara Costa Oyhenard, Médica Veterinária, responsável pelo laboratório de processamento e congelamento de sêmen. Ainda conta com o apoio de três tratadores, que são responsáveis pela alimentação, manejo e coleta do sêmen dos reprodutores, além de uma técnica de laboratório e uma secretária.

2.1.2 Infraestrutura

O Centro de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) Renascer Biotecnologia possui uma área total de 15 hectares destinada a alojar touros doadores de sêmen, animais manequins, instalações e edificações e área de isolamento sanitário. Também possui uma área de 90 hectares de pastagem irrigada por pivô central e mais 100 hectares de pastagem de inverno, permitindo a produção de alimento o ano todo.

As instalações e edificações utilizadas para alojamento dos animais, laboratório e quarentenário estão isoladas por cercas de alambrado com 6 fios, com isolamento mínimo de 25 metros de distância da área administrativa, das áreas de criatórios vizinhos e da rodovia.

O CCPS está localizado em área drenada, em perfeitas condições de uso para manter a saúde e o bem-estar dos animais alojados e a boa qualidade do produto. Possui entradas e saídas controladas, para pessoas e animais, com equipamento de desinfecção de veículos (rodolúvios) que acessem o quarentenário e ao depósito de ração.

2.1.3 Laboratório

O CCPS conta com um laboratório de altíssima qualidade no que se refere à congelamento e processamento do sêmen, a unidade laboratorial possui vestiário, sala de manipulação de sêmen e de preparação de meios, sala de controle de qualidade de sêmen e sala de limpeza e esterilização do material.

O laboratório é equipado com uma geladeira, banho-maria, balcão refrigerado, congelador de sêmen Digitcool IMV, balança analítica, máquina para o envase do sêmen e fechamento da palheta MRS4, Sistema Automatizado Para Análise de Sêmen (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA) IVOS II– Hamilton Thorne, Fotômetro ACCUCELL, dois Microscópios, duas mesas aquecedoras. A sala de manipulação de sêmen também possui um óculo com porta dupla para a recepção do sêmen. Toda a unidade laboratorial é revestida de material de fácil higienização e protegida com tela contra a entrada de insetos e roedores nas janelas.



FIGURA 02 – Sala de limpeza e esterilização do material. Fonte: Arquivo Pessoal.

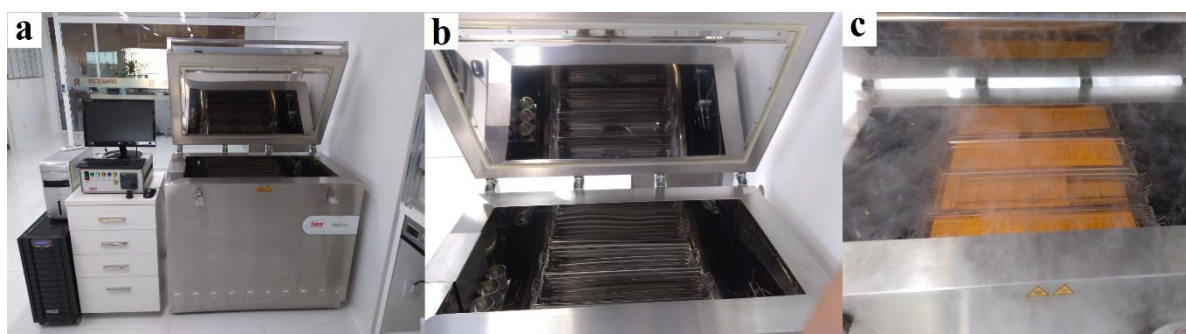


FIGURA 03 – a) Congelador de sêmen Digitcool IMV; b) Interior do Digitcool; c) Digitcool com as palhetas de sêmen após o processo de congelamento. Fonte: Arquivo Pessoal.

2.1.4 Unidade de Coleta

A unidade de coleta do sêmen encontra-se ao lado do laboratório e conta com área coberta para a coleta de sêmen, de fácil higienização, com cercas de proteção, tronco de contenção e pesagem dos animais com balança eletrônica, troncos para contenção de animais

manequins em coleta e cinco piquetes de espera para alojamento temporário dos reprodutores durante o período de coleta

Possui também sala de limpeza e preparação de material de coleta de sêmen, onde são preparados e armazenados os equipamentos e os materiais utilizados nos procedimentos de coleta de sêmen, além disso, conta com uma unidade de apoio constituída de vestiários, farmácia e depósito de material de limpeza.

Nas dependências da unidade de coleta possui um tronco tombador para casqueamento dos animais possibilitando que os reprodutores sejam casqueados no próprio CCPS, não precisando serem deslocados para outro lugar a fim de não terem que voltar ao quarentenário quando do retorno.

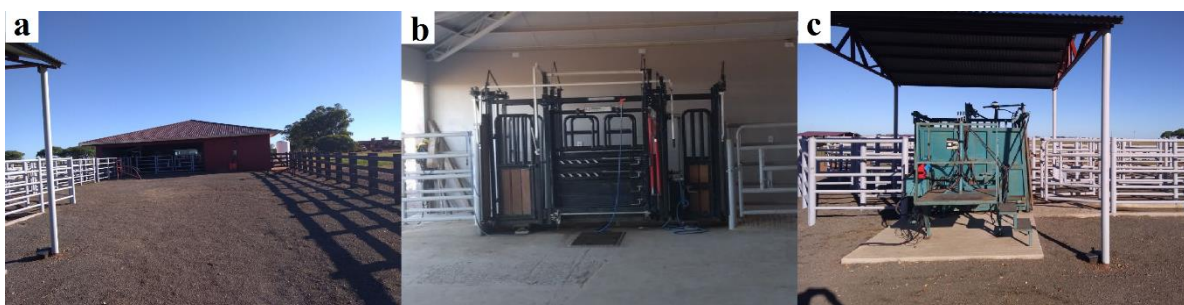


FIGURA 04 – a) Unidade de coleta; b) Tronco de contenção com balança digital; c) Tronco tombador para casqueamento. Fonte: Arquivo Pessoal.

2.1.5 Alojamento dos Reprodutores

A unidade de alojamento do rebanho residente é composta por 60 piquetes para touros residentes e ainda possui espaço para a construção de mais 120 piquetes, totalizando 180 animais residentes. Cada piquete mede 400m², bebedouro, comedouro e manjedoura individuais para a alimentação, possui mourão anti-stress, área coberta e cama de areia que asseguram boas condições de bem-estar animal.

Os piquetes estão dispostos em linhas, separados por cercas com seis fios de arame, além de fio com choque de contenção.



FIGURA 05 – Alojamento dos reprodutores. Fonte: Arquivo Pessoal.

2.1.6 Quarentenário

A unidade de quarentena é composta por 20 piquetes individuais com aproximadamente 225 metros² cada, com área coberta, cocho para alimentação e bebedouro individuais. Edificação com sala de preparação de material de coleta de sêmen, laboratório para manipulação e análise do sêmen, banheiro, vestiário e depósito de material, instalação com tronco de contenção e pesagem dos animais com balança eletrônica.

As cercas limítrofes possuem isolamento mínimo de 25 metros das demais instalações do CCPS, de criatórios vizinhos e da rodovia. Entrada independente, para animais que ingressam no quarentenário não transitam pela área de alojamento do rebanho residente, composta por desembarcador de animais.

2.1.7 Depósito de Rações

Depósito de ração, localizada próximo a unidade administrativa, para armazenagem dos componentes secos da dieta dos animais. O depósito tem uma sala fechada onde é

armazenada a ração concentrada e o sal mineral. O restante da área funciona como depósito de serragem, depósito de feno e local de preparação do volumoso fornecido aos animais.

2.1.8 Unidade de Armazenamento de Sêmen

A unidade de armazenamento de sêmen está localizada no bloco principal da unidade administrativa, tem por finalidade o armazenamento de sêmen e de material de vendas, esta unidade tem um acesso único e controlado para a área administrativa. Possui três containers de nitrogênio líquido para armazenamento de sêmen (bancos de sêmen), com capacidade de 320 mil doses (palhetas de 0,25ml) armazenadas em raques de 20 unidades ou 900 mil doses a granel cada um dos bancos, o estoque também possui botijões para manipulação e estoque de sêmen e nitrogênio líquido.



FIGURA 06 – a) Unidade de armazenamento de sêmen contendo 03 (três) bancos de sêmen com capacidade de 320mil doses armazenadas em raques. b) Interior de um dos bancos de armazenamento. Fonte: Arquivo Pessoal.

2.2 Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas

Durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV), realizado na Renascer Biotecnologia - Centro de Coleta e Processamento de Sêmen Agropecuária Pavin Ltda. foram realizadas e/ou acompanhadas diversas atividades

relacionadas a coleta, processamento e armazenamento de sêmen bovino assim como também foi possível acompanhar a admissão dos reprodutores ao quarentenário

TABELA 01 – Atividades desenvolvidas/acompanhadas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária realizado no período de 05 de fevereiro à 30 de abril de 2018.

Atividades Desenvolvidas	Número	%
Exame andrológico em bovinos	08	0,34
Preparação de vagina artificial	680	29,17
Preparação dos touros para a coleta de sêmen	378	16,21
Coleta de sêmen com vagina artificial	520	22,30
Coleta de sêmen com eletroejaculador	105	4,50
Análise espermática (volume, concentração, motilidade e vigor)	155	6,64
Diluição/congelamento de sêmen	25	1,07
Análise de morfologia e patologia espermática	155	6,64
Teste de termo resistência (TTR)	97	4,16
Análise de sêmen no CASA-IVOS II – Hamilton Thorne	208	8,92
Total	2331	100,00

2.2.1 Exame andrológico em bovinos

O exame andrológico é de extrema importância para todos os reprodutores que entrarão na estação de monta e principalmente para aqueles animais que são encaminhados aos CCPS visando a coleta e congelamento de sêmen.

Durante a realização do ECSMV foram acompanhados oito exames andrológicos em touros que chegaram ao quarentenário, em reprodutores que entrariam na bateria de coleta para o processamento e congelamento de sêmen e em animais que apresentaram algum problema de infertilidade durante as coletas.

Os exames acompanhados tiveram o início pela anamnese, exame clínico geral e exame clínico específico do sistema reprodutor, sendo que os órgãos externos foram examinados por inspeção e palpação e os órgãos internos foram examinados por palpação retal

e ultrassonografia. O exame clínico específico teve por finalidade a busca de alguma anormalidade sendo verificado a presença ou ausência, as dimensões, a simetria, a consistência e a mobilidade dos componentes do sistema genital. Outro item de grande importância no momento do exame é a avaliação da compatibilidade do órgão com a idade, o desenvolvimento e com a raça do animal.

Após o término dos exames clínicos foi realizada a coleta de sêmen do reprodutor utilizando o eletroejaculador, para isso o touro era devidamente contido em tronco de contenção. Foram avaliadas as características físicas do sêmen coletado como o aspecto, volume e cor, uma alíquota deste sêmen era levada ao laboratório para avaliação da concentração, motilidade, motilidade progressiva, vigor e a patologia espermática.

Os parâmetros adotados para a aprovação dos reprodutores no exame andrológico eram baseados no Grupo de Trabalho de Andrologia Bovina, instituído pela Portaria n.109/2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento-MAPA (Brasil, 2009) o qual preconiza que o sêmen deve apresentar valor mínimo de 70% de motilidade total, vigor 03 ou mais, avaliação da morfologia e patologia espermática com no mínimo 70% de espermatozoides normais, valor máximo de tolerância de até 20% para defeitos maiores, máximo de até 30% de defeitos menores, respeitado o limite de 70% de normais e os limites individuais de anormalidades de até 5% para defeitos maiores e 10% para defeitos menores.

Os exames andrológicos que foram acompanhados durante o ECSMV obtiveram 05 reprodutores aprovados e 03 reprovados, sendo que estes foram reprovados pelos seguintes motivos: 01 reprodutor com azoospermia (animal adulto, com 14 anos, e que possui hérnia escrotal, ECC 2,5), 01 touro com necrospermia (touro jovem, 3 anos, ECC 3,5) e 01 reprodutor com motilidade espermática total de 50% (animal adulto, 5 anos, ECC3,5). Os reprodutores que foram reprovados encontravam-se no quarentenário e foram suplementados com Vitaminas A, D e E e houve a substituição do feno na alimentação por volumoso verde (Capim Áries). Não foi possível acompanhar a evolução destes animais pois houve o término do período de estágio no intervalo entre as coletas.

2.2.2 Preparação de vagina artificial

No período em que se realizou o ECSMV foi acompanhado e auxiliado a montagem de 680 vaginas artificiais, sendo uma média de 27 VA's por dia de coleta. A montagem da VA inicia-se com a colocação do tubo de látex flexível (mucosa) no interior do tubo rígido, as bordas da mucosa são então evertidas e encaixadas nas extremidades da parte rígida da VA. A mucosa é fixada com tiras de borracha próprias para a fixação, a porção entre a mucosa e a parte rígida da VA é preenchida com água na temperatura de 40 a 42°C através de válvula existente do tubo rígido, espera-se que a temperatura no interior da VA fique em torno de 38 e 39°C no momento da utilização, aproximando-se o máximo possível da temperatura fisiológica dos bovinos.

Em uma das extremidades da VA era fixado um funil de silicone com um tubo coletor na outra extremidade do funil, vale ressaltar que todos os materiais utilizados na referida montagem e que entrarão em contato com o órgão genital do reprodutor, assim como com o sêmen, deverão estar estéreis. Após a montagem da vagina artificial, esta é colocada em uma estufa a 42°C juntamente com as demais VA's prontas e que serão utilizadas na coleta.

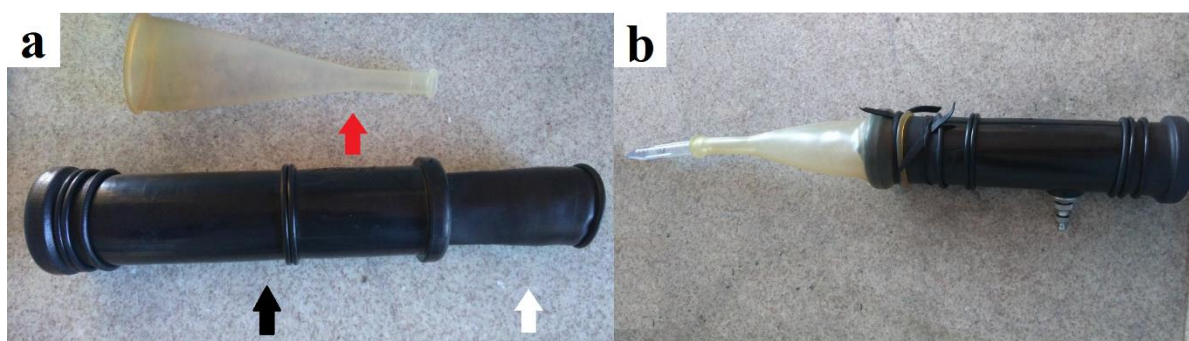


FIGURA 07 – a) Vagina artificial (VA) sendo preparada para a utilização, seta preta – tubo rígido da VA, seta branca - tubo flexível ou mucosa e seta vermelha – funil de silicone; b) VA pronta para utilização. Fonte: Arquivo Pessoal.

No momento da utilização cada uma das VA's é retirada da estufa individualmente e o término da preparação é procedido com nova medição de temperatura, que deve estar entre 38 e 39°C, com a introdução da VA em uma capa que protegerá o do funil de silicone e o tubo coletor de qualquer impacto que possa desconectá-los e também protegerá o sêmen coletado da luz solar. Por último, e não menos importante, é feita a colocação de gel lubrificante na extremidade da vagina artificial onde será introduzido o pênis do reprodutor, observando sempre para que a aplicação seja realizada somente na parte inicial da VA, evitando que o

produto utilizado para a lubrificação entre em contato com o sêmen no momento da coleta, inutilizando a partida.

2.2.3 Preparação dos touros para a coleta de sêmen

Durante o ECSMV foram acompanhadas 378 preparações de reprodutores para a coleta de sêmen. Esta preparação trata-se basicamente da higienização e toailete do prepúcio do touro imediatamente antes da coleta.

O animal era encaminhado até o tronco de contenção onde o procedimento era realizado, a higienização do prepúcio era feita esguichando água corrente através de uma mangueira de jardim e massageando a parte exterior do prepúcio para retirar qualquer sujidade que venha a cair dentro da VA no momento da coleta, inutilizando a partida ou até mesmo machucando o pênis do reprodutor. Após a lavagem o prepúcio era seco com lenços descartáveis para evitar que a água escorra e também venha a contaminar o sêmen.

Periodicamente é realizado o toailete nos pelos que circundam o prepúcio do reprodutor, sempre que estes estiverem maior que 1cm eram aparados.

No CCPS existiam reprodutores que eram coletados de forma que os mesmos ficassem livres no local da coleta, porém, existiam touros que eram acostumados a usar buçal, facilitando o manejo durante a coleta. O buçal era colocado no animal no momento da preparação.

2.2.4 Coleta de sêmen com vagina artificial

Por ser o tipo de coleta mais indicado para a utilização em CCPS a coleta com a vagina artificial deve ser sempre cercada de cuidados para que se obtenha êxito no procedimento, evitando expor o reprodutor ao eletroejaculador desnecessariamente.

Durante o período de ECSMV foi acompanhado um número expressivo de coletas utilizando a VA, totalizando 520 coletas. Foi possível verificar diversos problemas enfrentados quando se utiliza este método de coleta. A libido de alguns reprodutores era o principal empecilho no momento da coleta quando se faz o uso da VA, além disso animais

com temperamento muito agressivo e com problemas locomotores também enfrentavam uma limitação quando se fala em coleta com vagina artificial, sendo indicado outros métodos de coleta.

A coleta com VA tem o início do procedimento quando o reprodutor é liberado para a área de coleta, onde há em média duas vacas utilizadas como manequins, devidamente contidas em tronco próprio para este tipo de procedimento. O touro escolhia em qual dos manequins irá saltar e o responsável pela coleta deve então posicionar-se sempre ao lado direito do reprodutor, segurando a VA com a mão direita e após a monta do touro desviar o pênis do mesmo com a mão esquerda para que o órgão seja introduzido na VA e não no órgão do manequim.



FIGURA 08 – Tronco de contenção de vacas manequins para a coleta de sêmen utilizando vagina artificial. Fonte: Arquivo Pessoal.

O CCPS Renascer Biotecnologia utiliza o método de desvio do pênis antes da coleta, fazendo com que o touro salte na vaca e não consiga ejacular por não encontrar nem a VA, nem a vagina da vaca. Este desvio é feito pelo responsável da coleta é realizado uma ou duas vezes antes da coleta propriamente dita. Tem por finalidade excitar e estimular o reprodutor a produzir mais e melhor conteúdo espermático e em alguns casos fazer com que o reprodutor

salte com o pênis pronto para a cópula, pois existem animais que saltam com o membro ainda em repouso.

Após um ou dois saltos do reprodutor utilizando o método de desvio do pênis o responsável pela coleta, ao observar que o reprodutor está pronto para ser coletado, desvia novamente o pênis segurando com a mão esquerda na base do órgão, parte que fica recoberta pelo prepúcio, e então oferece a VA ao reprodutor que ao sentir a temperatura e a textura similar a fisiológica da vaca faz o galeio (movimento característico da ejaculada do touro) e ejacula no interior da vagina artificial.

O coletador deve esperar o touro descer do manequim e acompanhar o animal com a VA ainda preenchida pelo pênis, retirar, de preferência, somente após o animal estar com todos os membros em contato com o solo, evitando assim que o sêmen seja perdido. A VA deve ser conduzida imediatamente para o local onde o tubo coletor será retirado do funil de silicone, identificado, tampado e entregue no laboratório.

Alguns animais não conseguem ejacular após o oferecimento da VA, fazendo diversas penetrações e descendo do manequim sem dar o galeio, o responsável pela coleta deve verificar se a vagina artificial encontra-se com a temperatura e a pressão ideais para a coleta.

2.2.5 Coleta de sêmen com eletroejaculador

Durante a realização do ECSMV foram acompanhadas 105 coletas de sêmen utilizando o recurso do eletroejaculador, pois, este método é o segundo mais indicado para coleta de sêmen em um CCPS, tendo sido utilizado, em média, 05 vezes por dia de coleta.

O eletroejaculador era empregado principalmente em animais cujo o temperamento impedia a realização de coleta com VA. Também era utilizado em animais com baixo libido, com dificuldades de monta devido a problemas locomotores, ou com anormalidades de prepúcio (estenose) e/ou pênis e também em animais que não expunham um pênis suficientemente para a utilização da vagina artificial.

As coletas utilizando o recurso do eletroejaculador eram realizadas sempre após o término dos procedimentos utilizando VA, evitando que houvesse interferência externa na

libido dos demais reprodutores que eram coletados, devido ao estresse causado pelo trânsito de outros animais próximo ao local de coleta com monta.

O reprodutor que seria coletado era sofreado em tronco de contenção existente na unidade de coleta, o prepúcio do reprodutor era então lavado com água corrente e após seco utilizando lenço descartável de papel. O eletrodo do aparelho era então introduzido no ânus do touro, com o máximo de cuidado para não haver o rompimento da mucosa do reto e observando para que a parte de metal estivesse voltada ventralmente. O eletroejaculador era então ligado no modo automático, o coletador posicionava-se na lateral do tronco e utilizando um suporte metálico acoplado a um cone de látex e tubo coletor em uma das extremidades, realizava a coleta. O coletador, quando necessário, segurava o pênis do touro, utilizando sempre luvas de plástico descartáveis, com a finalidade de evitar que o membro tocasse o solo ou ejaculasse fora do cone de látex.

Após a ejaculação o tubo coletor era imediatamente desacoplado do cone de látex, tampado, identificado e entregue no laboratório do CCPS. O eletroejaculador era então desligado e o eletrodo retirado do reto do reprodutor. Alguns animais eram coletados mais de uma vez, aguardando sempre a análise do laboratório para a tomada de decisão sobre a nova coleta. Quando necessária nova coleta, esta era realizada sempre após um prazo mínimo de 15 a 20 minutos para o novo procedimento.

Alguns dos reprodutores coletados com este recurso necessitavam de uma atenção maior na contenção, pois estes, sempre que possível, deitavam no tronco durante do procedimento, sendo adotado para estes um método diferente de restrição de movimentos, que era a utilização de cinta de suspensão, que era acoplada na parte superior do tronco e circundava o peito do animal, evitando que o touro pudesse deitar e lesionar seu membro reprodutor ou até mesmo o causar ferimento no coletador que encontrava-se realizando o procedimento com suas mãos imediatamente abaixo do animal.

2.2.6 Análise espermática (volume, concentração, motilidade e vigor)

Após a realização de cada coleta, a amostra era enviada imediatamente ao laboratório através de um óculo com porta dupla que ligava o referido laboratório à unidade de coleta. No interior do óculo continha um banho maria a seco na temperatura de 38°C, que tinha a

finalidade de manter a partida do sêmen na temperatura mais próxima possível da fisiológica bovina até o momento da manipulação da partida.

Assim que a partida era retirada do banho maria a seco, o seu volume era quantificado, este procedimento realizava-se através do peso do ejaculado, utilizando uma balança analítica previamente tarada com o peso do tudo coletor sem a tampa e com o rótulo de identificação. O peso obtido na balança era convertido para volume através da multiplicação deste valor por 1,02.

Após a pesagem, era avaliada a concentração do sêmen, utilizando o fotômetro ACCUCELL da IMV Technologies. A avaliação era procedida da seguinte forma: em uma cubeta do fotômetro eram adicionados 396 μ l de solução fisiológica a 9% e 4 μ l do sêmen a ser avaliado, utilizando pipeta dosadora; com o equipamento previamente ligado e calibrado (zerado) a cubeta era colocada no aparelho que fazia a leitura da amostra pela absorbância da luz através da cubeta preenchida pelo conteúdo a ser quantificado.

No equipamento ACCUCELL era preenchido o valor em mililitros (ml) do volume do ejaculado que estava sendo avaliado, após feita a leitura da amostra o aparelho emitia automaticamente a concentração espermática por ml, a quantidade de doses em palhetas de 0,25ml que este ejaculado renderia e ainda a quantidade de diluente que deveria ser adicionado ao ejaculado para que esse total de palhetas fosse envasado. Vale ressaltar que o equipamento já se encontrava previamente calibrado para que cada palheta contivesse o mínimo de 25×10^6 espermatozoides.

O próximo passo realizado era a avaliação da motilidade e do vigor dos espermatozoides contidos na amostra, esta avaliação era realizada adicionando entre uma lâmina e uma lamínula de vidro previamente aquecidas a 38°C, uma alíquota do ejaculado, estas então eram levadas ao microscópio, contendo mesa aquecedora, onde através da avaliação visual era atribuída uma porcentagem a motilidade total e uma nota (0 a 5) ao vigor dos espermatozoides.

As partidas em que a porcentagem atribuída à motilidade total dos espermatozoides era inferior a 70% e/ou o vigor inferior a nota 3, eram descartadas.

Todos os dados e resultados obtidos através das análises realizadas, assim como a identificação do reprodutor e o método de coleta eram preenchidos na ficha de avaliação.



FIGURA 09 – Sala de análise espermática e preparação de meios. Fonte: Arquivo Pessoal.

2.2.7 Diluição/congelamento de sêmen

A partidas ficavam imersas em banho maria a 38°C, juntamente com o recipiente que continha o diluente, para que quando adicionado na partida ambos estivessem com a mesma temperatura, evitando choque térmico e consecutiva redução da motilidade espermática.

O processo de diluição/congelamento iniciava-se imediatamente após as avaliações de volume, concentração, motilidade e vigor com a adição de uma alíquota de diluente com volume idêntico ao da partida, fazendo a diluição inicial de 1/1. Como todos os touros eram coletados mais de uma vez, as partidas do mesmo reprodutor, quando aprovadas nas avaliações e quando tivessem sido coletadas com intervalo menor de uma hora entre a primeira e a última, eram unidas após a diluição inicial formando uma só partida. Caso o período entre as coletas do mesmo reprodutor, fosse maior que uma hora e ambas fossem aprovadas nas avaliações, estas não seriam unidas e formariam partidas separadas.

Após a primeira diluição o restante do diluente, preconizado pelo equipamento ACCUCCELL para cada uma das partidas, era adicionado lentamente, com o objetivo de evitar e/ou reduzir a morte de espermatozoides e consequente redução de motilidade pelo choque osmótico.

O diluente utilizado era o OptiXcell 2, da empresa IMV Technologies, que era previamente diluído em água ultrapura, que era filtrada pelo equipamento Milli-Q, na proporção de 2 partes de água e 1 parte do diluente. O OptiXcell é 100% sintético e não faz o uso de proteína animal em sua composição.

Os recipientes com as partidas, devidamente diluídas, eram hermeticamente fechados e depositados em um canister com água, na mesma temperatura da partida, água esta retirada do banho maria juntamente com o sêmen já diluído. O canister com a partida submersa em água, era então lavado à câmara de resfriamento para que sua temperatura fosse reduzida gradualmente até atingir 4°C. Sempre que a última partida de sêmen era colocada na câmara de resfriamento começava-se uma contagem regressiva de quatro horas para iniciar então o processo congelamento do sêmen.

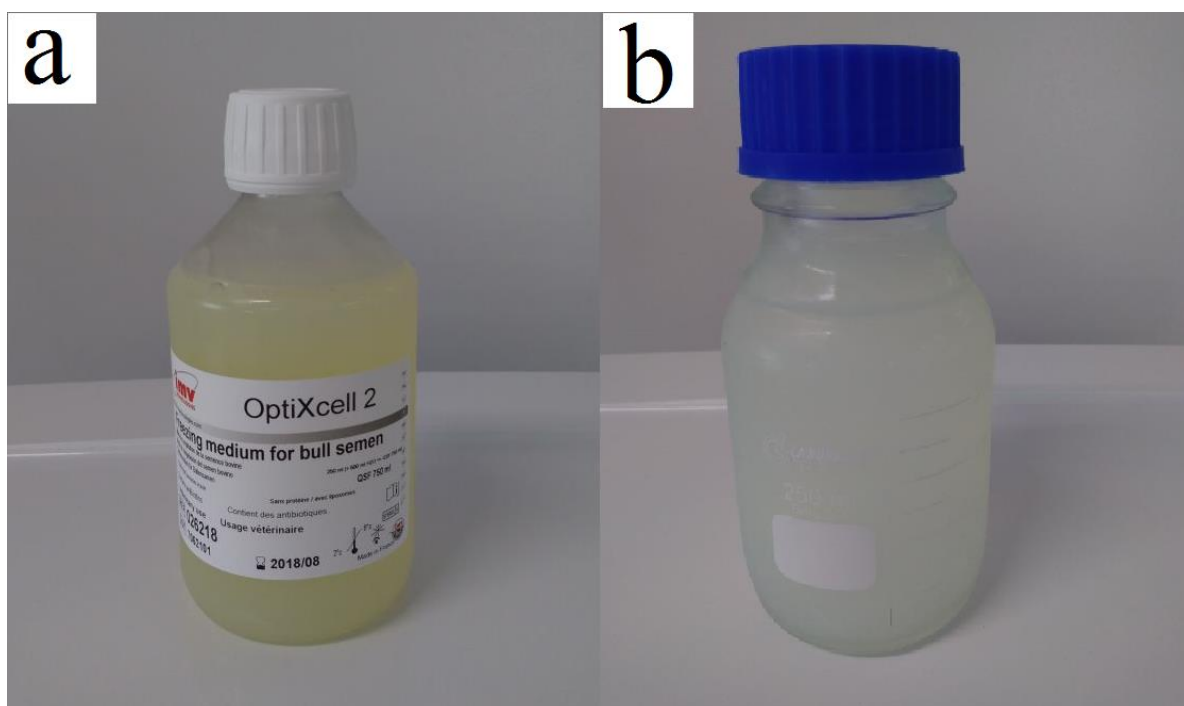


FIGURA 10 – a) Diluente OptiXcell 2 da IMV Technologies em frasco comercial; b) Frasco com diluente OptiXcell 2 diluído em água ultrapura na proporção de 1:2. Fonte: Arquivo Pessoal.

Passadas as duas primeiras horas após a colocação dos recipientes na câmara de resfriamento iniciava-se o processo de envase do sêmen nas palhetas, utilizando o equipamento MRS4 também da IMV Technologies. A máquina envasadora encontrava-se instalada dentro da câmara de resfriamento, evitando que o sêmen fosse retirado da referida câmara e tivesse sua temperatura elevada novamente.

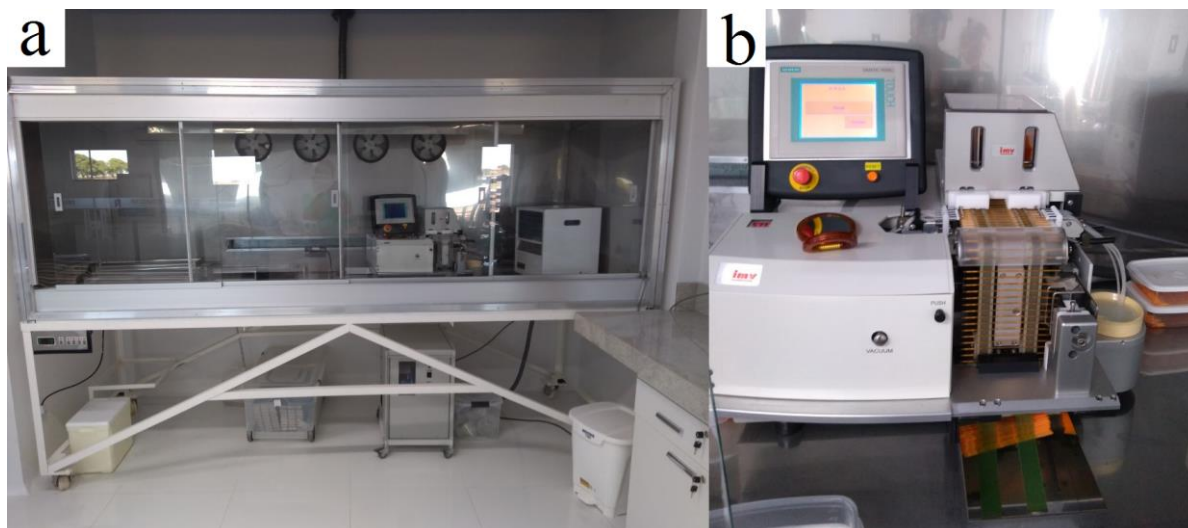


FIGURA 11 – a) Câmara de resfriamento contendo a máquina envasadora de palhetas MRS4; b) Detalhe da a máquina envasadora de palhetas MRS4 em funcionamento. Fonte: Arquivo Pessoal.

O processo de envase iniciava-se com a montagem do equipamento de sucção da envasadora, composto por quatro agulhas curtas responsáveis pela sucção, quatro agulhas longas responsáveis pela inserção do sêmen na palheta e quatro mangueiras de látex responsáveis pela condução do sêmen do copo coletor até as agulhas injetoras.

As palhetas devidamente impressas com o nome do CCPS, nome do reprodutor, raça, e número da partida (data da coleta) eram depositadas em local apropriado na máquina envasadora, assim como a partida do sêmen, que era despejada no copo coletor do equipamento. O envase então era procedido com o aparelho envasando as palhetas de 4 em 4, encurtando o tempo do processo, e soldando as palhetas automaticamente após cada envase.

Assim que as palhetas eram envasadas e devidamente lacradas, estas eram dispostas manualmente lado a lado em rampas que tinham a capacidade de alocar 175 palhetas de 0,25ml. Todo este procedimento, assim como o anterior, também era realizado dentro da câmara de resfriamento, mantendo as doses à temperatura de 4°C. Após todas as doses serem alocadas nas devidas rampas, estas ficavam em repouso na câmara aguardando o prazo mínimo para iniciar o processo de congelamento.

Passadas as 04 (quatro) horas protocolares, desde a colocação da última partida de sêmen na câmara de resfriamento, era então dado início ao processo de congelamento com a disposição das rampas com as palhetas justapostas no freezer de congelamento através de temperatura controlada Digitcool da IMV Technologies que já havia sido resfriado previamente a 4°C. Após dispostas todas as rampas no equipamento, este era fechado

hermeticamente, através de fechaduras de pressão existentes na tampa deste e era dado início à curva de congelamento.

O freezer de congelamento através de temperatura controlada Digitcool era comandado por um computador acoplado a este, que fazia com que o processo seguisse a curva de congelamento de sêmen recomendada pela IMV Technologies, fabricante do equipamento e líder mundial em biotecnologia da reprodução.

Após a término do processo de congelamento o Digitcool era aberto e as palhetas eram retiradas das rampas, utilizando luva de proteção contra temperatura, e mergulhadas no nitrogênio líquido, sendo alocadas em um canister de um botijão de transporte de sêmen de 50 litros. As doses eram depositadas nas rampas e nos canisters respeitando sempre a individualidade de cada partida, evitando que houvessem doses de diferentes partidas no mesmo canister.

O processo de congelamento tinha continuação com o armazenamento das doses em raques de alumínio (raqueamento), próprias para este fim. Devido à falta de tempo para que o raqueamento fosse realizado no mesmo dia em que a coleta e o processo de congelamento, este era então iniciado somente no dia seguinte. As doses eram retiradas do botijão de transporte juntamente com o canister e o nitrogênio contido neste, com o auxílio de pinças e despejadas em caixas de isopor adaptadas (com as laterais mais baixas) para que fossem então raqueadas.

O processo de raqueamento era totalmente manual, as raques previamente identificadas, assim como as doses, eram mergulhadas no nitrogênio. Com o auxílio de pinças as doses eram introduzidas nos tubetes das referidas raques, observando sempre para que fosse colocada a quantidade de dez doses por tubete, totalizando 20 doses por raque. O CCPS Renascer Biotecnologia preconizava sempre o uso de equipamentos de proteção individuais, assim como roupas apropriadas para todas as pessoas que estivessem participando ou observando os processos dentro do laboratório.

As raques já montadas eram levadas até o banco de armazenamento em um botijão de transporte e depositadas neste seguindo o arranjo pré-estabelecido pelo responsável do banco.

2.2.8 Análise de morfologia e patologia espermática

Foram acompanhadas, durante o ECSMV, 155 análises de morfologia e patologia espermática. Assim que o sêmen era recebido pelo laboratório, uma alíquota de 10µl era retirada da partida e diluída 1ml de solução formol salina (SFS) e armazenada em um eppendorf devidamente identificado. Esta amostra era então enviada à sala de controle de qualidade de sêmen onde a análise era procedida.

A morfologia espermática era realizada seguindo a técnica de preparação úmida corada com rosa bengala, após colocar 10 µL de sêmen sobre uma lâmina, 10 µL do corante rosa bengala eram adicionados, homogeneizava-se e, em seguida, cobria-se com uma lamínula, retirando-se o excesso com papel absorvente.

Após aproximadamente um minuto procedia-se a avaliação sob microscopia óptica em aumento de 1000x. Eram cotadas 200 células espermáticas, sendo registradas separadamente cada tipo de patologia e/ou células normais.

A partida era então liberada ou descartada dependendo do resultado final, sendo que sempre que houvessem mais de 30% de defeitos totais, mais de 20% de defeitos maiores, mais de 5% de um mesmo defeito maior ou mais de 10% de um mesmo defeito menor a partida inteira era descartada.

2.2.9 Teste de Termo Resistência

Durante o período de realização do ECSMV foram acompanhados 97 Testes de Termo Resistência (TTR). Os testes eram realizados com duas doses das partidas que haviam passado pelo processo de criopreservação no dia anterior. O TTR era realizado da seguinte maneira: duas doses por partida analisada eram descongeladas e mantidas em banho maria à temperatura de 36°C por 04h, simulando o ambiente encontrado no trato reprodutivo da fêmea bovina, após uma das palhetas era aberta e o conteúdo era colocado entre lâmina e lamínula e levado ao microscópio óptico com placa aquecedora.

A partida então era avaliada e somente seria aprovada se a motilidade total fosse superior a 20% e o vigor igual ou superior a dois. Caso a dose fosse reprovada a outra dose passaria pela análise novamente, caso a contraprova confirmasse a reprovação da partida esta então seria retirada do banco de armazenamento e desprezada.

2.2.10 Análise de sêmen no CASA-IVOS II – Hamilton Thorne

O ECSMV possibilitou que fosse acompanhado 208 procedimentos de análise de sêmen utilizando o sistema computadorizado de análise espermática (CASA) IVOS II – Hamilton Thorne, único exemplar deste modelo em uso nos centros de coleta e processamento de sêmen bovino do Brasil.



FIGURA 12 – Sala de controle de qualidade de sêmen. Fonte: Arquivo Pessoal.

Imediatamente após o processo de criopreservação uma palheta era retirada de cada uma das partidas criopreservadas, esta dose era então descongelada em descongelador automático e diluída em meio tampão fosfato-salino (PBS), na mesma temperatura da dose, na proporção de 1:1. Uma alíquota de 20 μ m do sêmen diluído era colocado em lâmina descartável própria para a utilização no equipamento, esta lâmina era introduzida no CASA que fazia a análise da partida.

As partidas analisadas eram aprovadas sempre que a motilidade total fosse de 35% ou superior e a motilidade progressiva não fosse inferior a 20%, sendo que as reprovadas eram totalmente descartadas. Das 208 análises acompanhadas 37 foram reprovadas na análise do CASA, sendo 28 reprovadas pela baixa motilidade total e progressiva, seis reprovadas pela baixa motilidade total somente e três reprovadas pela motilidade progressiva abaixo do esperado para a aprovação.

3 – DISCUSSÃO

3.1 Importância da coleta e análise na qualidade do sêmen

O mercado do sêmen bovino vem crescendo ano a ano, sendo uma das áreas da Biotecnologia que mais investe em pesquisas e melhorias visando a qualidade do sêmen produzido e comercializado. A coleta do sêmen e a análise espermática tem grande importância nesse processo, sendo as principais responsáveis pela obtenção e pelo controle de qualidade das partidas produzidas.

A coleta deve seguir rigorosos protocolos de manejo e assepsia para a obtenção de uma partida de sêmen com os padrões sanitários e os parâmetros mínimos para a aprovação da partida. As avaliações espermáticas também que tem um papel importante e de grande relevância na busca de um ejaculado de qualidade. As avaliações *in vivo* despendem muito tempo e recursos, tornando-se inviáveis quando se trata de um CCPS, sendo as avaliações *in vitro* as mais indicadas para este tipo de análise.

3.2 Coleta de sêmen

A coleta do sêmen é considerada a principal atividade dos Centros de Coleta e Processamento de Sêmen, pois, está relacionada diretamente a produção da matéria prima. Quando as coletas não conseguem atingir suas metas, toda a produção do Centro estará comprometida.

Existem vários métodos de coleta de sêmen e segundo Silva, et al., (1993) os métodos mais comuns e usados são a vagina artificial, eletroejaculador e massagem retal, e Palmer et al., (2005) sugerem que massagem das ampolas dos ductos deferentes seria um dos métodos mais simples de coleta de sêmen em bovinos. Apesar de simples este método não seria indicado para a coleta de sêmen em CCPS visando o congelamento da amostra, pois, segundo Ohashi, (2008) este método de coleta tem baixa qualidade, baixa concentração espermática e alta contaminação, servindo apenas para avaliação rápida, quando não se tenha outra opção e

se queira avaliar a qualidade espermática do reprodutor, sendo que este método não é utilizado no CCPS Renascer Biotecnologia.

Palmer et al., (2005) demonstraram que amostras de sêmen coletadas de bovinos via massagem das ampolas dos ductos deferentes obtiveram menor porcentagem de motilidade quando comparadas às amostras de sêmen obtidas por eletroejaculação e ainda segundo Ohashi et al., (2011) também apresentam menor qualidade em relação a coleta com vagina artificial.

O eletroejaculador é o segundo método mais utilizado em CCPS e o principal método utilizado por médicos veterinários a campo para a realização de exame andrológico, pois, não necessita o prévio condicionamento do reprodutor a outras formas de coleta. Segundo Bearden e Fuquay, (1984), o eletroejaculador foi desenvolvido em meados de 1940 e os primeiros relatos do seu uso na veterinária teriam sido feitos por Dziuk et al. (1954) que o utilizariam na espécie ovina. De acordo com Barker, (1958) o objetivo do procedimento é estimular os centros ejaculatórios através do plexo mesentérico posterior e gânglios simpático-parassimpáticos anatomicamente relacionados com mínima estimulação dos 20 nervos ciáticos e lombares. Apesar de permitir a coleta do sêmen, o uso do eletroejaculador não permite a avaliação da libido, uma das principais características reprodutivas conforme Ohashi, (2008). Para Chenoweth, (1983) o comportamento sexual de um touro inclui dois componentes: desejo sexual ou libido e a habilidade de monta. A libido seria definida como a vontade e a ânsia para montar e para completar o serviço, segundo Hultnas, (1959). Leon et al., (1991) afirmam que a motilidade do sêmen obtido por eletroejaculação é similar à do sêmen coletado com vagina artificial, porém, o sêmen obtido pela vagina artificial apresenta maior concentração antes do resfriamento e melhor motilidade progressiva depois do congelamento em relação ao coletado com eletroejaculação. O método de coleta utilizando o eletroejaculador é recomendado somente nos seguintes casos: reprodutores que tenham um temperamento violento e não permitam a aproximação de humanos; em animais que possuem algum tipo de deficiência ou patologia nos membros de maneira que impeça a monta e naqueles animais que possuem alguma deformidade no pênis e/ou prepúcio e impossibilite o uso de vagina artificial.

Um dos motivos do não uso do eletroejaculador nas coletas do CCPS é o estresse causado nos reprodutores com este procedimento, o reprodutor associa o uso do tronco de contenção às coletas de sêmen com este método, causando transtornos sempre que os mesmos forem conduzidos ao tronco, tanto para coleta quanto para os demais manejos, sendo que pode

afetar os resultados da avaliação seminal e até mesmo causar risco a integridade física do reprodutor e da equipe responsável pelo manejo.

A Renascer Biotecnologia preza pela qualidade do sêmen produzido assim como também tem o maior cuidado com o bem-estar dos reprodutores que ali estão hospedados. Visando manter o alto padrão nestes quesitos o CCPS realiza a coleta de sêmen com o uso de vagina artificial sempre que possível.

Mies Filho (1982) sugere que a vagina artificial seja o método universal para a coleta de sêmen de rotina. Segundo Bearden e Fuquay, (1984) a primeira vagina artificial teria sido utilizada para a coleta de sêmen de cão por G. Amantea, professor de fisiologia humana na Universidade de Roma e a partir deste modelo, cientistas russos padronizaram vaginas artificiais adequadas para garanhão, touro e carneiro.

É um método definido como parafisiológico, isto é, ele permite que seja mantida a libido normal do macho, a integridade do órgão reprodutivo externo, bem como as características biológicas do sêmen, conforme afirma Bonadonna, (1969), apesar disto, um dos limitadores do uso da vagina artificial é o condicionamento dos reprodutores a serem coletados por este método, condicionamento este que requer tempo e é desaconselhado para animais que não estão acostumados com a presença humana e sua manipulação, segundo Palmer, (2005). Para serem coletados com este método os animais devem possuir habilidade de monta, que segundo Anzar et al., (1993) é caracterizada pela postura do macho durante o salto, a ejaculação e a desmonta.

A vagina artificial bovina é composta por tubo rígido de borracha ou Policloreto de Vinila (PVC), de aproximadamente 40cm de comprimento e 6,5cm de diâmetro, aberto nas duas extremidades. Em seu interior é colocado um tubo flexível de látex, conhecido como mucosa, sendo suas bordas evertidas sobre o tubo rígido e fixado com tiras de borracha próprias para este procedimento, formando um compartimento entre ambos. Este compartimento é preenchido com água morna e ar, visando obter uma temperatura entre 39,0 e 41,0°C no momento da coleta.

A pressão no interior do compartimento é controlada através de uma válvula no tubo rígido. Em uma das extremidades da vagina artificial é acoplado um funil com um tubo coletor, onde será depositado o sêmen e, de acordo com Reichenbach et al., (2008) a segunda extremidade forma a porção vulvar da vagina artificial convencional, na qual o pênis será

introduzido. Macmillan et al., (1966) revelam que a vagina artificial deve receber atenção especial, principalmente quanto a temperatura da água utilizada para o preenchimento desta.

A temperatura da VA é algo de extrema importância no momento da coleta, pois, se esta estiver abaixo do recomendado haverá rejeição do reprodutor em ejacular, causando estresse no animal e possível recusa de próxima monta, assim como haverá saltos em excesso nas vacas manequins, sobrecarregando estas e podendo causar além de possível processo inflamatório das articulações o receio em ser montada novamente, dificultando manejos posteriores destas e coletas subseqüentes.

Assim como a temperatura abaixo do recomendado, o excesso de calor também ocasiona transtornos, podendo causar lesão de queimadura no pênis do reprodutor coletado, o que poderá levar a futura falta de sensibilidade no órgão reprodutor, ou até mesmo contaminação bacteriana se a lesão fosse de maior gravidade. Além dos problemas físicos este procedimento errôneo também causa problemas comportamentais nos reprodutores que ficam receosos em saltar para serem coletados, colocando a perder todo o trabalho de condicionamento prévio realizado com o intuito de coleta com VA.

Outro item importante no momento da coleta com este método é a pressão do interior da vagina artificial, que pode ser aumentada ou reduzida utilizando a válvula do tubo rígido. Esta pressão juntamente com a temperatura da VA visa simular a estrutura fisiológica interna de uma vagina bovina, estimulando o reprodutor a ejacular nesta ao sentir estes estímulos. Uma VA com pouca pressão pode causar os mesmos efeitos negativos de uma VA com temperatura inferior a recomendada.

Segundo Anzar et al., (1993) antes do salto, o touro interage com a fêmea, realizando comportamentos classificados como estímulos táteis, dentre estes estímulos estão os comportamentos de cheirar, lambe o períneo da fêmea, cabecear e empurrar e apoiar o queixo. Apresentam também o reflexo de Flehmen, que foi descrito por Reinhardt, (1983) como sendo o movimento de erguer a cabeça após cheirar a genitália da fêmea, levantando o queixo com a boca aberta, com a língua plana e com eversão dos lábios, fazendo com que as narinas fiquem parcialmente fechadas, possibilitando a inalação do odor *sui generis*, oriundo da genitália da fêmea investigada.

Os reprodutores que foram previamente condicionados a saltar para serem coletados com VA apresentam alguns comportamentos que indicam que este está pronto e prestes a

saltar, essas atitudes devem ser atentadas pelo coletador para não perder o momento do salto e a respectiva coleta.

Quando da realização do salto do reprodutor, o coletador deve desviar o pênis do touro com uma das mãos e apresentar a vagina artificial ao reprodutor com a outra mão, ao sentir o calor e a pressão da vagina artificial o animal fará o movimento de galeio, característico da ejaculação dos bovinos e após descerá da fêmea, finalizando a monta.

Os responsáveis pela coleta do CCPS fazem a excitação dos touros imediatamente antes da coleta. Os touros que serão manejados com buçal são levados até a vaca manequim individualmente e colocados ao lado destas, ligeiramente mais caudal, após alguns minutos o reprodutor é direcionado ao órgão genital da manequim para que possa então cheirar a genitália, após este estímulo o reprodutor salta na vaca, devidamente contida, porém, não é coletado nesse primeiro salto, sendo o pênis desviado da vagina da vaca e não lhe é oferecida a VA, o animal então é forçado a descer da manequim tendo o seu buçal puxado. Este procedimento deixa o reprodutor mais excitado ainda, sendo que no próximo salto poderá ser repedido novamente o procedimento ou realizada a coleta do sêmen com a VA. Esta decisão é tomada pelo coletador ao observar a existência ou a ausência de excitação pelo reprodutor.

Os reprodutores que não são manejados com buçal são soltos individualmente dentro da unidade de coleta onde estão as manequins devidamente contidas, o reprodutor escolhe em qual destas ele montará ou poderá ser direcionado a uma delas pelos tratadores e pelo coletador. Ao chegar na manequim escolhida o reprodutor apresenta o comportamento característico de pré-monta, cheirando e lambendo o períneo e a vagina da vaca. O touro realiza o salto na manequim tendo o pênis desviado assim como os demais reprodutores. O animal é então forçado a descer da vaca utilizando, para isso, as mãos que forcem o focinho deste para que o mesmo desça e seja coletado somente após o segundo ou terceiro salto.

Este procedimento também é utilizado em alguns animais que tem a libido muito alta e são muito ansiosos, saltando na manequim com o órgão reprodutor ainda em repouso, o que acontece principalmente com reprodutores muito novos.

Foi constatado no laboratório do CCPS que os touros coletados após o prévio desvio e a conseqüente maior excitação, apresentam um volume maior do ejaculado e também motilidade e vigor acima dos resultados obtidos com as coletas sem este procedimento.

No estágio foi possível observar que cada reprodutor tem um comportamento próprio assim como uma maneira de ser coletado. Os coletadores preparam a vagina artificial individualmente para cada reprodutor conforme a preferência destes. Alguns são coletados em VA com muita pressão, outros com pouca, existem também aqueles que preferem a VA com temperatura um pouco acima do recomendando.

A libido também seria um fator de muita importância no momento da coleta com VA, pois reprodutores sem libido não saltam na manequim impossibilitando a coleta. Visando estimular estes reprodutores alguns métodos são utilizados pelo CCPS como a sincronização de estro de uma das manequins, a coleta com a manequim livre do tronco de contenção e até mesmo a utilização de um macho castrado como manequim para alguns touros que se recusam a saltar nas fêmeas e saltam somente em outro macho. A sincronização de estro, porém, não é realizada em todas as coletas, por ser inviável devido à pouca quantidade de manequins e por estimular os reprodutores a saltar somente quando estas estiverem em cio, desfazendo assim todo o trabalho de condicionamento dos reprodutores realizado anteriormente.

O CCPS abre mão de todos os recursos para a coleta dos reprodutores com VA, deixando o método de coleta com eletroejaculador somente para os reprodutores que não podem ser condicionados pela sua agressividade, para os que possuem algum problema que dificulte a monta ou ainda naqueles que não saltam nas manequins por total falta de libido.

De acordo com Akhter et al., (2008) a coleta do sêmen não é um procedimento estéril e certo grau de contaminação bacteriana não pode ser evitado. Genovez et al., (1999) também afirmam que apesar de adotar as melhores e mais adequadas condições de coleta, pode ser observada contaminação microbiana. Esta contaminação segundo Thibier e Guerin, (2000), provém da superfície do pênis e prepúcio, da área de coleta, de equipamentos e de possível manipulação inadequada da vagina artificial.

Todos os equipamentos utilizados nas coletas de sêmen no CCPS Renascer Biotecnologia eram esterilizados e os coletadores usavam luvas de plástico descartável no momento da coleta. Os reprodutores também eram higienizados imediatamente antes das coletas, utilizando água corrente e lenços de papel descartáveis para a secagem da área do prepúcio com a finalidade de impedir que a água entrasse em contato com o sêmen coletado.

Por fim, vale ressaltar que o estado higiênico do sêmen é importante para a viabilidade do espermatozoide e para a fertilidade da vaca inseminada, conforme Jasial et al., (2000)

fazendo com que o processo seja finalizado com êxito e ocorra a fecundação do ovócito II e a consequente origem de uma nova vida.

3.3 Sistema computadorizado de análise espermática (CASA)

A constante evolução das biotecnologias voltadas à reprodução animal é fator preponderante para utilização de novos métodos de análise e criopreservação de sêmen, tanto para o uso em inseminação artificial, transferência de embriões, clonagem ou até mesmo como reserva genética de linhagens e/ou espécies com valor agregado relevante.

A análise espermática é indispensável na busca de um sêmen de qualidade e que contenha os requisitos básicos para ser submetido ao processo de criopreservação e mantenha um nível aceitável de motilidade e vigor após a descongelação, nesse sentido Varner et al., (1991) afirmam que a motilidade é um importante fator, constituindo um dos parâmetros principais para predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen.

Segundo Pesch; Hoffmann, (2007) a criopreservação de células espermáticas bovinas para o uso em inseminação artificial é uma biotecnologia de grande impacto na reprodução animal, porém, para que o sêmen esteja apto ao processo de criopreservação, este deverá possuir alguns valores mínimos nos critérios avaliados, pois, conforme afirma Yanagimachi et al., (1994) para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas normais.

No CCPS Renascer Biotecnologia a análise primária do sêmen era realizada utilizando uma porção do ejaculado logo que este chegava ao laboratório, que era depositada entre lâmina e lamínula e levada ao microscópio óptico, com placa aquecedora, onde este era analisado em aumento de 400 vezes, predizendo o valor da motilidade total e vigor.

Embora a análise de células espermáticas sob microscopia óptica convencional, representem a principal análise laboratorial utilizada pelas centrais de inseminação artificial, conforme Arruda *et al.*, (2005), estas possuem limitações quanto a fidedignidade dos resultados, pois, a análise poderá ser considerada subjetiva e segundo Arruda, (2000) são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores.

Na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação convencional do sêmen, diversos sistemas de análise computadorizado de avaliação espermática (*Computer Assisted Sperm Analysis - CASA*) têm sido propostos e aplicados, visando também incrementar o estudo da andrologia humana e das espécies animais conforme afirma Malmgren, (1997).

Amann e Katz (2004), afirmam que CASA refere-se a um sistema automatizado (*Hardware e Software*) para visualizar e digitalizar imagens sucessivas dos espermatozoides, processando, analisando e fornecendo informações acuradas, precisas e significativas da cinética individual das células, e também valores estatísticos médios sumarizados da população global. Ferreira *et al.*, (1997) reafirmam este entendimento e ressaltam que para se obter uma técnica que demonstre maior repetibilidade, o sistema computadorizado de análise espermática representa um método objetivo que gera informações importantes a respeito das propriedades cinéticas de um ejaculado baseando-se na avaliação individual das células.

Os sistemas de análise computadorizado de avaliação espermática baseiam-se em imagens fotográficas digitalizadas obtidas sequencialmente dos espermatozoides a serem analisados, buscando sempre a identificação e a localização das mesmas células espermáticas em todas as imagens sequenciais, definindo suas trajetórias que são matematicamente processadas, elaborando os resultados totais dos parâmetros avaliados.

Os resultados desses processamentos são refletidos em uma serie de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozoide, conforme afirmam Quintero Moreno *et al.*, (2003). Este tipo de análise não determina somente a porcentagem da motilidade, mas também quantifica características específicas do movimento espermático, segundo Malmgren, (1997)

O CCPS Renascer Biotecnologia, na busca da excelência dos serviços prestados, pesquisou no mercado internacional as mais inovadoras e modernas tecnologias de análise espermática e trouxe ao Brasil o Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen IVOS II – Hamilton Thorne, tornando-se o único CCPS do país a contar com este equipamento.



FIGURA 13 - Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA) IVOS II – Hamilton Thorne.
Fonte: Arquivo Pessoal.

Segundo Technical Guide, Hamilton Thorne Biosciences, (2005) os sistemas CASA da empresa *Hamilton Thorne Bioscience* utilizam-se de uma iluminação estroboscópica de 662 nm para obter imagens precisas dos espermatozoides móveis. Essa iluminação atinge a amostra a ser avaliada com uma serie de *flashes* de 1 a 3 milisegundos em uma frequência de 60 Hz. Efetivamente congelando a imagem do espermatozoide durante a captura da imagem, a iluminação estroboscópica assegura imagens exatas das células em movimento, removendo erros devido a imagens desfocadas

O protocolo utilizado pelo CCPS Renascer Biotecnologia preconiza que as partidas de sêmen, que após serem analisadas em microscopia óptica convencional, devem passar pelo processo de criopreservação somente se nessa análise obtivessem o mínimo de 70% de motilidade total e vigor igual ou superior a 03 (três), conforme tabela de padrão seminal para seleção de reprodutores para monta natural.

TABELA 02 - Padrão seminal para seleção de reprodutores para monta natural

Espécie	Bovino	Caprino	Ovino	Equino	Suíno
Motilidade	70	70	70	70	70
Vigor	3	3	3	3	3
Morfologia %					
Sptz anormais	30%	20%	20%	30%	20%

Fonte: Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª ed., 1998.

Após realizado o processo de criopreservação, uma amostra de cada partida era descongelada e avaliada novamente, porém, desta vez a análise ficava a cargo do CASA IVOS II – Hamilton Thorne. Segundo Graham, (2001) durante o processo de congelamento/descongelamento ocorre o decréscimo da população espermática viável devido a danos nas membranas espermáticas, citoesqueleto e núcleo espermático. Sabedores deste decréscimo, visando cumprir as exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e buscando manter os mais altos padrões de qualidade sanitária e de fertilidade, os responsáveis pelo CCPS, somente aprovavam as partidas em que a amostra analisada pelo CASA obteve motilidade total mínima de 35%, motilidade progressiva mínima de 20% e não menos que 25×10^6 espermatozoides por dose.

O CCPS utiliza este método de análise espermática, pois acredita que a fidedignidade do resultado obtido com o CASA não deixa dúvidas de que a amostra contém exatamente os valores constantes no laudo da partida. As partidas nas quais o resultado da análise obtido com o CASA fossem inferiores aos exigido pelo protocolo do CCPS, em qualquer dos parâmetros, eram totalmente descartadas.

O uso do protocolo, utilizando primeiramente a análise com microscopia óptica e posteriormente a computadorizada, é de suma importância na identificação de partidas nas quais os espermatozoides sejam mais sensíveis ao processo de congelamento/descongelamento, pois algumas das partidas analisadas, embora tenham sido aprovadas na primeira análise, foram reprovadas quando foi utilizado o CASA.

Além de buscar partidas com espermatozoides hipersensíveis a criopreservação, o sistema de análise computadorizado também visa abolir os possíveis erros de análise humana, pois como já citado anteriormente por Arruda, (2000) as análises por microscopia óptica seriam influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores.

Todas as partidas que foram reprovadas nas análises computadorizadas observadas no estágio, exceto uma, foram aprovadas anteriormente em análise de microscopia óptica com valor de motilidade total e vigor próximos ao limite de aprovação, demonstrando que a subjetividade da análise humana é totalmente absorvida quando se obtivesse uma análise computadorizada com extrema precisão em seus resultados. A única análise que apresentou maior discrepância dos resultados obtidos entre análises de microscopia óptica e a computadorizada foi a de um reprodutor que sabidamente produz espermatozoides hipersensíveis ao processo de criopreservação.

Outro diferencial que o CASA apresenta, além do resultado praticamente exato na avaliação da motilidade total e progressiva, é o resultado da concentração aproximada de espermatozoides por dose de sêmen avaliada, sendo que a avaliação da concentração utilizando a contagem de espermatozoides na câmara de Neubauer despenderia muito tempo e seria de certa forma muito cansativa ao avaliador quando se tem que realizar este processo em diversas doses em pouco tempo, como ocorreria na rotina de um CCPS.

Embora o custo de um CASA seja muito elevado para a sua utilização em rotina, e seu uso inviável a campo, ele é considerado um instrumento inovador tecnologicamente e de extrema importância na busca de um sêmen de qualidade tornando-se indispensável quando tratar-se de um CCPS, que deve manter um padrão muito acima do aceitável na motilidade, vigor e concentração das doses armazenadas e comercializadas.

3.4 Análise da morfologia espermática

As avaliações quantitativas do sêmen são de grande importância na busca de um ejaculado fértil, porém, a morfologia espermática também tem papel fundamental nesse processo, sendo corresponsável pelo sucesso ou pelo declínio na taxa de prenhez de um rebanho inseminado.

Fernandes e Moraes, (2009) avaliam que o exame de sêmen, juntamente com a avaliação clínica fornecem muitas informações a respeito do reprodutor, assim a motilidade, concentração e morfologia espermática devem estar presentes na avaliação dos mesmos, juntamente da anamnese e exame clínico, assim como Rao et al, (1980) que também entendem

que o padrão de qualidade do sêmen baseia-se na proporção de células móveis e morfologia espermática.

Parkinson, (2004) avalia que apenas uma característica do sêmen não garante que as outras venham a ser normais, portanto indica uma análise multifatorial para fins de diagnóstico da funcionalidade e estrutura do espermatozoide, entendimento este reafirmado por Barth e Oko, (1989) ao avaliarem que a motilidade e a produção espermática (concentração e volume) estão relacionadas com a morfologia, podendo indicar até que ponto a motilidade e a produção espermática estariam dentro dos padrões fisiológicos.

Williams, (1920) já observava que alterações morfológicas dos espermatozoides estariam associadas com baixa fertilidade em touros e a avaliação da morfologia espermática sob microscopia óptica, desde então, vem constituindo uma parte importante para a investigação da baixa fertilidade em touros.

Para a avaliação de rotina das características morfológicas dos espermatozoides, podem ser utilizadas duas técnicas: esfregaço corado em microscópio de campo claro e preparação úmida com microscópio de contraste de fase, segundo Freneau, (2011), os esfregaços podem ser corados com Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-nigrosina, Karras e outros.

O espermatozoide é formado basicamente por cabeça, peça intermediária e peça principal da cauda. A cabeça é a parte mais importante do espermatozoide, contendo o núcleo do gameta masculino e acrossoma. A peça intermediária contém mitocôndrias, responsáveis pela produção de trifosfato de adenosina (ATP), essencial para o movimento da célula espermática, e a cauda que tem como função o deslocamento do espermatozoide pelo trato reprodutor feminino.

As diferentes morfologias espermáticas são classificadas de várias maneiras, porém durante muitos anos teriam sido classificadas pela região a qual se encontraria o defeito, sendo cabeça, acrossoma, cauda e peça intermediária. Segundo Hoard e Pace, (1988) outras classificações dividem os grupos de defeitos em primários e secundários, ou defeitos maiores e menores, Freneau, (2011) considera que existam ainda anomalias terciárias, originadas pela manipulação dos espermatozoides após a ejaculação, que segundo Lagerlöf, (1936) acontece principalmente, quando os espermatozoides são expostos a ambiente hipotônico ou ao frio, induzindo às dobras nas caudas, enquanto manipulações bruscas podem causar o destacamento das cabeças ou fraturas das caudas.

Blom, (1950) classificou os defeitos espermáticos em Primários e Secundários, de acordo com a sua origem, assim vemos na tabela abaixo.

TABELA 03 – Defeitos Primários e Secundários segundo Blom, (1950)

Primários	Secundários
Acrossoma (Granulo persistente ou Knobbed, destacado e outros)	Cauda dobrada ou enrolada com gota
Gota citoplasmática proximal	Gota citoplasmática distal
Subdesenvolvido	Cabeça isolada normal
Cabeça isolada patológica	Abaxial, retroaxial e oblíqua
Cabeça estreita na base	Cauda dobrada ou enrolada
Cabeça piriforme	
Cabeça pequena anormal	
Contorno anormal	
Cabeça c/ vacúolos nucleares (pouch formation ou diadema, cratera)	
Formas teratológicas	
Peça intermediária (saca-rolha	
Corkscrew, fibrilação, desnuda, fratura, edema, peça intermediária rudimentar ou stump, pseudo-gota e outros)	
Cauda fortemente dobrada/enrolada	
Cauda enrolada na cabeça	
Cabeça curta, larga, gigante, pequena	
Cabeça delgada	

Para Saacke, (1998) os defeitos espermáticos podem ser classificados em compensáveis e incompensáveis. Segundo o autor os defeitos compensáveis são aqueles de importância no transporte do espermatozoide pelo trato reprodutor feminino, até o bloqueio da poliespermia, estes espermatozoides podem reduzir a fertilidade do ejaculado pela incapacidade de alcançar a ampola da tuba uterina, assim como também são responsáveis por uma redução na porcentagem da motilidade progressiva. São considerados defeitos compensáveis, pois ainda segundo o Saacke, (1998), o aumento da quantidade de espermatozoides funcionalmente competentes poderia compensar ou minimizar o problema da fertilidade da partida com essas anomalias espermáticas.

Os defeitos incompensáveis ou não compensáveis seriam aqueles importantes para a manutenção da fertilização e posteriormente a embriogênese, que foram associados a defeitos na cromatina, assim como defeitos que alteram significativamente o formato da cabeça do espermatozoide.

Blom, (1973) classificou os defeitos em Maiores e Menores, associando a classificação ao grau de importância do defeito para a fertilidade, sendo que estes devem ser expressos em porcentagem.

TABELA 04 – Classificação dos espermatozoides de acordo com os Defeitos Maiores e Menores, segundo Blom, (1973)

Maiores	Menores
Defeitos de Acrossoma (<i>Knobbed</i> , Grânulo persistente, Destacado)	Gota citoplasmática Distal
Gota Citoplasmática Proximal	Cabeça Delgada
Subdesenvolvido	Cabeça curta, larga, gigante, pequena
Cabeça isolada Patológica	Cabeça isolada normal
Cabeça estreita na Base	Inserção Abaxial, retroaxial e oblíqua
Cabeça Piriforme	Cauda dobrada ou enrolada
Cabeça Pequena Anormal	
Contorno Anormal	
Cabeça com vacúolos (<i>Diadema</i> ou <i>pouch formation</i>)	
Peça intermediária (saca-rolha <i>Corkscrew</i> , fibrilação, desnuda, fratura, edema, peça intermediária rudimentar ou <i>stump</i> , pseudogota e outros)	
Formas Teratológicas	
Cauda fortemente dobrada/enrolada	
Cauda enrolada na cabeça	
Cauda dobrada ou enrolada com gota	

A classificação dos defeitos espermáticos em maiores e menores é a mais empregada, sendo que os defeitos maiores estão relacionados com infertilidade e doenças testiculares ou epididimárias, e que os defeitos menores são referentes a anomalias de menor impacto na fertilidade. Estas anomalias têm diferentes causas, e podem ser oriundas desde a espermatogênese até o final de seu transporte pelo trato reprodutor masculino.

Segundo Johnson et al., (2000), a espermatogênese é a soma total dos eventos que ocorrem nos testículos e que levam à produção de espermatozoides, afirmação esta detalhada por Kudryavtsev et al., (2003) ao afirmarem que constitui em uma série de divisões celulares sucessivas que ocorrem no epitélio dos túbulos seminíferos e que transformam uma célula germinativa diploide em um gameta masculino haploide.

Zerobin e Bertschinger, (1978) relatam que vários estudos mostram que alterações morfológicas podem ter origem durante as diferentes fases de vida do espermatozoide, dentre elas a espermatogênese, Garcia, (2004) já relatava que a espermatogênese seria um evento extremamente delicado e que qualquer fator capaz de alterar esse processo resultaria na produção de espermatozoides anormais.

Os defeitos mais comuns de serem encontrados em um espermograma bovino, segundo Fernandes e Moraes, (2009) são: cauda dobrada, cauda fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota. Estes são observados com maior frequência em ejaculados de touros com alterações epididimais, em função do ambiente hiposmótico, que favorecem as alterações na cauda dos espermatozoides (AMANN e HAMMERSTED, 1993). Os defeitos de cauda dobrada simplesmente podem ser ocasionados por redução brusca de temperatura, este defeito quando associado a outros de cauda pode ser relacionado a problemas epididimários.

Barth e Oko, (1989) relatam que defeitos de peça intermediária em saca rolhas, fraturada e *stump*, são defeitos originários do túbulo seminífero devido à perda e/ou desorganização dos feixes de fibras ou mitocôndrias da peça intermediária. Para Blom, (1973) os defeitos de cabeça indicam uma espermatogênese imperfeita, tendo origem no epitélio seminífero, os mesmos diminuiriam no trajeto do ducto deferente até a ejaculação pois muitos são fagocitados na via excretora e segundo Barth e Oko, (1989) a forma da cabeça do espermatozoide seria derivada da forma do núcleo. Chenoweth, (2005) afirma que modificações na cabeça espermática estão associadas a alterações transitórias ou permanentes na espermiogênese, decorrentes de lesões traumáticas testiculares, estresse calórico, febre, excesso de proteína na ração (acima de 15% de proteína bruta), doenças sistêmicas, uso prolongado de corticoides, nas hipoplasias mais graves e, ainda, podem ser de origem genética.

As anormalidades de acrossoma, quando em altas proporções, são relacionadas com esterilidade total dos machos, porém, quando em baixa frequência – de 1 a 2% – podem ser encontradas em animais com fertilidade aparentemente normal, segundo afirmam Bane e Nicander, (1965). Barth e Oko, (1989) afirmam que os defeitos de acrossoma incluem acrossoma rompido, enrugado ou dobrado, destacado e *knobbed acrosome* ou grânulo persistente do acrossoma. O rompimento do acrossoma pode ter como causas falhas na espermatogênese, durante a maturação e transporte espermático e também pode ocorrer após o processo de criopreservação. Thundathil, *et al* (2000) afirmam que o defeito *Knobbed*, ou grânulo persistente pode ter origem de gene autossômico recessivo com herança ligada ao

sexo e ainda que espermatozoides contendo este defeito perdem ou reduzem sua capacidade de anexar-se ao óvulo, e segundo Mitchell, (1985) diminuem o trânsito no trato genital da vaca.

Hermo et al., (1994) relatam que a gota proximal se origina nas fases finais da espermiogênese e tem referência à manutenção dos corpos residuais oriundos das organelas que compunham o citoplasma das espermátides. Essa gota, nada mais é do que um resquício do citoplasma da ponte intercelular, que liga as células germinativas oriundas da espermiogênese, que não foi eliminado corretamente e ficou aderido à porção proximal da peça intermediária.

Segundo o Grupo de Trabalho de Andrologia Bovina, instituído pela Portaria n.109/2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento-MAPA (Brasil, 2009) para proceder à revisão do “Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal”, os ejaculados de touros devem seguir os padrões abaixo relacionados:

- Espermatozoides normais - valor mínimo de 70% de células normais. Esta é a característica isolada que tem maior importância para a fertilidade do touro no rebanho;
- Defeitos maiores - o valor máximo de tolerância de até 20%. O rigor ou tolerância na interpretação dessa característica deve levar em consideração o quadro clínico e espermático do animal e inclusive a distribuição dos defeitos individuais;
- Defeitos menores - o valor máximo de tolerância de até 30%, respeitado o limite de 70% de normais e, inclusive, a distribuição dos defeitos individuais;
- Defeitos individuais - sugere-se que os limites individuais de anormalidades sejam de até 5% para defeitos maiores e 10% para defeitos menores

Diferente do que ocorre em CCPS a realização de exames andrológicos a campo, muitas vezes suprimem a análise da morfologia espermática, deixando de tomar conhecimento da real situação reprodutiva do macho em questão, aprovando animais poderiam apresentar problemas de infertilidade. A não realização desta análise também pode causar prejuízos econômicos ao proprietário do rebanho, pois teria uma taxa de prenhez comprometida.

Durante a realização do estágio foram acompanhados 155 (cento e cinquenta e cinco) análises de morfologia e patologia espermática, sendo que destas, 85,16% foram aprovadas, revelando que cerca de 15% do sêmen avaliado estavam com a sua fertilidade comprometida, comprovando que a realização de análise de morfologia e patologia espermática tem muita

importância no processo de obtenção de um sêmen de qualidade e a aprovação ou não de um reprodutor para ingressar no rebanho em período de monta.



FIGURA 14 – a) Espermatozoide com fratura da peça intermediária (seta preta) e espermatozoide com cabeça isolada (seta branca); b) Espermatozoide com gota citoplasmática distal; c) Espermatozoide com cauda dobrada; d) Espermatozoide com cauda fortemente dobrada e gota citoplasmática; e) Espermatozoide com cauda enrolada; f) Espermatozoide com cauda fortemente enrolada. Fonte (Martins, Done e Silva, 2016)

Os defeitos mais comuns encontrados nas análises acompanhadas durante o ECSMV foram cauda dobrada, cauda fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota, reiterando o que já era constatado por Fernandes e Moraes, (2009). 5,16% das amostras que foram reprovadas obtiveram mais de 5% de defeitos de cauda fortemente dobrada ou enrolada, característica esta de animais com alterações epididimais, em função do ambiente hiposmótico, que favorecem as alterações na cauda dos espermatozoides como já afirmado anteriormente por Amann e Hammersted, (1993). O restante das partidas com morfologia espermática comprometida nas análises, obtiveram mais de 30% de defeitos totais.

A morfologia espermática também pode ser utilizada como indicador de alterações relacionadas ao manejo dos animais, como estresse térmico, deficiências nutricionais ou hormonais, uso contínuo de medicamentos e até mesmo a obesidade. Muitos desses defeitos podem ser corrigidos com uma simples mudança no manejo. Visando a correção das anormalidades espermáticas reversíveis, a interação entre laboratório e pessoal de campo deve estar em sintonia para que as devidas correções de manejo ocorram de forma eficaz.

4 - CONCLUSÃO

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária foi de extrema importância para o acompanhamento e a realização de atividades práticas reforçando o aprendizado adquirido durante o curso.

A realização do ECSMV em um local com uma tecnologia inovadora, funcional e extremamente eficiente no que se propõe, foi uma experiência única e valiosa na formação acadêmica e profissional, pois, muitos dos conhecimentos adquiridos no estágio serão valiosos no transcorrer da carreira profissional vindoura.

Por último e não menos importante, ressalto o convívio direto com a área de trabalho, proprietários, colegas, médicos veterinários e demais colaboradores, que contribuíram informando, orientando e auxiliando nas atividades desenvolvidas e nas tomadas de decisões, demonstrando que de nada basta ser um ótimo profissional se não soubermos nos comunicar e nos relacionar como público ao qual teremos contato diretamente futuramente.

REFERÊNCIAS

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; ANDRABI, S.M.H. **Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen.** *Reprod. Dom. Anim.*, v. 443, p. 272-278, 2008.

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. **Reflections on CASA after 25 years.** *Journal of Andrology*, v. 25, n 3, p. 317-325, 2004.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. **In vitro evaluation of sperm quality: an opinion.** *J Androl*, v.14, p.397-406, 1993.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).** São Paulo, SP, 2000. 121p. Tese (Livre Docência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo.

ARRUDA, R. P.; FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F. **Effects of cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotectants on plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes of bovine spermatozoa.** *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p. 329, 2005.

BANE, A.; NICANDER, L. **Pouch formations by invaginations of the nuclear envelope of bovine and porcine sperm as a sign of disturbed spermiogenesis.** *Nord Vet Med*, v.17, p.628-632, 1965.

BARKER, C.A.V. **The collection of semen from bulls, rams and buck by electro-ejaculator.** *Can. J. Compar. Med.*, v. 22, n. 1, 1958.

BARTH, A.D.; OKO R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J. **Applied animal reproduction**. 2ªed., New Jersey, Prentice-Hall, p. 365, 1984.

BLOM, E. **Interpretation of spermatic citology in bulls**. *Fertil Steril*, v.1, p.223-238, 1950.

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.

BONADONNA, T. **A world survey of artificial breeding. II Technique**. *Br. Vet. J.*, v. 125, p. 580-587, 1969.

BONADONNA, T. **A world survey of artificial breeding. II Technique**. *Br. Vet. J.*, v. 125, p. 580-587, 1969.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO. Portaria n° 109, de 25 de maio de 2009. **Institui Grupo de Trabalho no âmbito do Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários - DFIP/SDA, com a finalidade de atualizar o Manual de Procedimentos para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 maio 2009. Seq. 1, p.5.

CHENOWETH, P.J. **Sexual behavior of the bull: a review**. *J. Dairy Sci.*, v. 66, p. 173-179, 1983.

CHENOWETH. P.J. **Genetic sperm defects**. *Theriogenology*, v.64, p.457-468, 2005.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CRA). **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

DZIUK, P.J.; GRAHAM, E.F.; DONKER, J.D. et al. **Some observations in collection of sêmen from bulls, goats, boars and rams by electrical stimulation.** Vet. Med., v. 69, 1954.

FERNANDES, C.E.; MORAES, J.C.F. Avaliação Clínica e Exame de Sêmen no Touro. In: **Fertilidade, funcionalidade e genética de touros zebuínos.** 1 ed. Corumbá: Embrapa Pantanal; Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; Planaltina: Embrapa Cerrados, 2009.

FERREIRA, J.C.P., NEVES NETO JR, PAPA, F.O. **Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada.** Rev Bras Reprod Anim, v.21, p.131-132, 1997.

FRENEAU, G.E. **Aspectos da morfologia espermática em touros.** Rev Bras Reprod Anim, v.35, p.160-170, 2011.

GARCIA, A.R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (*Bos taurus taurus*).** 2004. 258f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2004.

GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.P.; FACIOLLI, M.R. et al. **Avaliação bacteriológica de sêmen in natura industrializado de touros.** Rev. Bras. Reprod. Anim., v. 23, p. 403-405, 1999.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal** – 2. ed. – São Paulo: Roca, 2008.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality. In: **Annual Convention of the AAEP**, 47, 2001, San Diego, CA. San Diego, CA: AAEP, 2001. p.302-305.

HAMILTON THORNE BIOSCIENCES, **Technical Guide**. (HTM-IVOS, Versão 12.3, Hamilton Thorn Research, Beverly, Massachusetts, USA) 2005.

HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C.R. **Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation**. *Int Rev Cytol*, v.154, p.105-189, 1994.

HOEARD, T.W.; PACE, M.M. Seminal evaluations and artificial examination. In: **Fertility and infertility in veterinary practice**. 4.ed. London: Bailliere Tindall. p.39-51. 1988.

HULTNAS, C.A. **Studies on variation in mating behavior and semen picture in young bulls of the Swedish Red-and-White breed and on causes of this variations**. *Acta Agric. Scand.*, v. 9, suppl. 6, p. 1-82, 1959.

JASIAL, S.; KATOCH, R.C.; CHACHARA, D.; MAHAJAN, A. **Evaluation of bacterial load in fresh ejaculates of bovine and buffalo bull semen in Himachal Pradesh**. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 70, n. 5, p. 465-467, 2000.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. **Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach**. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.471-480, 2000.

KUDRYAVTSEV, I.V.; SAFRONOVA, L.D.; KUDRYAVTSEV, P.I. **Genetic control of spermatogenesis and sex determination in mammals**. *Russ J Dev Biol*, v.34, p.337-346, 2003.

LAGERLÖF, N. **Sterility in bulls**. *Vet Rec*, v.41, p.1159-1173, 1936.

LEON, H.; PORRAS, A.A.; GALINA, C.S.; NAVAROO-FIERRO, R. **Effect of collection method on sêmen characteristics of Zebu and European type cattle in tropics**. *Theriogenology*, v.36, n.3, p.349-355, 1991.

LINFORD, E.; GLOVER, F. A.; BISHOP, C.; STEWART, D. L. **The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull.** *Reproduction*, v. 47, p. 283-291, July 1976.

MACMILLAN, K.L.; HAFS, H.D.; DESJARDINS, C. KIRTON, K.T. **Some semen characteristics in dairy bulls ejaculated with artificial vaginas at varying temperatures.** *J. Dairy Sci.*, v. 49, n. 9, p. 1132-1134, 1966.

MALMGREEN, L. **Assessing the quality of raw sêmen. A review.** *Theriogenology* v 48, p 523 – 530, 1997

MARTINS, C. F; DONE, M. A. N; SILVA, A. E. D. F, **Atlas de morfologia espermática bovina.** 1ª ed. Embrapa Cerrados. Brasília, 2016.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial.** Volume 2. 5ª ed., Porto Alegre, Sulina, p. 352-768, 1982.

MITCHELL, J. R. **Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract.** *Journal of animal science*, v. 61, n. 4, p. 956, 1985.

OHASHI, O.M. Inseminação artificial em bubalinos. In: GONÇALVES, P.B.D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** 2.ed. Roca, 2008, p.97-110.

OHASHI, O.M.; SANTOS, S.S.D.; MIRANDA, M.S. et al. **Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*).** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.35, n.2, p.88-94, 2011.

PALMER, C.W. **Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls.** *Theriogenology*, v. 64, p.469-479, 2005.

PALMER, C.W.; BRITO, L.F.C.; ARTEAGA, A.A. et al. **Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls.** Anim. Reprod. Sci., v. 87, p. 25-31, 2005.

PARKINSON, T. J. **Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls.** The

PESCH, S.; HOFFMANN, B. **Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine.** Journal fur Reproduktionsmedizin Endokrinologie, V2, p. 101 – 105. 2007.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. **Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates.** Theriogenology, v. 59, p. 1973-1990, 2003.

RAO, A.R.; BANE, A.; GUSTAFSSON, B.K. **Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis.** Theriogenology, v.14, p.1-12, 1980.

SAACKE, R.G. AI fertility: Are we getting the job done? In: **NAAB Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction**, 17, 1998, Madison, WI. Columbia, MS: National Association of Animal Breeders, 1998. p.6-12.

SILVA, A.E.D.F.; DODE, M.A.N.; UNANIAN, M.M. **Capacidade Reprodutiva do Touro de Corte: funções, anormalidades e fatores que a influenciam.** Embrapa – CNPGC. Campo Grande, 1993.

THIBIER, M.; GUERIN, B. **Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination.** Anim. Reprod. Sci., v. 62, p. 233-251, 2000.

THUNDATHIL, J.; MEYER, R.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. **Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production.** Theriogenology, v.54, p.921-934, 2000.

TULI, R. K.; SCHMIDT-BAULAIN, R.; HOLTZ, W. **Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat.** Theriogenology, v.38, p.487-490, 1992.

VARNER, D.D.; VAUGHAN, S.D.; JOHNSON, L. **Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoa motility.** American Journal of Veterinary. Research., v 53, p. 224 – 230, 1991

Veterinary Journal, v. 168, n. 3, p. 215-299, Nov. 2004.

WILLIAMS, W.W. **Technique of collecting semen for laboratory examination with review of several diseased bulls.** Cornell Vet, v.10, p.87-94, 1920.

YANAGIMACHI, R. **Fertility of mammalian spermatozoa: Its development and relativity.** *Zygote*, 2(4), 371-372. 1994.

ZEROBIN, V.K.; BERTSCHINGER, H.J. **Diploid DNA-content in sperms of brown swiss bulls.** Zuchthygiene, v.13, p.113-120, 1978.

ANEXO A - Certificado de conclusão do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.

Certificado

Certificamos que

Diego do Nascimento Couto

Realizou estágio na Central de Congelamento e Processamento de Sêmen Bovino, **Renascer Biotecnologia**, no período de: 05/02/2018 à 30/04/18, totalizando 488 horas.

Barra do Quaraí, 30 de Abril de 2018.

Cecília Machado Pavin
Cecília Machado Pavin
Médica Veterinária

Natasha Frasson Pavin
Natasha Frasson Pavin
Biotecnóloga

BR 472, Km 615, Distrito de Gutierrez - Barra do Quaraí/RS - (55) 999.993.141
contato@renascerbiotecnologia.com.br - www.renascerbiotecnologia.com.br



RENASCER
BIOTECNOLOGIA

ANEXO C - Laudo de Avaliação espermática utilizando o Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA).



CENTRAL DE CONGELAMENTO E
PROCESSAMENTO DE SÊMEN BOVINO

IDENTIFICAÇÃO

Data e Hora da Análise sexta-feira, 4 de maio de 2018 16:11:4
Identificação do Animal ABSOLUTO
Número da partida 040518

RESULTADOS DA ANÁLISE


PARÂMETRO	RESULTADO	PADRÃO	UNIDADE
Contagem de Células	1357	-	células (na amostra)
Concentração Total	100,5	>80	M/mL
Células Móveis	50	35	%
Células Progressivas	38	20	%

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Células Rápidas	47	%	Velocidade TOTAL	222,4	µm/s
Células Médias	3	%	Velocidade MÉDIA	122	µm/s
Células Lentas	7	%	Velocidade RETILÍNEA	99,9	µm/s
Células Paradas	43	%			

LAUDO DA ANÁLISE

Material **APTO** pela Central.

Liberao por 
Cecilia Machado Pavin (RT: RS-14645-VP)

RENASCER BIOTECNOLOGIA - Central de Congelamento e Processamento de Sêmen Bovino

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

@ contato@renascerbiotecnologia.com.br

(55) 99999-3141

f Renascer Biotecnologia