

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

LILIAN SCALON ZACHETA

INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE BOVINOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS
ESPERMÁTICAS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Uberlândia
2025

LILIAN SCALON ZANCHETA

**INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE BOVINOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS
ESPERMÁTICAS E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

Projeto de pesquisa apresentado à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para aprovação na disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Renata Lançoni

**Uberlândia
2025**

RESUMO

O uso do sêmen bovino criopreservado para inseminações artificiais é uma prática amplamente difundida na reprodução desta espécie atualmente. Assim, é de extrema importância analisar a qualidade seminal para garantir uma boa taxa de fertilidade. Porém, a presença de bactérias no sêmen utilizado pode levar a perda de integridade de membranas espermáticas e maior produção de espécies reativas de oxigênio, o que pode inviabilizar sua fertilidade. Dessa forma, o objetivo com este trabalho foi analisar a influência da contaminação bacteriana no sêmen criopreservado de bovinos sobre a motilidade pós descongelamento, integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, além de avaliar a influência das bactérias na produção *in vitro* de embriões. Para análise da influência da contaminação bacteriana, foram utilizadas seis partidas de sêmen, sendo três com contaminação bacteriana e três sem contaminação bacteriana, ambas coletadas do mesmo touro para maior controle de variáveis. Para análise da produção *in vitro* de embriões, as partidas de sêmen com e sem contaminação bacteriana foram utilizadas em protocolos de produção *in vitro* de embriões (PIVE) para verificar se houve ou não diferença nas taxas de clivagem e número de blastocistos de acordo com a contaminação. O efeito sobre a taxa de motilidade, concentração, integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, além da produção de espécies reativas de oxigênio e produção *in vitro* de embriões foram avaliados comparativamente pelo teste T entre os grupos “com contaminação” e “sem contaminação” considerando $P \leq 0,05$ como diferença significativa. Os resultados de análises de sêmen, incluindo motilidade, integridade de membranas plasmáticas e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, e os resultados de análises de produção *in vitro* de embriões, incluindo taxa de clivagem, cultivo *in vitro*, porcentagem de blastocisto inicial, blastocisto expandido, embriões grau 1, 2 e 3, embriões grau 3 e total por fertilização *in vitro*, não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Palavras-chave: membrana plasmática; integridade de membranas; produção *in vitro* de embriões; blastocisto; bactérias no sêmen.

ABSTRACT

The use of cryopreserved bovine semen for artificial inseminations is a widespread practice in the reproduction of this species today. Thus, it is extremely important to analyze the seminal quality to ensure a good fertility rate. However, the presence of bacteria in the semen used can lead to loss of integrity of sperm membranes and greater production of reactive oxygen species, which can make their fertility unfeasible. Thus, the objective of this work is to analyze the influence of bacterial contamination on cryopreserved semen of cattle under post-thaw motility, plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential, in addition to evaluating the influence of bacteria on *in vitro* embryo production. To analyze the influence of bacterial contamination, 6 (six) semen batches were used, 3 (three) with colony forming units (CFU) and 3 (three) without CFU, both collected from the same bull for greater control of variables. For the analysis of *in vitro* embryo production, semen batches with and without bacterial contamination were used in *in vitro* embryo production (IVEP) protocols to verify whether there has a difference in cleavage rates and number of blastocysts according to contamination. Finally, the motility, concentration, plasma membrane integrity, acrosomal and mitochondrial membrane potential, in addition to the production of reactive oxygen species and *in vitro* embryo production were evaluated comparatively by the T test between the "contaminated" and "non-contaminated" groups, considering $P \leq 0.05$ as a significant difference. The results of semen analyses, including motility, plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potencial and the results of *in vitro* embryo production analyses, including cleavage rate, *in vitro* culture, percentage os inicial blastocyst, expanded blastocyst, grade 1, 2 and 3 embryos, grade 3 embryos and total by *in vitro* fertilization, showed no statistical differences between treatments.

Keywords: cell membrane; membrane integrity; *in vitro* embryo production; blastocyst; bacteria in semen.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1. Criopreservação do sêmen	8
2.2. Integridade de membranas	10
2.2.1. Membrana plasmática	10
2.2.2. Potencial de membrana mitocondrial	12
2.2.3. Membrana acrossomal	13
2.3. Influência da contaminação bacteriana no sêmen.....	14
2.4. Espécies reativas de oxigênio (ROS)	15
2.5. Produção in vitro de embriões	16
3. METODOLOGIA.....	18
3.1. Criopreservação	18
3.2. Amostras de sêmen e análises realizadas	18
3.3. Avaliação da contaminação bacteriana.....	19
3.4. Produção in vitro de embriões	21
3.5. Caracterização dos microrganismos	19
3.6. Análises estatísticas	19
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um destaque do agronegócio brasileiro à nível mundial, sendo considerado o maior do mundo, em número de cabeças, no ano de 2023, com cerca de 238,6 milhões de cabeças, representando 25,26% do rebanho mundial (Embrapa, 2023; IBGE, 2023). Nesse sentido é importante analisar a qualidade de sêmen utilizada para garantir uma maior taxa de fertilidade.

Dessa forma a avaliação microbiológica do sêmen que vai ser utilizado para inseminação pode trazer informações adicionais e possibilitar melhores resultados reprodutivos. Visto que a dependência da bactéria presente no sêmen tem potencial para causar menores taxas de fertilidade.

As bactérias podem causar distúrbios reprodutivos infecciosos e consequentemente diminuir a taxa de fertilidade, sendo benéfico analisar a presença delas no sêmen que vai ser utilizado. Muitas bactérias presentes no sêmen congelado podem levar a perda de integridade de membranas espermáticas e maior produção de espécies reativas de oxigênio, o que pode prejudicar seu uso para inseminação (VALENÇA e GUERRA, 2007).

A membrana plasmática do espermatozoide é a estrutura mais susceptível à alterações durante a criopreservação, mas sua integridade é fundamental para que esses espermatozoides estejam aptos a fecundar (BORGES *et al.*, 2011). A presença de bactérias no ejaculado também pode interferir na integridade da membrana plasmática, podendo interferir na taxa de fecundação (CELEGHINI *et al.*, 2010). Esta membrana plasmática do espermatozoide recobre toda a célula e é composta por lipídeos e proteínas construídas durante a espermatogênese, sua função é determinada pela integridade de seus componentes, dessa forma, se essa membrana for lesada, pode alterar sua função (CELEGHINI *et al.*, 2010). A membrana plasmática íntegra é responsável pela preservação da homeostase celular, sendo importante para garantir a sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo feminino e preservação da sua capacidade de fertilidade (CELEGHINI *et al.*, 2017). Segundo Quintero-Moreno (2011), a membrana plasmática lesada dos espermatozoides interfere significativamente na taxa de fertilidade em comparação com espermatozoides com membranas plasmáticas intactas.

A membrana acrossomal é essencial para que ocorra a penetração dos espermatozoides na zona pelúcida, permitindo que o gameta masculino penetre e ocorra a fusão das membranas plasmáticas do ovócito e do espermatozoide, ocorrendo assim a fertilização (CELEGHINI *et*

al., 2010). Dessa forma é possível que uma membrana acrossomal lesada pela presença de bactérias no ejaculado possa interferir na taxa de fertilidade.

Embora o espermatozoide seja um organismo aeróbio, ou seja, o oxigênio é um elemento essencial para manutenção de suas funções, o metabolismo aeróbico leva a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos à célula espermática, como perda de motilidade irreversível, inibição da respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fertilizante do espermatozoide (VALENÇA e GUERRA, 2007).

Visando maximizar a quantidade de descendentes de animais considerados superiores geneticamente e acelerar o processo genético de rebanhos bovinos (VARAGO *et al.*, 2008), a biotécnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) vem sendo amplamente utilizada no mundo todo e no Brasil (VIANA e CAMARGO, 2007). Essa biotécnica permite a produção de grande quantidade de embriões, pois se baseia na coleta de ovócitos, maturação *in vitro*, fecundação *in vitro* e cultivo *in vitro*, permitindo um melhor aproveitamento de apenas uma fêmea, comparando com métodos reprodutivos convencionais (VARAGO *et al.*, 2008). As condições de cultura *in vitro* para maturação dos ovócitos são essenciais para a obtenção de resultados satisfatórios (COELHO *et al.*, 2002), dessa forma, é usado meios de culturas muito ricos, o que pode estimular a multiplicação bacteriana.

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência da contaminação bacteriana na qualidade e fertilidade do sêmen criopreservado de bovinos, por meio de avaliações da integridade de membrana plasmática, acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e motilidade espermática, além de sua interferência na produção *in vitro* de embriões (PIVE).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Criopreservação do sêmen

A criopreservação ou congelamento de sêmen é largamente utilizado na reprodução bovina. Segundo Baruselli (2023), no ano de 2022 foram comercializados 25.660.869 doses de sêmen no mercado interno, e 25.075.120 protocolos de IATF. Além disso, o percentual de animais inseminados por IATF chegou em 97,7% em 2022.

A criopreservação ou congelamento de sêmen é utilizado na reprodução bovina por ser uma biotécnica que tem por finalidade preservar e armazenar amostras de sêmen em uma temperatura de -196°C para estagnar o metabolismo espermático e assim aumentar a longevidade da célula, o que permite utilizar esse sêmen criopreservado posteriormente (SANCLER-SILVA e MONTEIRO, 2019). Essa técnica permite aumentar o potencial reprodutivo de touros de alto valor genético, sendo imprescindível em programas de inseminações artificiais, transferência e produção *in vitro* de embriões (LEITE *et al.*, 2015).

A criopreservação baseia-se na manutenção da viabilidade das células ou dos tecidos armazenadas em baixas temperaturas, induzindo a parada das reações enzimáticas, possibilitando que após o aquecimento deste tecido a atividade metabólica possa ser restaurada normalmente (MAZUL *et al.*, 1984). A taxa de resfriamento ideal deve ser rápida para evitar efeitos tóxicos da solução, mas lenta o suficiente para que as células possam desidratar e evitar a formação de gelo intracelular (MAZUL *et al.*, 1972).

O uso do sêmen congelado possui diversas vantagens como otimizar o uso de touros, levando um maior número de descendentes com alto valor genético, permite a preservação do material genético do animal por um tempo ilimitado, diminui os custos e riscos envolvidos com o transporte de animais, minimiza a propagação de doenças e também permite o uso de animais que já morreram. Porém, o uso dessa biotecnologia é limitado por levar a queda na taxa de fertilidade em razão de reações químicas indesejadas durante a criopreservação, causando alteração na motilidade e morfologia espermática e perda da integridade de membranas (SANCLER-SILVA e MONTEIRO, 2019).

Para se ter sucesso na criopreservação, é necessário o uso de crioprotetores, os quais tem função de prevenir injúrias aos espermatozoides durante o processo de congelamento e descongelamento (VIVEIROS *et al.*, 2009). O uso dos crioprotetores é essencial porque apenas o plasma seminal não é capaz de proteger adequadamente os espermatozoides contra as mudanças de temperatura (CHAVEIRO *et al.*, 2006). Os crioprotetores substituem a água existente no meio intracelular do espermatozoide, por meio do gradiente osmótico, levando a

desidratação parcial da célula, assim evita a formação de cristais de gelo no interior das células (ROSATO e IAFFALDANO, 2013). Apesar dos crioprotetores serem utilizados para proteger as células durante a diminuição de temperatura, sabe-se que eles podem causar danos osmóticos e toxicidade ao espermatozoide.

Os crioprotetores podem ser divididos em dois grupos, de acordo com sua capacidade de penetrar nas membranas celulares, sendo os permeáveis (intracelulares ou interno) e os não permeáveis (extracelulares ou externo). Os crioprotetores permeáveis são substâncias com alta solubilidade em água e de baixo peso molecular, o que permite penetrarem na membrana celular e dessa forma diminuir a temperatura de congelamento intracelular, por fazerem ligações (pontes de hidrogênio) com moléculas de água, o que evita a formação de cristais de gelo ou reduzir o tamanho desses cristais (NASCIMENTO, 2018; RODRIGUES, 2020). Já os crioprotetores não permeáveis possuem alto peso molecular, o que impede sua entrada no interior da célula, mas permite uma proteção extracelular por interagirem e estabilizar a bicamada lipoproteica da membrana celular do espermatozoide e evitar seu rompimento durante o congelamento (NASCIMENTO, 2018).

O glicerol foi o primeiro crioprotetor permeável utilizado com sucesso na maioria das espécies e trata-se de um álcool poli-hídrico, com seis sítios de ligação incluindo a molécula de água e mesmo possuindo baixa permeabilidade em comparação a outros crioprotetores, é considerado eficiente, pois torna mais lenta a desidratação celular durante a criopreservação ao se ligar à água. Porém são necessários cuidados com a dosagem utilizada, porque altas concentrações de glicerol são tóxicas às células espermáticas (GLAZAR *et al.*, 2009).

A gema de ovo é um dos agentes mais efetivos para proteção extracelular dos espermatozoides contra o choque frio e demonstrou melhora nas funções espermáticas e preservação da fertilidade após o armazenamento na forma líquida ou congelada. Quando presente nos meios diluentes, a gema de ovo permite a redução da concentração do glicerol reduzindo a possível toxidez das células. Grande parte dos diluentes utilizados na criopreservação de espermatozoides bovinos contém em torno de 20% de gema de ovo (SNOECK *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2020).

Apesar de muito benéfico, os processos de criopreservação resultam na formação contínua e excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são prejudiciais aos espermatozoides, pois induz a apoptose com consequente redução da qualidade espermática (ASMA-UI-HUSNA *et al.*, 2017; SOLEYMANI *et al.*, 2019). Dessa forma, tem sido adicionados aos crioprotetores, substâncias antioxidantes como glutatona e a melatonina, as

quais tem como intuito minimizar os efeitos deletérios causados pelas ROS aos espermatozoides por meio do retardamento da velocidade de oxidação por meio da manutenção da produção de ROS em níveis fisiológicos, resultando em melhor qualidade espermática, como consequente aumento das taxas de fertilização *in vitro* (SILVA *et al.*, 2020).

Vários compostos são adicionados aos meios diluidores de sêmen buscando conferir maior crioresistência aos espermatozoides durante o ciclo de congelamento/descongelamento. Porém, apesar das inúmeras pesquisas na área e mesmo sendo a espécie bovina a mais bem sucedida na criopreservação do sêmen, cerca de 50% das células ainda se tornam inviáveis após o processo (LEITE *et al.*, 2015). Esse baixo índice é resultado das diversas alterações bioquímicas e estruturais da célula espermática (acrossomo, núcleo, mitocôndrias, axonema, membrana plasmática) e 50% dos espermatozoides bovinos na média se mantêm viáveis, sendo variável por indivíduo, alguns touros mantêm uma viabilidade maior das células espermáticas após a criopreservação e outros perdem mais de 50% dos espermatozoides durante a criopreservação (CRESPILHO *et al.*, 2007; BOSCARATO e MARTINS, 2014; SANTOS *et al.*, 2018).

2.2. Integridade de membranas

2.2.1. Membrana plasmática

A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide e é o componente mais externo. Embora seja contínua sobre a superfície dos espermatozoides e com sua natureza diferindo regionalmente (FLESCH e GADELLA, 2000; KHOSRO BEYGI e ZARGHAMI, 2007; BORGES *et al.*, 2011). Ela é composta por uma bicamada fina de lipídios que separa e protege a célula do ambiente extracelular e controla o que entra e sai da célula, tornando, dessa maneira, a integridade e a permeabilidade da membrana plasmática uma necessidade primária de sobrevivência celular (CABRITA *et al.*, 2010; RODRIGUES, 2020). Os principais lipídeos são os fosfolipídeos, compostos por uma alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, que garantem fluidez da membrana, os esteróides, sendo o principal o colesterol, e os glicolipídeos (PARKS e LYNCH, 1992; FLESCH e GADELLA, 2000; RAPHAEL, 2007).

A membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados necessários para manter a fluidez da membrana durante a fusão no momento da fertilização. Devido a isso, a membrana espermática torna-se vulnerável aos danos oxidativos decorrentes da excessiva produção de ROS (espécies reativas ao oxigênio) no sêmen, causando o estresse oxidativo. A diminuição da qualidade seminal de touros à campo pode ser causado em decorrência do

aumento na produção de ROS devido ao estresse térmico, prejudicando a motilidade, integridade da membrana espermática, comprometendo a capacitação, reação acrossômica, aumento na permeabilidade da membrana espermática, causando anomalias morfológicas e prejudicando a fertilidade (CARVALHO *et al.*, 2002; GABALDI e WOLF, 2002; NICHI, 2003; ROMITTO, 2003; MARINHO *et al.*, 2016).

Proteínas se encontram fixadas na superfície da membrana ou em seu interior, fazendo parte da estrutura (AMANN e GRAHAM, 1993; LEHNINGER, 2000; WATTIMENA *et al.*, 2009). As proteínas interligadas com os lipídios são classificadas como integrais ou periféricas. As proteínas integrais são liberadas da membrana apenas por solventes ou detergentes, sendo essenciais para sua estrutura (AMANN e GRAHAM, 1993; AIDAR, 2013). As proteínas periféricas, por outro lado, são solúveis em diluidores seminais e água, sendo facilmente removidas. As proteínas integrais agem como poros ou canais através da membrana, como receptores para outras moléculas, ou são encontradas entre as duas bicamadas da membrana (AMANN e PICKETT, 1987; BORGES *et al.*, 2011).

Os fosfolipídios parecem ser a fonte principal de substrato para respiração endógena dos espermatozoides. Os tipos de fosfolipídios presentes nos espermatozoides variam consideravelmente de uma espécie para outra, sendo que plasmalogencolina é o principal fosfoglicerídio dos espermatozoides dos ruminantes domésticos. Esses fosfoglicerídios são hidrolisados e há liberação de ácidos graxos, que são oxidados rapidamente, promovendo, desta maneira, energia celular (MILLS e SCOTT, 1969; AITKEN, 1995; BORGES *et al.*, 2011).

A principal função da membrana plasmática no espermatozoide é manter o equilíbrio osmótico celular, atuando como uma barreira entre os meios intra e extracelulares. Danos nesta estrutura podem levar a perda da homeostase com morte da célula (AMANN e PICKETT, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Assim, a integridade da membrana plasmática exerce papel fundamental para a sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAM, 1992).

A membrana plasmática é a parte da estrutura do espermatozoide mais susceptível a modificações durante o processo de criopreservação, e sua integridade é fundamental para que os espermatozoides estejam viáveis no momento da fecundação (BORGES *et al.*, 2011). A integridade da membrana pode ser avaliada utilizando corantes como eosina/nigrosina ou eosina isolada e observação simples sob microscópio de luz; ou utilizando kits com marcadores específicos (Sybr-14/iodeto de propídio), permitindo uma observação simultânea de espermatozoides vivos e mortos (FAUVEL *et al.*, 2010; RODRIGUES, 2020). O iodeto de propídeo atravessa a membrana plasmática lesada, ligando-se ao DNA da célula (ZUCCARI *et*

al., 2009), dessa forma, um espermatozoide com a membrana plasmática lesada vai ficar corado, enquanto um espermatozoide com membrana plasmática íntegra não vai corar.

2.2.2. Potencial de membrana mitocondrial

As mitocôndrias espermáticas estão dispostas de maneira helicoidal dentro da peça intermediária e o ATP produzido serve como suplemento energético para os batimentos flagelares. Portanto, é indispensável que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (COSSON, 1996).

A mitocôndria espermática é uma das organelas mais importantes do espermatozoide, pois é através da adequada funcionalidade desta estrutura que advêm a principal fonte energética para a movimentação do flagelo, estrutura responsável pela chegada do espermatozoide ao sítio de fertilização do ovócito por meio da produção de ATP (DE FREITAS, 2017; BARTH e OKO, 1989; HAFEZ, 2004; REIS *et al.*, 2016).

A mitocôndria é a principal fonte de energia para a motilidade e a homeostase espermática. Mas durante a fosforilação oxidativa são produzidos metabólitos, denominados espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais desempenham papel fundamental nos processos fisiológicos. No entanto, disfunções mitocondriais podem causar desequilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos antioxidantes, provocando o estresse oxidativo, letal para a célula espermática. Assim, como essa organela está envolvida tanto nos processos fisiológicos quanto nos patológicos dos espermatozoides, fica clara a importância de avaliar sua funcionalidade (ANGRIMANI *et al.*, 2015).

O potencial de membrana mitocondrial está relacionado à capacidade da mitocôndria em bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, por meio da energia livre gerada pelo transporte de elétrons, produzindo um gradiente eletroquímico (CHEN, 1988) (ANGRIMANI *et al.*, 2015).

Durante os processos da respiração celular desempenhados pela mitocôndria espermática, o cálcio (Ca^{2+}) exerce papel-chave como regulador central dos eventos ocorridos na fosforilação oxidativa (MCCORMACK *et al.*, 1990). O Ca^{2+} também está envolvido em processos de produção de ATP, atuando na proteína ATPsintase, responsável por formar moléculas de ATP (TERRITO *et al.*, 2001). Ademais, diversos estudos demonstram que o Ca^{2+} pode estar diretamente envolvido em eventos de apoptose celular (BERRIDGE *et al.*, 1998; GUNTER *et al.*, 2004). Portanto, a dosagem dos níveis de cálcio intramitocondrial pode

contribuir não só para a avaliação do funcionamento mitocondrial, mas também como indicativo de apoptose celular. (ANGRIMANI *et al.*, 2015).

A avaliação da atividade e do potencial mitocondrial contribui para melhor compreensão do funcionamento fisiológico da mitocôndria espermática, assim como a dosagem de Ca^{2+} e a mensuração dos níveis de ATP e ADP.

O funcionamento mitocondrial de maneira ordenada e aprimorada é crucial para os espermatozoides de mamíferos, sendo altamente relacionado com altas taxas de funcionalidade e fertilidade da célula espermática. Dessa forma, a avaliação criteriosa da atividade, do potencial e do metabolismo mitocondrial surge como ferramenta para o sucesso na seleção de animais de interesse reprodutivo. Para tal, a escolha da técnica deve ocorrer considerando-se a localidade, os equipamentos disponíveis e o objetivo determinado, para, assim, otimizar a mão de obra e os esforços despendidos.

Para avaliação do potencial mitocondrial, o JC-1 identifica populações de mitocôndrias com diferentes potenciais de membrana através de códigos de cor. Sua cor é alterada do verde para o laranja ou vermelho, com o aumento do potencial de membrana (REERS *et al.*, 1991; COSSARIZZA *et al.*, 1993). A fluorescência verde do JC-1 ocorre devido à formação de monômeros, apresentando excitação e emissão máximas de 510 e 527 nm, respectivamente, enquanto a fluorescência vermelha do JC-1 é devido à formação de J-agregados, com excitação e emissão máximas de 485 e 585 nm, respectivamente (HAUGLAND, 2001).

2.2.3. Membrana acrossomal

O acrossomo é uma vesícula grande, originária do complexo de Golgi na espermátide, que contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração da matriz extracelular na zona pelúcida do ovócito para completar a fertilização (EDDY e O'BRIEN, 1994; FLESCHE e GADELLA, 2000) e está localizado na extremidade anterior da cabeça entre o lado interno da membrana plasmática e o núcleo (CELEGHINI, 2005).

Essa estrutura membranosa se encontra disposta sobre o núcleo como uma capa na porção anterior da cabeça da célula espermática, sendo subdividida em membrana acrossomal interna e membrana acrossomal externa. A membrana acrossomal interna fica em contato com a membrana do núcleo, enquanto a membrana acrossomal externa fica em contato com a parte interna da membrana plasmática (CELEGHINI, 2005).

O acrossomo consiste de dois segmentos, a capa acrossomal, também chamado de acrossomo anterior, e o segmento equatorial, também chamado de acrossomo posterior.

Durante a reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática se fundem e formam vesículas liberando o conteúdo acrossomal por de exocitose mediada por cálcio. Enquanto a membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persistem até a fusão do espermatozoide com o ovócito (ÕURA e TOSHIMORI, 1990; EDDY e O'BRIEN, 1994; FLESCHE e GADELLA, 2000; CELEGHINI, 2005).

A integridade da membrana acrossomal e a manutenção de suas enzimas são essenciais para que ocorra a reação acrossômica (FLESCHE e GADELLA, 2000) caracterizada pela liberação das enzimas acrossomais e a fusão da membrana acrossomal necessária para a fusão espermatozoide-ovócito, embora as membranas espermáticas estejam fixadas aos ovócitos na zona livre e na ocorrência de fertilização (HAFEZ, 2004; CELEGHINI *et al.*, 2010).

Para análise de integridade de membrana acrossomal, utiliza-se as lectinas conjugadas aos fluoróforos (marcadores de lisossomos) ou a anticorpos anti-proteína intra-acrossomal (anti-CD46). As lectinas conjugadas se ligam às cadeias de carboidratos glicoprotéicos presentes no acrossoma (SILVA e GADELLA, 2006). As lectinas mais utilizadas são *Psium sativum* (PSA), *Arachis hypogea* (PNA) e *Concanavalia ensiformis* (ConA). Dentre os fluoróforos conjugado às lectinas está o isotiocionado de fluoresceína (FITC) (SILVA e GADELLA, 2006; BRANDÃO, 2008).

2.3. Influência da contaminação bacteriana no sêmen

Microrganismos podem afetar a função reprodutiva masculina diretamente através da redução da motilidade, diminuição da reação acrossomal e aumentar as patologias dos espermatozoides, mas também podem afetar indiretamente através das espécies reativas de oxigênio (ROS) (ENWURU *et al.*, 2016).

Segundo Al-Zubaidy e Zaid (2009), o sêmen contaminado afeta negativamente a fertilidade e atua como disseminador de doença. Existe uma correlação entre a carga bacteriana e a qualidade do sêmen, uma vez que um aumento no número de bactérias leva a um declínio da motilidade e viabilidade dos espermatozoides (REDA *et al.*, 2020).

A presença bacteriana no sêmen resulta na competição de nutrientes e na subprodução metabólica que prejudicam os espermatozoides (LUTHER *et al.*, 2023). Além disso, algumas bactérias podem interferir negativamente nos espermatozoides pela liberação de lipopolissacarídeos contidos no interior de suas paredes, levando também a infecção bacteriana na genitália feminina ao utilizar sêmen infectado para inseminação (MORRELL e WALLGREN, 2014).

Segundo Azawi e Ismaeel (2011), o sêmen apresenta boa qualidade quando contém baixa contaminação bacteriana. Mas em contaminações maiores a morfologia espermática é afetada por causa das células inflamatórias, além de afetar diretamente a fertilização dos óvulos (FRACZEK e KURPISK, 2015), pela ligação das bactérias com os espermatozoides, diminuindo sua motilidade e induzindo a reação acrossomal antes do esperado (AZAWI e ISMAEEL, 2011).

2.4. Espécies reativas de oxigênio (ROS)

As Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, os quais são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (AGARWAL *et al.*, 2005).

O elemento oxigênio (O^2) pode ser considerado um radical livre, já que apresenta desemparelhamento de elétrons na sua última camada eletrônica, conferindo a ele uma alta reatividade (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1999). As ROS incluem todos os radicais derivados do oxigênio e encontrados em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas, o O^2 sofre uma redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando em formação de água. Durante esta reação são elaborados reativos intermediários como os radicais superóxido (O^{2-}), hidroperoxila (HO^2) e hidroxila (OH). E também, o não radical, peróxido de hidrogênio (NORDBERG e ARNER, 2001).

As espécies reativas ao oxigênio também estão envolvidas em várias funções espermáticas essenciais como a função cinética, que permite a movimentação espermática pelo trato reprodutivo da fêmea. Promove a capacitação, função fusogênica, hiperativação, reação acrossômica, ligação espermática a zona pelúcida, além de promover a estabilização da cápsula mitocondrial na peça intermediária dos espermatozoides bovinos (GONÇALVES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2020).

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de ROS. Para reverter o quadro de estresse oxidativo, é preciso reduzir a produção de ROS ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis. Na reprodução, o estresse oxidativo pode provocar efeitos deletérios tanto ao sistema reprodutor feminino quanto ao masculino. No caso do sistema reprodutor masculino, pode causar distúrbios durante as várias etapas da espermatogênese (ANDRADE *et al.*, 2010).

Estudos têm demonstrado que o espermatozoide e os leucócitos presentes no sêmen são capazes de gerar ROS e que os danos causados na célula espermática advêm de uma alta quantidade de ácidos graxos polinsaturados presentes na sua membrana plasmática. A elevada percentagem destes elementos, torna-os vulneráveis à atuação de agentes oxidantes, como os radicais livres, e desse modo, sensíveis à peroxidação lipídica, causando perda de função e morte espermática (BILODEU *et al.*, 2002; VALENÇA e GUERRA, 2007).

O espermatozoide é um organismo aeróbio, sendo o oxigênio um elemento essencial para manutenção de suas funções, como movimentação pelo trato reprodutivo feminino, capacitação, reação acrossomal e ligação espermática a zona pelúcida. Porém, a partir do metabolismo aeróbico pode ter estresse oxidativo na célula, que é quando metabólitos reativos de oxigênio são produzidos mais rapidamente do que podem ser removidos pela ação dos antioxidantes. Os efeitos desta reação incluem perda de motilidade de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fertilizante do espermatozoide (VALENÇA e GUERRA, 2007; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1994).

2.5. Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica importante para melhorar o potencial genético de fêmeas bovinas, que vem se estabelecendo no mundo todo, e principalmente no Brasil (PEIXER *et al.*, 2018). Essa biotécnica reprodutiva se tornou a principal ferramenta utilizada pelos criadores de bovinos (VIANA e CAMARGO, 2007) por maximizar a quantidade de descendentes de animais considerados superiores geneticamente e acelerar o melhoramento genético de rebanhos, visando o aproveitamento de animais jovens e diminuindo o intervalo de gerações (VARAGO *et al.*, 2008). Além da obtenção de embriões viáveis de fêmeas saudáveis de alto valor zootécnico e genético de fêmeas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelos métodos convencionais. Além disso, fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou no período pós-parto podem ser usadas como doadoras de ovócitos na PIVE (BUENO e BELTRAN, 2008).

O uso dessa técnica é abundante pois há um maior aproveitamento reprodutivo de fêmeas de alto valor genético, pois a fêmea em condições fisiológicas consegue produzir até 10 bezerros durante sua vida produtiva (LOIOLA, 2014). Já com o uso da aspiração de ovócitos, são recuperados em média 30 ovócitos viáveis, chegando a 2.880 ovócitos viáveis por ano/animal, levando em conta as perdas na PIVE, 32,8% chegarão a embriões e 33% desses

embriões chegam à gestação, totalizando 944 embriões, e 311 gestações, possibilitando uma maior disseminação e exploração de uma genética com mérito (LOIOLA, 2014; WRENZYCKI, 2016).

A PIVE permite o contato entre o espermatozoide e o ovócito fora do trato reprodutivo da fêmea, formando um novo indivíduo (GONÇALVES *et al.*, 2008). Sendo as etapas envolvidas nesse processo a coleta dos ovócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões fora do útero da fêmea (VARAGO *et al.*, 2008).

A técnica possui dificuldades, como seu custo elevado, pois necessita de um laboratório estruturado, a inconsistência dos resultados referentes à taxa de mórulas e blastocistos e o tempo necessário para executar a técnica (MIRANDA *et al.*, 2007).

Apesar da PIVE ser uma biotécnica promissora para produção de grande quantidade de embriões, é preciso levar em consideração que os embriões produzidos ainda são de qualidade inferior aos obtidos através da produção *in vivo* de embriões (PEIXER *et al.*, 2018).

3. METODOLOGIA

3.1. Criopreservação

Nesse estudo foram utilizadas seis partidas de sêmen, sendo três partidas de sêmen com contaminação bacteriana e três partidas de sêmen sem contaminação bacteriana, ambas coletadas do mesmo touro.

O material foi coletado e congelado em central de colheita e processamento de sêmen bovino (CCPS) de acordo com as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) seguindo normas de boas práticas de fabricação e padrões mínimos para comercialização.

As partidas foram analisadas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LBSA - FMVZ - USP).

O sêmen foi descongelado em banho-maria, na temperatura de 37°C por 30 segundos, depois analisada a motilidade, concentração, integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e produção *in vitro*, como descrito a seguir.

3.2. Amostras de sêmen e análises realizadas

A motilidade espermática foi avaliada por meio da análise computadorizada (CASA), a concentração espermática pela câmara de Neubauer, integridade de membrana plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial por meio de sondas fluorescentes Hoescht 33342 (H342), Iodeto de propídeo (PI), FITC-PSA e JC-1.

A análise da integridade de membrana plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial, pela associação de sondas PI, H342, FITC-PSA e JC-1, foi realizada com 150 µL de sêmen diluído em TALP (25×10^6 spz/mL) em um microtubo, adicionando 2 µL de Hoechst 33342 (40µg/mL em DPBS) e incubado por 10 minutos a 37°C. Após os 10 minutos, foi adicionado 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS), 2 µL de JC-1 (153 µM em DMSO) e 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS) e incubado por mais 8 minutos a 37°C.

Após o preparo de cada protocolo, uma preparação úmida foi realizada entre lâmina e lamínula e 200 espermatozoides foram avaliados imediatamente em aumento de 1.000 x em microscopia de epifluorescência (marca Zeiss, mod. Axioplan-2, Germany), localizado no Laboratório de Biotecnologias do Sêmen e Andrologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo) e classificados quanto ao padrão de coloração.

A motilidade foi dada por meio da avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA), e conferido por meio da estimativa visual da percentagem de células em movimento, o vigor foi referente à velocidade progressiva uniforme das células em movimento classificado em pontuação de 1 a 5, sendo o escore 1 o mais lento e aumentando gradativamente até o escore 5 correspondendo ao mais rápido movimento progressivo uniforme.

3.3. Avaliação das contaminação bacteriana

Após a criopreservação, partidas de sêmen foram descongeladas e colocadas em placas de Ágar Sangue para avaliação da contaminação bacteriana. Foram selecionados para este trabalho partidas do mesmo touro em períodos com vesiculite e sem a doença, em que obedeciam o padrão de qualidade com os valores máximos de defeitos morfológicos e mínimos de motilidade e concentração, porém três que tinham crescimento de colônias e três que não tinham.

3.4. Caracterização dos microrganismos

Para caracterização dos microrganismos, foram agrupadas 2 palhetas de sêmen de cada partida para eliminar o fator de variabilidade da palheta. As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria, na temperatura de 37°C por 30 segundos. Após o descongelamento, os conteúdos das palhetas de mesma partida foram despejados em microtubos estéreis de 2mL homogeneizados. Ao todo foram analisadas 2 palhetas de cada uma das 6 partidas, sendo 3 partidas contaminadas e 3 sem contaminação, totalizando 12 palhetas.

Após a homogeneização das amostras, com a alça de inoculação estéril foi coletada uma pequena amostra de sêmen, de aproximadamente 10 microlitros, e foi realizado o repique em placas de petri de Ágar MacConkey, um meio seletivo para crescimento de bactérias gram-negativas, e Ágar Sangue, um meio que permite o cultivo de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Além do repique em placas com ágar, com o uso de uma micropipeta volumétrica e ponteira estéril, foram coletados 100 microlitros de sêmen de cada uma das 6 amostras e adicionados em 4 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion), meio líquido enriquecido não seletivo de pré-enriquecimento, isolamento e cultivo de bactérias. Por fim, as placas e os caldos foram incubados em estufa para cultura bacteriológica à 37°C por, pelo menos, 24h (Figura 2).

Após 24 horas de incubação das placas de Ágar, caso não fosse identificado crescimento bacteriano, as mesmas seriam mantidas por mais 24 horas em estufa para confirmar

o resultado negativo. Se após 48 horas de incubação não houvesse crescimento bacteriano, tanto nas placas quanto no caldo BHI, que é um meio líquido límpido quando estéril e cuja turbidez indica crescimento bacteriano, seria confirmada a ausência de contaminação da amostra. Portanto, quando não houve crescimento nas placas, mas foi identificada turbidez do caldo, foi feito repique deste, utilizando alça de inculação estéril, em Ágar MacConkey e Ágar Sangue para cultivo dos microrganismos.

A partir da identificação de crescimento bacteriano nas placas de ágar, as colônias foram coradas pela técnica de Gram e analisadas por microscopia óptica para identificação morfológica e classificação quanto à coloração de Gram. Esse procedimento também permitia verificar a presença de uma ou mais colônias na mesma placa. Assim, em placas em que foram identificadas mais de uma colônia, foi realizado o repique em novas placas a fim de obter colônias puras. Após a obtenção de colônias puras nas placas de ágar, estas foram enviadas ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO) da FMVZ-UFU (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFU) para identificação das espécies. O processo de identificação foi realizado por meio do VITEK 2 Compact, aparelho com sistema automatizado que permite identificação microbiológica.

Foi realizado também o teste de sensibilidade antimicrobiana das bactérias pelo método de difusão em placa de Ágar Mueller-Hinton (MH), com os antibióticos Tilmicosina, Enrofloxacino, Benzilpenicilina Potássica e Sulfato de Gentamicina. Assim, cada colônia pura foi diluída em tubos com solução salina estéril para obtenção de uma amostra turva, conforme escala de turvação McFarland. Após as diluições, as amostras foram semeadas com swab estéril em placas de Ágar MH em quatro direções, garantindo a distribuição homogênea do microrganismo sobre toda a superfície, os discos de antibióticos foram, então, aplicados sobre a placa. Foi feita a incubação das placas em estufa a 37°C por 24 horas e, após este período, os halos formados ao redor dos discos, os quais indicam ausência de crescimento bacteriano, foram medidos para avaliação da sensibilidade (Figura 3).

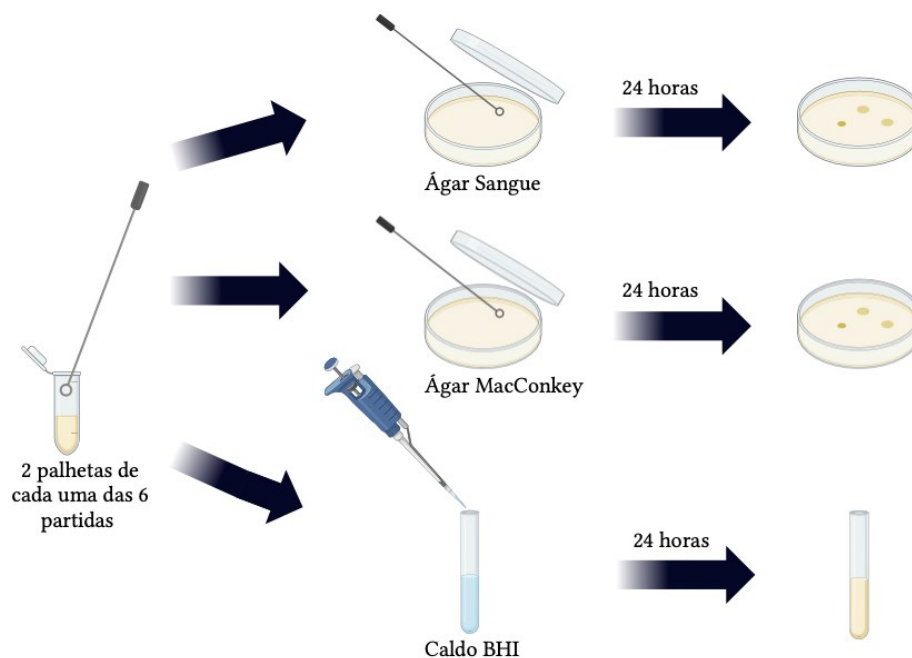


Figura 2: Caracterização dos microrganismos com inoculação de cada uma das 6 partidas de semen em ágar sangue, ágar MacConkey e caldo BHI, incubado por 24 horas e analisado o crescimento bacteriano. Fonte: próprio autor.

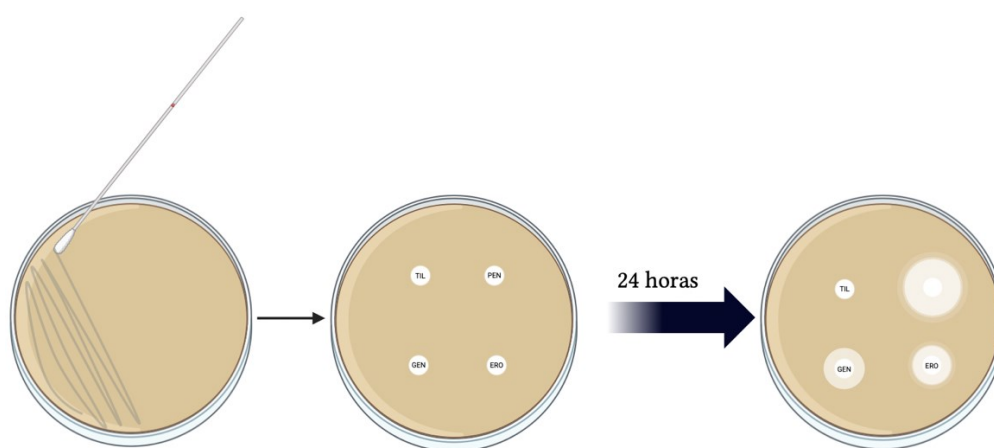


Figura 3: Teste de sensibilidade ao antibiograma, o qual a bactéria foi inoculada em placa de ágar Mueller-Hinton e dispostos discos de antibióticos, incubado por 24 horas e analisado se houve crescimento bacteriano ao redor dos discos. Fonte: próprio autor.

3.5. Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões foi realizada em Mogi Mirim, SP, onde foi analisada cinco réplicas, sendo uma por dia. Em cada réplica incluiu-se seis partidas de sêmen, sendo três com contaminação bacteriana e três sem contaminação bacteriana. Foi realizada a produção *in vitro* de embriões usando 120 a 300 ovócitos aspirados em cada partida e analisada a clivagem,

cultivo *in vitro*, blastocisto inicial, blastocisto expandido, embriões grau 1, 2 e 3, embriões grau 3 e total por cultivo *in vitro* (Figura 1).

Para o cálculo da porcentagem de clivagem, o número de clivagem foi dividido pelo número de ovócitos recuperados e multiplicado por 100, para o cultivo *in vitro*, o número de células em que foi realizado o cultivo *in vitro* foi dividido pelo número ovócitos recuperados e multiplicado por 100. Para a porcentagem de blastocisto e blastocisto expandido, o número de blastocistos e blastocistos expandidos, respectivamente, foram divididos pelo número de embriões no D7 em graus 1 e 2, multiplicados por 100. Para o cálculo do total por cultivo *in vitro*, o número de cultivo *in vitro* foi dividido pelo número total de embriões grau 1, 2 e 3 e multiplicado por 100.

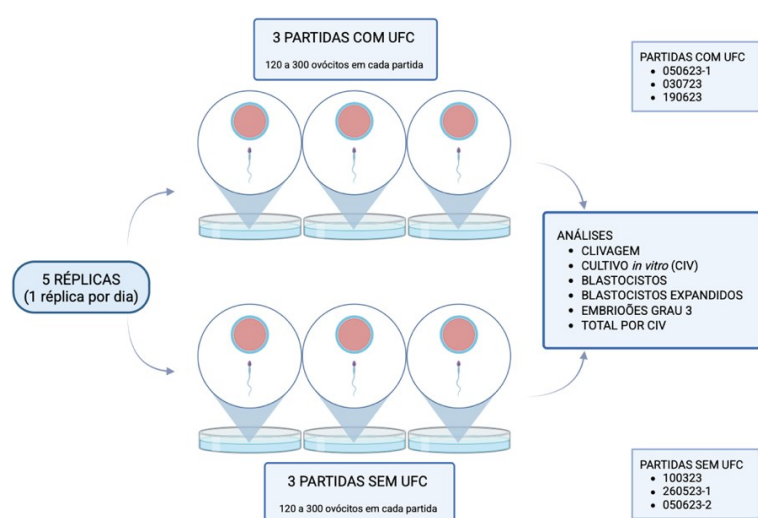


Figura 1: Esquema de produção *in vitro* de embriões, em que foi utilizada 5 réplicas, sendo cada uma com as 6 partidas de sêmen, 3 com contaminação bacteriana e 3 sem contaminação bacteriana e realizada as analyses de clivagem, cultivo *in vitro*, blastocistos, blastocistos expandidos, embriões grau 3 e total por cultivo *in vitro*. Fonte: próprio autor.

3.6. Análises estatísticas

Os dados de análises espermáticas de motilidade, integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial e produção *in vitro* de embriões foram avaliados quanto a homogeneidade das variâncias pelo teste de Shapiro Wilk. Caso necessário, foram retirados outliers ou transformados. Em seguida, os grupos “com contaminação” e “sem contaminação” foram comparados pelo teste T e análise de variância. A probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada significativa.

As variáveis de PIVE que não obedeceram a normalidade foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis.

4. RESULTADOS

Em relação ao crescimento bacteriano, 24 horas depois da incubação em estufa a 37°C, nas 3 amostras com contaminação bacteriana, todas apresentaram crescimento bacteriano tanto em Ágar MacConkey quanto em Ágar Sangue, sendo que em duas delas apresentaram crescimento de mais de uma colônia.

Na amostra com contaminação foi identificada a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, um bacilo gram-negativo, e a bactéria *Streptococcus dysgalactiae* spp. *equisidimilis* apenas em um coco gram-positivo. Em uma das amostras sem contaminação foi identificada a presença da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*.

Nas outras 3 amostras em que não houve crescimento bacteriano nas primeiras 24 horas, ficaram mais 24 horas na estufa em aproximadamente 37°C para confirmação se haveria ou não o crescimento bacteriano, em apenas uma houve crescimento bacteriano. Os caldos BHI também ficaram 48 horas em estufa e um dos caldos das partidas não contaminadas turvou, ou seja, apresentou crescimento bacteriano, então foi feito o repique dessa bactéria e foi identificada a bactéria *Streptococcus maltophilia*, tanto em Ágar Sangue quanto em Ágar MacConkey na palheta 260523-1, um bacilo gram-negativo, no antibiograma apresentou resistência para Tilmicosina, Penicilina e Gentamicina, e sensibilidade para Enrofloxacino (Tabela 3).

Tabela 1. Identificação das bactérias presentes nas partidas de sêmen e sensibilidade ao antibiograma.

Palheta	Bactéria	Crescimento em Ágar	Tilmicosina	Penicilina	Gentamicina	Enrofloxacino
030723	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AS e MC	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente
050623-1 (CT)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AS e MC	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente
050623-1 (CB)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> spp. <i>equisidimilis</i>	AS	Resistente	Sensível	Sensível	Sensível
190323-1 (CT)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AS e MC	Resistente	Resistente	Sensível	Sensível

190323-1 (CB)	<i>Streptococcus dysgalactiae spp. equisidimilis</i>	AS	Resistente	Sensível	Sensível	Resistente
260523-1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AS e MC	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível

Legenda: AS – Ágar Sangue; MC – Ágar MacConkey; CT – colônia transparente; CB – colônia branca.

A motilidade, concentração, porcentagem de células com todas as membranas íntegras, porcentagem de células apenas com a membrana plasmática íntegra, porcentagem de células com a membrana acrossomal íntegra e porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial não houveram diferença estatística significativa entre os grupos com contaminação e sem contaminação (Tabela 1).

Tabela 2. Média das características espermáticas de amostras de sêmen criopreservado de bovino com e sem contaminação bacteriana.

	Com contaminação	Sem contaminação
Motilidade (%)	51,93 ($\pm 3,23$)	54,63 ($\pm 5,35$)
Concentração (sptz/mL)	9,76 x 10 ⁹ ($\pm 0,91$)	10,80 x 10 ⁹ ($\pm 1,05$)
PIAIA (%)	45,00 ($\pm 3,90$)	38,33 ($\pm 3,19$)
MPI (%)	45,00 ($\pm 3,90$)	38,33 ($\pm 3,19$)
AI (%)	77,83 ($\pm 3,63$)	76,33 ($\pm 1,20$)
APMM (%)	45,33 ($\pm 3,63$)	38,50 ($\pm 3,23$)

Legenda: PIAIA – porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e alto potencial mitocondrial; MPI – porcentagem de células com a membrana plasmática íntegra; AI – porcentagem de células com a membrana acrossomal íntegra; APMM – porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial. Não houve diferença estatística significativa entre as variáveis.

Em relação a produção *in vitro* de embriões, não houve diferença estatística sobre as palhetas contaminadas e não contaminadas entre as variáveis analisadas: porcentagem de clivagem, porcentagem de cultivo *in vitro* (CIV), porcentagem de blastocisto, porcentagem de blastocistos expandidos, número de embriões grau 1, 2 e 3, porcentagem de embriões grau 3 e porcentagem total por CIV (Tabela 2).

Tabela 3. Média dos resultados da produção *in vitro* de embriões (clivagem, CIV, blastocisto, blastocisto expandido, embriões grau 1, 2 e 3, embriões grau 3 e total por CIV).

	Controle	Com contaminação	Sem contaminação
Clivagem (%)	52	55,66 ($\pm$ 3,51)	55,66 ($\pm$ 6,08)
CIV (%)	30,99	31,92 ($\pm$ 0,99)	29,76 ($\pm$ 2,97)
Blastocisto (%)	9	17 ($\pm$ 2,00)	16,33 ($\pm$ 4,04)
Blastocisto expandido (%)	80	66,33 ($\pm$ 10,01)	66,33 ($\pm$ 6,65)
Embriões grau 1, 2 e 3 (n°)	221	643	759
Embriões grau 3 (%)	3,31	3,7 ($\pm$ 0,72)	4,53 ($\pm$ 1,68)
Total por CIV (%)	34,30	35,71 ($\pm$ 1,67)	32,29 ($\pm$ 7,90)

Legenda: CIV – cultivo *in vitro*. Não houve diferença estatística significativa entre as variáveis.

5. DISCUSSÃO

A integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial não foi diferente na análise do sêmen contaminado e não contaminado. Assim como a motilidade e a concentração, não houve diferença significativa entre o sêmen contaminado e não contaminado. Na análise da produção *in vitro* de embriões não houve diferença entre as partidas contaminadas e não contaminadas.

Segundo Jubb, Kennedy e Palmer (1979), há a presença de bactérias como *Bacillus* sp., *Staphylococcus* spp., *Corvnebacterium* sp., *Streptococcus* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* na microbiota do semen e prepúcio de bovinos e búfalos aparentemente saudáveis. Este trabalho mostrou a presença de *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus dysgalactiae* spp. *equisidimilis* nas três partidas contaminadas e presença de *Stenotrophomonas maltophilia* em apenas uma partida não contaminada.

Monteiro (2021) identificou que a contaminação bacteriana do sêmen está correlacionada com alterações na qualidade dos espermatozoides, existindo uma correlação entre a carga bacteriana e a qualidade do sêmen, uma vez que o aumento no número de bactérias leva a um declínio da motilidade e viabilidade dos espermatozoides, porém neste trabalho não foi identificada diferença significativa entre as partidas contaminadas e não contaminadas. Isso pode ter ocorrido pelas diferenças de bactérias analisadas em cada estudo, sendo identificadas as bactérias *Staphylococcus* e *Pseudomonas aeruginosa* por Monteiro, e neste estudo não foi identificado *Staphylococcus*. Segundo Bennermann (2018), esta bactéria pode levar à redução do número de espermatozoides, supressão da motilidade, alterações na morfologia e capacidade de fertilização, o que não foi observado neste estudo. Segundo Genovez et al. (1999), a presença de *Staphylococcus* spp. em sêmen industrializado de touros está fortemente associada à manipulação pelo homem.

Até o ano de 2005, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) preconizava que a contagem bacteriana do sêmen industrializado não deveria ultrapassar 5×10^3 bactérias por mL de sêmen. Entretanto, atualmente não há mais definida a quantidade limite de microrganismos por mL de semen aceitável segundo a OIE para uso em inseminação artificial. Porém, Segundo Carvalho et al. (2012) a contaminação bacteriana presente no sêmen rotineiramente utilizado para inseminação artificial tem se mostrado limitante para o sucesso da técnica de fertilização *in vitro*, particularmente no momento do cultivo. Além de Carvalho et al. (2012), Meyer et al. (1980) mostraram efeito nocivo de *Pseudomonas aeruginosa* sobre o desenvolvimento *in vitro* do embrião de rato, o que não foi observado neste trabalho, em que não houve diferença nas

taxas de produção *in vitro* de embriões entre as partidas contaminadas e não contaminadas, mesmo com a contaminação de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta diferença nos resultados com o trabalho de Carvalho *et al.* (2012) pode ser porque foi utilizado cultivos de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Acinetobacter* spp., já neste trabalho não houve a presença de *Staphylococcus* spp. e *Acinetobacter* spp.

6. CONCLUSÃO

Não houve diferença significativa entre as palhetas contaminadas e não contaminadas analisadas sobre as análises espermáticas e sobre os resultados da produção *in vitro* de embriões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; GRUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p.28, 2005.

AIDAR, N. B. Criopreservação de sêmen equino. Mamografia (Trabalho de conclusão de curso) - **Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília**, Brasília, DF, 2013.

AITKEN R. Y. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZAM, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, abr./jun. 2010. Disponível em: <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n2/p79-86.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2024.

ANGRIMANI, D. S. R.; LOSANO, J. D. A.; RUI, B. R.; BICUDO, L. C.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.39, n.2, p.277-283, abr./jun. 2015. Disponível em: [http://cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n2/pag277-283\(RB581\).pdf](http://cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n2/pag277-283(RB581).pdf). Acesso em: 11 fev. 2024.

AMANN R. .P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**. Volume 7, Issue 3, 1987, pages 145-173. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080687800254>. Acesso em: 11 fev. 2024.

ASMA-UI-HUSNA, AWAN, M. A.; MEHMOOD, A.; SULTANA, T.; SHAHZAD, Q.; ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A.; NAQVI, S. . S.; AKHTER, S. Sperm sexing in Nili-Ravi buffalo though modified swim up: Validation using STBR green real-time PCR. **Animal reproduction science**, v.182, p.69-76, 2017.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. Normal bovine spermatogenesis and sperm maturation. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State University Press, p.19-88, 1989.

BARUSELLI, P.S. Com desaceleração de 5% em 2022, mercado da IATF registra primeiro recuo em 20 anos. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP**, 7a ed., 2023. Acesso em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>

BENNERMANN, P. E, et al. Contaminantes bacterianos y perfil de susceptibilidad del sêmen porcino em centros de recogida em Brasil. **Revista MVZ Córdoba**, v.23, n.2, p.6637-6648, 2018.

BILODEU, J. F.; BLANCHETE, S.; CORMIER, N.; SIRAD, M. A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, p.1105-1122, 2002.

BORGES, J. C. et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.3, p.303-314, jul./set. 2011.

BRANDÃO, A. C. Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas mitocondrial de espermatozoides criopreservados de equinos. Tese (Doutor em Medicina Veterinária) - **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BRASIL É O MAIOR PRODUTOR DE GRÃOS E MAIOR EXPORTADOR DE CARNE BOVINA DO MUNDO. **EMBRAPA**, 01 de junho de 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo>. Acesso em: 27 set. 2023.

BUENO, P. A.; BELTRAN, M. P. Produção in vitro de embriões bovinos. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, n.11, p.1-7, 2008.

CARVALHO, A. F. et al. Validação de nova proposta de espermocultura quantitativa aplicada a sêmen industrializado de touros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.64, n.1, p.83-90, 2012.

CABRITA, E. et al. Cryopreservation on fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, 26 (2010), 623–635.

CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2005. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-21092006-111358/publico/EneivaCarlaCarvalhoCeleghini.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2024.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Damage assessment of the equine sperm membranes by Fluorimetric Technique. **Brazilian archives of biology and technology**, Vol.53, n. 6: pp.1285-1292, November-December 2010 ISSN 1516-8913.

CELEGHINI, E. C. C.; DE. ARRUDA, R. P.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; DOS SANTOS, F. B.; ALVES, M. B. R.; DE OLIVEIRA, B. M. M. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.40-45, jan./mar. 2017.

CHAVEIRO, A.; MACHADO, L.; FRIJTERS, A.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. **Theriogenology**, v.65, p.1875-1890, 2006.

CHEN L. B. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.4, p.155-181, 1988.

COELHO, L. A. et al. Produção In Vitro de embriões bovinos: utilização de diferentes fontes de gonadotrofinas na maturação de oócitos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.117-1121, 2002.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. **The physiology of reproduction**, v.2, p.29-77, 1994.

ENWURI, C. A. et al. The effect of presence of facultative bacteria species on semen and sperm quality of men seeking fertility care. **African Journal of Urology**, v.22, n.3, p.213-222, 2016.

FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v.26, n.5, p.636-643, 2010. Disponível em: <https://archimer.ifremer.fr/doc/00015/12642/13921.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2024.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et biophysica acta**, v.1469, n.3, p.197-235, 2000.

FREITAS, F. V. Inclusão de colesterol e seus efeitos no potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides criopreservados de jumentos da raça Pêga. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, 2017.

GENOVEZ, M. E. et al. Avaliação bacteriológica de semen in natura industrializado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.403-405, 1999.

GLAZAR, A. I. et al. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, v.59, p.201-206, 2009.

GONÇALVES, F. S. et al. Effect antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.129-35, 2010.

GONÇALVES, P. B. D.; FILGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. **EMBRAPA**, São Paulo, p.408, 2008.

GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated sperma-tozoa of the ram and bull during cryoprsvation process. *Theriogenology*, v.46, p.1151-1161, 1994.

GUTTERIDGE J. M. C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidant in the year 2000: a historical look to the future. **The New York Academy of Sciences**, v.899, issue 1, p.136-147, 1999.

GUTTERIDGE J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants in nutricion, health and disease. **Oxford: Oxford University Press**, 1994

HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução masculina. **Reprodução animal**. São Paulo, p.3-12, 2004.

ISHIBASHI, N. et al. Effectiveness of gelatin solidification for unfrozen preservation and transportation of astrocytes. **Advances in Biological Chemistry**, v.2, n.3, 2012.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. Phathology of domestic animals. **Academic Press**, ed. 2, New York, 1979.

LEITE, P. A. et al. Criopreservação do sêmen bovino. **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 4, 2015. Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/view/1147>. Acesso em: 11 fev. 2024.

LOIOLA, M. V. G. et al. Validação de um programa de produção in vitro de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.15, n.1, p.93-101, 2014.

MALAFAIA, G. C.; BISCOLA, P. H. N. Anuário CiCarne da cadeia produtiva da carne bovina. **EMBRAPA**, 2023. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1160117/1/Anuario-CiCarne-cadeia-produtiva-2023.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2025.

MARINHO, W. A. D. S. et al. Características seminais e de membrana espermática em touros suplementados com tocoferol. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.17, n.2, p.322-330, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbspa/a/rtW5HgFkZd6KP96WTvCPDsv/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 11 fev. 2024.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of physiology**, p. 24, 1984. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>. Acesso em: 11 fev. 2024.

MAZUR, P.; WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P. Survival os Mouse Embryos Frozen to -196° and -269°C. **Science**, v.178, p. 411-414, 1972.

MEYER, M. et al. Studies on the pathogen Effect of metabolic products of Staphylococcus aureus strains on bull sêmen. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.93, p.66-74, 1980.

MIRANDA, M. S. et al. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção in vitro de embrião bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.218-223, 2007.

MONTEIRO, F. N. B. Boas práticas aplicadas à colheita de sêmen bovino influenciam nos parâmetros espermáticos. **UNOESTE**, Presidente Prudente, 2021.

NASCIMENTO, C. Associação de crioprotetores permeáveis e não permeáveis para a criopreservação de células tronco mesenquimais de tecido adiposo equino. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Ciências Veterinárias) - **Universidade Estadual do Ceará**, 2018.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and the Mammalian Thiredozin System. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31,p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, G. C. et al. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, 2013. Disponível em www.cbra.org.br. Acesso em: 11 fev. 2024

ÔURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v.122, p.105-151, 1990

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v.29, p. 255-266, 1992.

QUINTERO-MORENO, A. et al. Identification of cryodamage on plasma membrane integrity in bull spermatozoa and its relationship with field fertility. **Revista Científica**, FCV-LUZ, v. 21, n.5, p.403 - 407, 2011.

RAPHAEL C. F. Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide equino refrigerado. Dissertação (Pós-Graduação) - **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, 2017.

REIS, L. S. L. S. et al. Integrity of the plasma membrane, the acrossomal membrane, and the mitochondrial membrane potential of sperm in Nelore bulls from puberty to sexual maturity. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.3, p.620-628, 2016.

RODRIGUES, R. B. Criopreservação de sêmen de Zebrafish. Tese (Doutorado em Zootecnia) - **Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2020.

ROMITTO, G. C. Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte. 2003. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2003.

ROSATO, M. P.; IAFFALDANO, N. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. **Theriogenology**, v.79, p. 508-516, 2013.

SANCLER-SILVA, Y. F. R.; MONTEIRO, G.A. Tecnologias para criopreservação de sêmen em equinos. **Associação Brasileira de Andrologia Animal**, 2019.

SANTOS, J. F. D. et al. Qualidade do sêmen bovino criopreservado. **Revista Espacios**, v.39, n.14, p.18, 2018.

SILVA, N. D. C. et al. Efeito da adição de diferentes antioxidantes em diluentes de criopreservação sobre a qualidade do sêmen e a produção *in vitro* de embriões bovinos. **Society and Development**, v.9, n.8, 2020.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p. 958-97, 2006.

SOLEYMANI, B.; PARVANEH, S.; MOSFAIE, A. Goat Polyclonal Antibody Against the Sex Determining Region Y to Separate X- and Y-Chromosome Bearing Spermatozoa, **Reports os Biochemistry and Molecular Biology**, v. 8, n.3, p. 326-334, 2019.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.47-53, 2007.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, p.100-109, 2008.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.35, n.3, p.915-924, 2007.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, p.883-889, 2009.

WATTIMENA, F.; PARERA, P.; VEERMAN, M. Effect of Maltose concentration in tris dilution on epididymal spermatozoa quality of bali bull preserved at 5°C. **Department of Animal Science, Agriculture Faculty, Pattimura University**, 2009.

WRENZYCKI, C. Sistemas de cultivo in vitro: quão longe estamos das condições ideais? **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Fox do Iguaçu, v.30, p.155-159, 2016.

ZUCCARI, C. E. S. N. et al. Correlação entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozoide bovino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. V.10, n.3, p.678-684, 2009.

