



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO E RELATÓRIO DE
ESTÁGIO OBRIGATÓRIO: Efeito do ringer lactato ozonizado nos
parâmetros espermáticos em garanhão

AMANDA BERNARDELLI TONSICA

Campo Grande – MS

2024

AMANDA BERNARDELLI TONSICA

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO E RELATÓRIO DE
ESTÁGIO OBRIGATÓRIO: Efeito do ringer lactato ozonizado nos
parâmetros espermáticos em garanhão**

AMANDA BERNARDELLI TONSICA

Orientador: Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação em Medicina
Veterinária apresentado à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de Bacharel
em Medicina Veterinária.

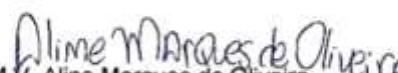
Campo Grande – MS

2024

AMANADA BERNARDELLI TONSICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em 19 de novembro
de 2024 e aprovado pela Banca Examinadora:


Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio
Presidente


M.V. Aline Marques de Oliveira


Prof. Dr. Paulo Antonio Terrabuio Andreussi

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por ter me guiado em todos meus caminhos e, mesmo em linhas tortas, me proporcionado a realização do sonho de ser médica veterinária, me ensinando a ter perseverança em momentos difíceis da vida.

Aos meus pais, Andrea de Aquino Bernardelli Tonsica e Luis Carlos Tonsica, os responsáveis pela construção do meu caráter, as pessoas que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial. Serei eternamente grata por todo o suporte e carinho que me deram ao longo dos meus vinte e dois anos. Vocês são meu porto seguro, meus maiores exemplos de amor e força!

Agradeço também aos meus familiares, principalmente aos meus avós maternos, Ada Lucia de Aquino Bernardelli e Dorival Bernardelli, que sempre torceram pelas minhas conquistas e ao meu tio, Alexssandre Bernardelli, um modelo da profissão para mim. Minhas experiências na antiga fazenda da família despertaram em mim a paixão pela conexão com animais e com a natureza.

Ao meu Orientador, Prof. Breno Fernandes Barreto Sampaio, pela paciência em ensinar repetidas vezes e grata por ter me mostrado a imensidão por trás da Reprodução Animal, área pela qual sou extremamente encantada, e por ter me dando direção quanto ao meu futuro como profissional. Agradeço aos meus professores da graduação, cada um de diferentes formas me inspiraram a prosseguir e ensinaram a respeito da grandiosidade da Medicina Veterinária.

Por fim, agradeço os amigos que a faculdade me proporcionou, em enfoque Davi, Daniel, Jhennifer e Kawe que compartilharam comigo todos os variados sentimentos ao longo desse curso desafiador. Vocês tornaram esses cinco anos ainda mais especiais! Ao meu namorado, Gabriel Moura da Silva, que sempre traz calma em momentos de turbulência e me apoia em todas minhas decisões.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	6
2.DESENVOLVIMENTO.....	7
2.1Local de estágio:Unesp/FMVZ.....	7
2.1.1 Atividades desenvolvidas.....	12
2.1.2 Relação das atividades desenvolvidas.....	13
2.1.3 Casuística dos atendimentos.....	15
2.2 Local de estágio: Garantia Pec.....	16
2.2.1 Atividades desenvolvidas.....	19
2.2.2 Relação das atividades desenvolvidas.....	20
2.2.3 Casuística dos atendimentos.....	21
3. RELATO DE CASO.....	23
3.1 Introdução.....	23
3.2 Resultados.....	29
3.3 Conclusão.....	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

O estágio curricular obrigatório é uma disciplina da estrutura curricular exigida para a conclusão do curso de Medicina Veterinária, sendo de extrema importância para a formação profissional do acadêmico, uma vez que possibilita a vivência prática da profissão, proporcionando ao aluno a oportunidade de executar o conhecimento teórico metodológico adquirido durante os anos de graduação.

O Estágio Curricular Obrigatório foi realizado sob a orientação do Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio, em dois locais. A primeira etapa do estágio foi realizada no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ – UNESP), campus de Botucatu, São Paulo, na área de fisiopatologia da reprodução e obstetrícia, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, no período de 05 de agosto à 30 de setembro de 2024, totalizando 320 horas, sob a supervisão do Professor Dr. Gabriel Augusto Monteiro em período integral (40 horas semanais). A segunda etapa do estágio supervisionado foi realizada na empresa Garantia Pec Fertilização Animal *In Vitro*, localizada em Campo Grande, MS, no período de 01 à 31 de outubro de 2024, totalizando 184 horas, na área de produção *in vitro* de embriões bovinos, sob a supervisão da responsável do laboratório Mariza Rocha de Matos.

A duração total de 504 horas, cumprindo os requisitos citados pela comissão de estágio da UFMS. Obtive qualidade de ensino e oportunidade de diversas práticas, tanto pela instituição quanto pela empresa, na área de Reprodução animal.

A escolha dos lugares baseou-se na possibilidade de ampliar meus conhecimentos teóricos e práticos a partir de novas perspectivas, além da vivência e das possibilidades da formação de uma rede de contatos com pessoas da área de interesse.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Local de estágio: Unesp/FMVZ

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - campus de Botucatu (Figura 1) está localizado na Rua Dr. Valter Maurício Corrêa, S/n, Rubião Júnior, no município de Botucatu, estado de São Paulo. A estrutura hospitalar veterinária tem o intuito de atender as necessidades acadêmicas e da sociedade, com horário de funcionamento das 8hs às 18hs, todos os dias da semana e aos feriados e finais de semana para o atendimento de emergências.

O hospital veterinário é dividido em sete setores: setor de triagem e clínica médica de pequenos animais, setor de clínica médica e cirúrgica de grandes animais, setor de diagnóstico por imagem, setor de clínica médica e cirúrgica de animais selvagens, setor de moléstias infecciosas, setor de clínica cirúrgica de pequenos animais e setor de reprodução animal.

O setor de reprodução (Figura 2) está presente no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e é subdividido em três atividades principais, alocadas em espaços distintos sendo elas: ambulatório de pequenos animais, cirurgia de pequenos animais e clínica médica e cirúrgica de grandes animais, todas voltadas exclusivamente a atendimentos de enfermidade e biotecnologias reprodutivas. Os atendimentos deste setor são realizados por seis médicos veterinários residentes – três no segundo ano de residência (R2) e três no primeiro ano de residência (R1), em conjunto com professores da área. O estagiário é alocado em um método de rodízio, sendo uma semana em cada. O Hospital veterinário possui um Sistema informatizado (Figura 3) para registro dos animais, consultas, procedimentos, exames complementares e retornos realizados da FMVZ, UNESP – Botucatu.



Figura 1. Fachada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP – Botucatu FMVZ.
Fonte: Arquivo pessoal (2024).



Figura 2. Fachada do setor de Reprodução animal UNESP - FMVZ Botucatu.
Fonte: Arquivo pessoal (2024).



Figura 3. Sistema informatizado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP – Botucatu FMVZ.

Fonte: Arquivo pessoal (2024).

A área de pequeno porte é constituída por três ambulatórios (Figura 4) onde são efetuados os atendimentos da clínica reprodutiva veterinária, climatizados, sendo equipados similarmente com computador, materiais de uso ambulatorial (álcool, éter, clorexidina alcoólica, clorexidina aquosa, água oxigenada, iodo, algodão, gaze, papel toalha, esparadrapo e micropore), mesa de atendimento, glicosímetro, doppler, máquina de tosa, luvas de procedimento, entre outros. O terceiro ambulatório (Figura 4 C) possui acesso ao centro cirúrgico, sendo utilizado majoritariamente como sala de manipulação pré-operatória do paciente e também utilizada para alta do animal. Possui um centro cirúrgico (Figura 5. A) bem equipado, uma sala de antissepsia e paramentação (Figura 5. B), uma sala de neonatologia (Figura 6), e uma sala de esterilização e farmácia. O departamento ainda conta com outros ambientes tais como: sala de residentes, secretaria, copa, salas pessoais dos professores e banheiros feminino e masculino.

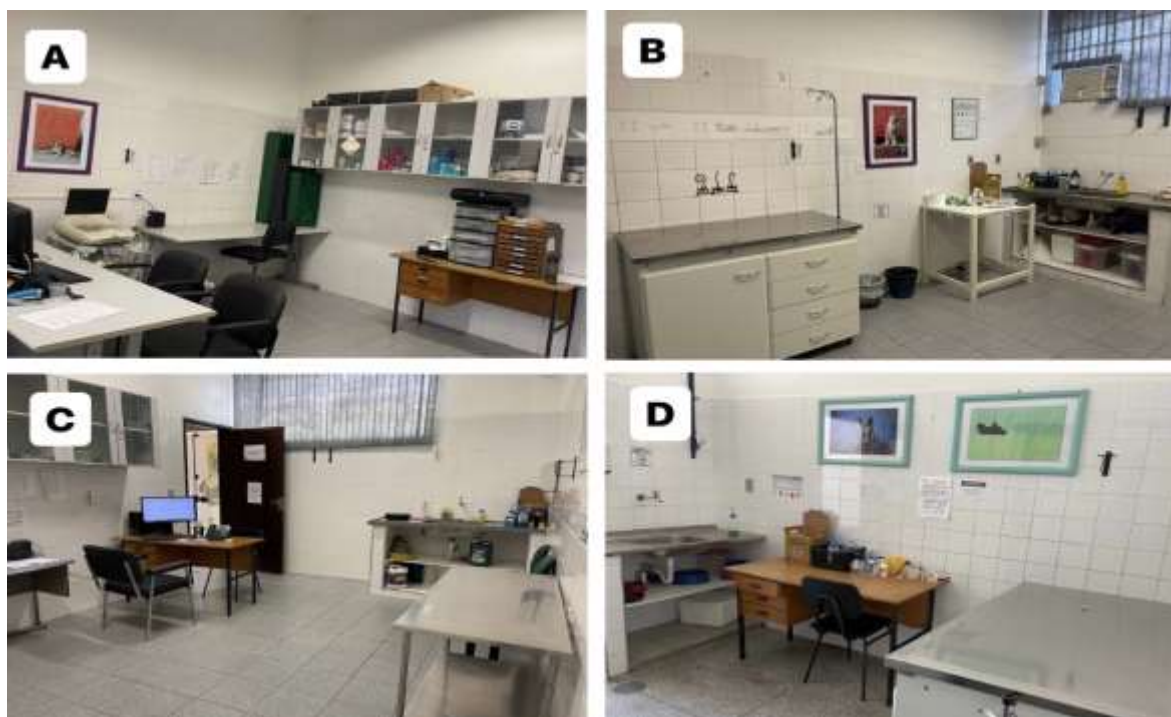


Figura 4. A, B) Ambulatório 1 de pequenos animais; C) Ambulatório 2; D) Ambulatório 3.
Fonte: Arquivo pessoal (2024).



Figura 5. A) Centro cirúrgico de pequenos animais do setor de Reprodução Animal; B) Sala de antissepsia e paramentação.
Fonte: Arquivo pessoal (2024).



Figura 6. Sala de neonatologia.

Fonte: Arquivo pessoal (2024).

O setor de grande porte é composto por uma extensa área destinada aos atendimentos e realização de procedimentos simples, apresenta dois troncos de contenção arquitetados para espécie equina e um para bovina (Figura 7) e dois manequins para coleta de sêmen de garanhão, touros, asinino e mini *horses*. Além disto, há uma estrutura pensada para internação e alocação dos animais que são utilizados para experimentos/pesquisa, dispondo de baias (Figura 8. A) bem arejadas e piquetes (Figura 8. B). Ainda dentro do setor de grandes animais, há outros compartimentos referentes à pós-graduação tais como o Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN).



Figura 7. Travas de contenção equino e bovino na área de atendimento de grandes animais.
Fonte: Arquivo pessoal (2024).



Figura 8. A) Bairas; B) Piquetes.
Fonte: Arquivo pessoal (2024).

2.1.1 Atividades desenvolvidas

Foi realizado um rodízio semanal entre as áreas de pequenos animais e grandes animais, auxiliando os residentes responsáveis. Nos ambulatórios de pequenos animais, as atividades incluíam acompanhamento dos atendimentos obstétricos, anamnese completa, aferição dos parâmetros vitais, coleta de amostras para exames laboratoriais, administração de medicamentos, realização de curativos e bandagens. Na rotina cirúrgica, o estagiário atua como auxiliar ou circulante na preparação de todos os materiais que serão utilizados na cirurgia e

passa recomendações do pós-cirúrgico do animal ao tutor. Quanto a área de grandes animais, contribuía-se com o residente para procedimentos recorrentes como ultrassonografia de éguas, coleta e análise de sêmen, curativos pós-cirúrgicos, exames físicos dos animais internados e preparação e limpeza do material para as coleta de sêmen, inseminações ou transferência de embrião. Em todas as áreas contribuía-se com a manutenção da organização do setor. As segundas de manhã, das 08hs às 09hs, há apresentações de relato de caso realizadas pelos estagiários e posteriormente discussões sobre o mesmo junto aos residentes e professores do setor.

2.1.2 Relação das atividades desenvolvidas

Ao longo do período de estágio curricular, equivalente a dois meses no HV/FMVZ, foi possível acompanhar 249 procedimentos ambulatoriais e cirúrgicos tanto de animais de grande (Tabela 1) como de pequeno porte (Tabela 2).

Tabela 1. Procedimentos ambulatoriais e cirúrgicos de grandes animais acompanhados no setor de Reprodução animal na UNESP - FMVZ Botucatu

Procedimentos	Equídeos	Bovinos	Peq. Ruminantes	N.º de procedimentos	Porcentagem (%)
Controle folicular	56			56	33,94%
Palpação retal + US		8		8	4,85%
US testicular			7	7	4,24%
Termografia testicular			7	7	4,24%
Lavagem uterina	12			12	7,27%
Swab vaginal			2	2	1,21%
Coleta de sêmen	26			26	15,76%
Coleta de sêmen fracionada	5			5	3,03%
Inseminação artificial	4	4		8	4,85%
Coleta de embrião	5			5	3,03%
Transferência de embrião	2			2	1,21%
Espermograma	12			12	7,27%
Criopreservação de sêmen	6			6	3,64%
Mastite			4	4	2,42%

Vulvoplastia	1	1	0,61%
Distocia	1	2	1,21%
Fetotomia	1	1	0,61%
Mastectomia	1	1	0,61%
Total		165	100%

Tabela 2. Procedimentos ambulatoriais e cirúrgicos de pequenos animais acompanhados no setor de Reprodução animal na UNESP - FMVZ Botucatu

Procedimentos	Canino	Felino	N.º de procedimentos	Porcentagem (%)
US de sistema reprodutivo feminino	2	1	3	3,57%
US de próstata	4		4	4,76%
Diagnóstico gestacional	6	2	8	9,52%
Acompanhamento gestacional	7		7	8,33%
Citologia Vaginal	5		5	5,95%
Atendimento oncológico	5	2	7	8,33%
Pseudociese	3		3	3,57%
Vaginite	2		2	2,38%
Retirada de pontos	11		11	13,10%
Avaliação pré-operatória	6	3	9	10,71%
Acesso venoso	3		3	3,57%
Sonda uretral	2		2	2,38%
Manejo neonatal	5		5	5,95%
Cesariana	3		3	3,57%
Ovário-histerectomia curativa	2		2	2,38%
Ovário-histerectomia eletiva	3	1	4	4,76%
Mastectomia	5		4	4,76%
Orquiectomia	1		1	1,19%
Nodulectomia prepucial	1		1	1,19%
Total			84	100%

O total de procedimentos acompanhados em grandes animais ser maior é justificado pelo maior tempo dedicado a essa área, com 4 semanas, enquanto nas áreas de ambulatório e cirurgia de pequenos animais foram dedicadas apenas 2 semanas a cada uma.

2.1.3 Casuística dos atendimentos

Na FMVZ – Unesp Botucatu houve uma variedade quanto as espécies atendidas (Gráfico 1) no setor de Reprodução animal, a que apresentou maior número de procedimentos realizados foi, com grande discrepância, a equina, representando 52% do total de atendimentos por espécie. Essa diferença pode ser explicada pela faculdade possuir equinos disponíveis para aulas e projetos de mestrado e doutorado, contribuindo para uma intensa rotina com a espécie.

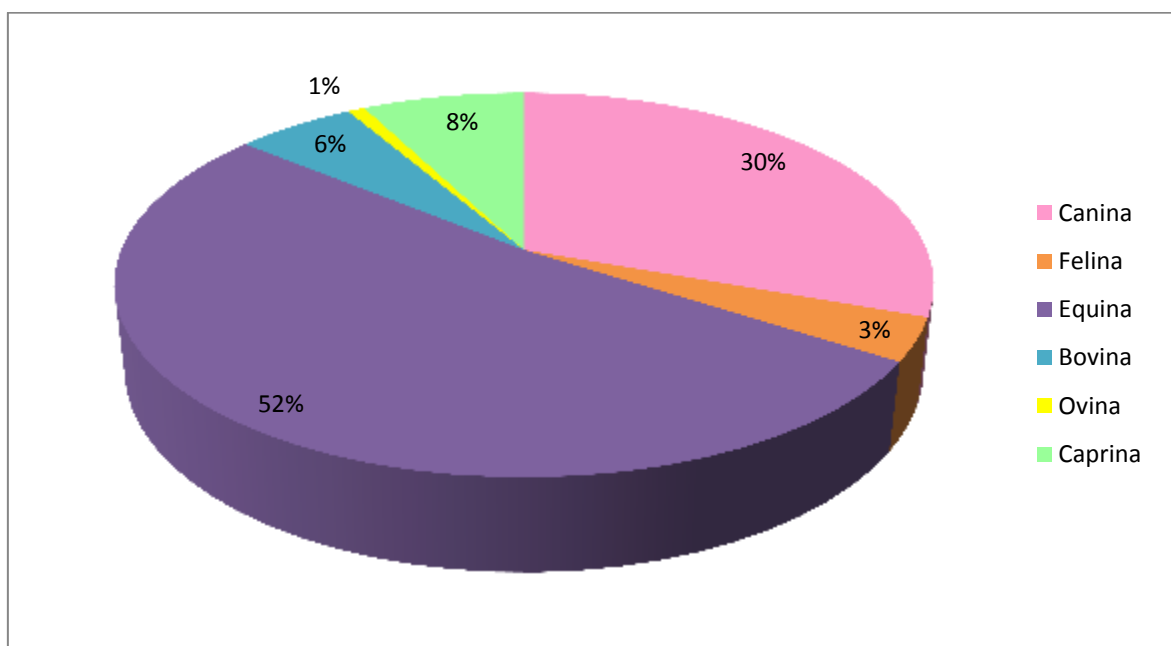


Gráfico 1. Porcentagem de procedimentos por espécie realizados na FMVZ – Unesp Botucatu.

O controle folicular equino com ultrassonografia transretal foi a atividade com maior prevalência dos casos na área de grandes animais (33,94%) devido a utilização desses animais em projetos de pós-graduação, sendo assim necessário avaliações frequentes. Segundo Mello (2006), a ultrassonografia é uma eficiente ferramenta utilizada para avaliação do momento da indução da ovulação, não somente pela precisão proporcionada através da mensuração do diâmetro folicular como também pela classificação do grau de edema endometrial, que é classificado de 0 a 5. Tal técnica auxilia o médico veterinário no planejamento da aplicação de biotecnologias reprodutivas como determinar momento para inseminação artificial ou sincronização de éguas receptoras para a transferência de embrião.

A citologia vaginal foi um procedimento que despertou interesse, mesmo não apresentando a maior prevalência (5,95%) nos ambulatórios de pequenos animais. É uma técnica simples e rápida que pode ser empregada no uso da determinação da fase do ciclo estral e assim detectar o melhor momento para inseminação artificial ou da monta natural (FELDMAN e NELSON, 1996). A cada fase ocorrem alterações quantitativas e qualitativas celulares, sendo predominante no proestro células intermediárias; no estro células superficiais; metaestro celular intermediárias e diestro e anestro células parabasais.

2.2 Local de estágio: Garantia Pec

A Garantia Pec (Figura 9) originou-se dia 01 de fevereiro de 2023 como um laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos situado na rua Amazonas, 1340, Vila Gomes, na cidade de Campo Grande, MS. A empresa é formada pela sociedade de quadro médicos veterinários, sendo um deles, Eduardo Karvat, o médico veterinário de campo responsável pelas aspirações foliculares guiado por ultrassom. Ademais, a equipe apresentam dois auxiliares de campo, Pedro e Guilherme, uma gerente, Paula Eysink e no laboratório há a bióloga e laboratorista Mariza Matos e sua auxiliar Amanda Frateschi.



Figura 9. Fachada da empresa Garantia Pec fertilização animal *In Vitro*.

Fonte: Arquivo pessoal (2024)

O local conta com uma ampla estrutura, uma sala de administração, sala destinada a reuniões, copa, sala de armazenamento de equipamentos do campo e banheiro externo. Já para adentrar o laboratório há uma sala de transição da área suja para limpa (Figura 10), sendo necessária a troca de sapato ou uso de prpés, logo em seguida há acesso da área de esterilização e armazenamento de materiais de uso exclusivos ao laboratório (Figura 11 A e B), banheiro reservado para higienização das mãos e vestuários dos equipamentos de proteção (jaleco, máscara e touca de cabelo), sala de armazenamento de embriões e sêmen contendo três botijões de nitrogênio líquido (Figura 12) e, por fim, a área de produções de embriões.

O laboratório de PIVE é equipado com dois fluxos laminares (Figura 13), quatro incubadoras (Figura 14) destinadas a diferentes etapas do procedimento, centrífuga, aparelho para congelamento lento de embriões, micropipetas de diferentes volumes, entre outros diversos outros equipamentos.



Figura 10. Sala de transição entre área suja e área limpa.

Fonte: Arquivo pessoal (2024).



Figura 11. A) Equipamentos de esterilização, B) Armário de armazenamento de equipamentos exclusivos do laboratório.

Fonte: Arquivo pessoal (2024).



Figura 12. Sala de armazenamento de sêmen e embriões.

Fonte: Arquivo pessoal (2024).



Figura 13. Dois fluxos para procedimentos.
Fonte: Arquivo pessoal (2024).



Figura 14. Incubadoras de oócitos e embriões.
Fonte: Arquivo pessoal (2024).

2.2.1 Atividades desenvolvidas

Ao decorrer do estágio foi possível acompanhar todas as etapas da PIVE, desde a recepção dos oócitos e maturação *in vitro* (MIV), o preparo do sêmen e oócitos maturados para a fertilização *in vitro* (FIV), a passagem para os meios de cultivo *in vitro* (CIV) e clivagem (CLIV), até a previsão e envase para transferência dos embriões, além dos procedimentos de criopreservação por vitrificação e congelamento lento (*Direct Transfer* – DT). Além disso, ainda fazia parte das

funções do estagiário os preenchimentos de fichas de produção, auxiliar na rotina do laboratório com a preparação de meios, reposição, organização e esterilização de materiais. O cronograma com os procedimentos para produção *in vitro* de embriões foi ilustrados na Figura 15.

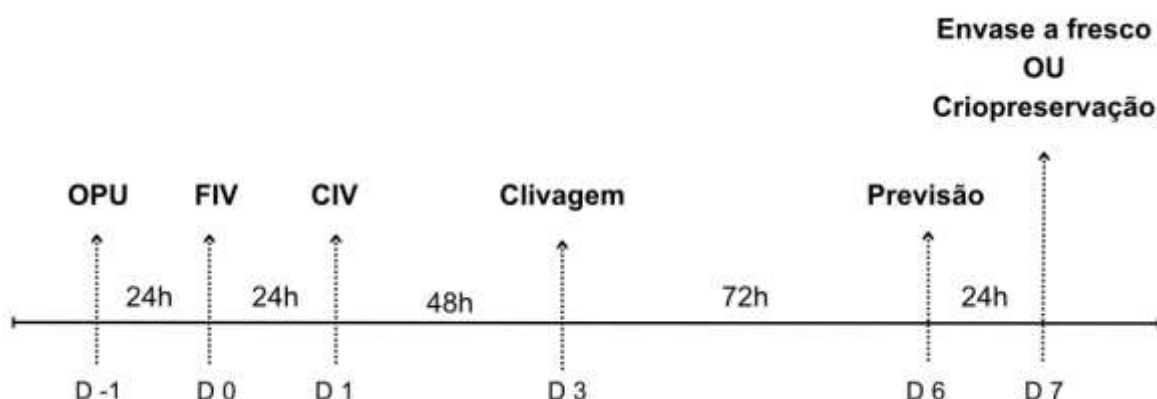


Figura 15.

2.2.2 Relação das atividades desenvolvidas

Ao todo, no laboratório, 159 procedimentos foram assistidos (Tabela 3), sendo as porcentagens entre eles distintas, mesmo se tratando de etapas subsequentes para a produção *in vitro* de embriões, devido ao fato que produções para algumas fazendas não foram acompanhadas até o final perante o término do período de estágio curricular. Também foi contabilizada a quantidade de ovócitos e embriões manuseados (Tabela 4) das fazendas que concluíram a produção de embriões durante o estágio.

Tabela 3. Procedimentos de fertilização animal *in vitro* acompanhados na empresa Garantia Pec.

Procedimentos acompanhados	Quantidade	Porcentagem
Maturação <i>In Vitro</i>	13	8,18%
Fertilização <i>In Vitro</i>	13	8,18%
Cultivo <i>In Vitro</i>	13	8,18%
Clivagem	11	6,92%
Previsão	9	7,38%
Envase a fresco	8	5,03%
Criopreservação de embriões	9	5,66%
Seleção espermática por touro	83	52,20%
Total	159	100%

Tabela 4. Quantidade de ovócitos e embriões manuseados em cada etapa da produção *in vitro*.

	Ovócitos			Embriões		
	MIV	CIV	CLIV	PREV	ENVASE	CRIO
Fazenda 1	645	563	324	105	96	33
Fazenda 2	852	771	458	181	120	73
Fazenda 3	830	781	524	150	105	64
Fazenda 4	377	352	232	70	0	66
Fazenda 5	666	620	323	134	150	5
Fazenda 6	605	537	376	123	70	55
Fazenda 7	338	330	243	128	110	0
Fazenda 8	627	572	307	102	0	70
Fazenda 9	338	332	243	145	100	32
Total	5278	4858	3030	1138	751	398

Legenda: MIV: maturação *in vitro*; CIV: cultivo *in vitro*; CLIV: clivagem; PREV: previsão; CRIO: criopreservação.

2.2.3 Casuística dos atendimentos

Quanto as criopreservações embrionárias observou-se dois métodos distintos (Gráfico 2), tanto de congelamento como de descongelamento, a vitrificação e o congelamento lento, realizados de acordo com a escolha dos clientes. Ambas as técnicas permitem uma otimização do uso de embriões produzidos, facilitando a sua comercialização ou então estocagem quando em casos de quantidade insuficiente de receptoras disponíveis.

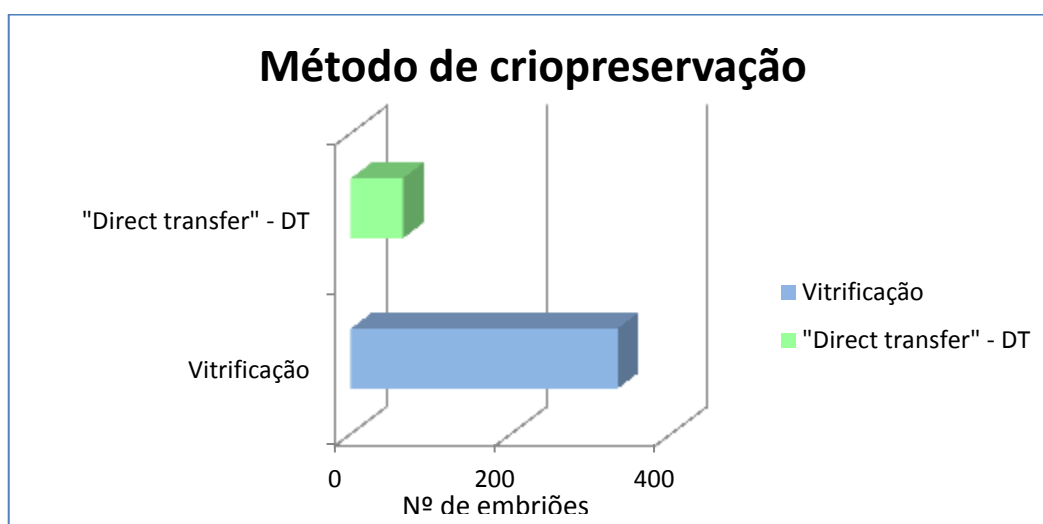


Gráfico 2. Número de embriões criopreservados na Garantia Pec por cada um dos métodos de congelamento.

A vitrificação consiste em um congelamento ultra rápido com muitos crioprotetores que durante o resfriamento impeça a formação de cristais de gelo, tornando-o em estado vítreo devido a solidificação da água da célula (KASAI e MUKAIDA, 2004). Entre as vantagens dessa técnica destaca-se a utilização de equipamentos de baixo custo e o menor tempo para sua execução. Entretanto, necessita de mão de obra e local qualificados para o procedimento de congelamento e, também, para desvitrificação prévia à transferência do embrião. Apresentou a maior porcentagem (84%) dos embriões congelados no mês de outubro na empresa de fertilização *in vitro* bovina devido a maior preferência dos clientes.

Quanto ao método *Direct Transfer*, trata-se de um de congelamento lento, porém o descongelamento do embrião é realizado de forma rápida e simples, semelhante ao de uma dose de sêmen para inseminação artificial tradicional. Contudo, além de ser um método longo, ele também requer um dispendioso aparato de equipamentos de congelação e grande volume de nitrogênio líquido (VAJTA E NAGY, 2006). Dessa, forma, conclui-se que ambas as técnicas de criopreservação embrionária apresentam vantagens e limitações, sendo necessária uma análise quanto aos objetivos do cliente para a escolha da metodologia mais adequada a cada caso.

3. RELATO DE CASO

EFEITO DO RINGER LACTATO OZONIZADO NOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS EM GARANHÃO

Resumo

A ozonioterapia é uma técnica que vem sendo utilizada em diversos ramos da clínica médica, porém, poucos estudos abordam seus efeitos no aspecto reprodutivo. O presente texto objetiva relatar um caso dos efeitos positivos do uso da solução cristaloide Ringer Lactato ozonizado na qualidade seminal de um garanhão. O animal teve participação em um projeto de pesquisa, onde foram realizadas administrações da solução ozonizada e as colheitas do sêmen semanalmente, durante o período experimental de 7 semanas. Os momentos de análises foram pós-colheita e posteriormente haverá avaliações após a descongelação. As análises laboratoriais realizadas foram cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal.

Palavras-chave: criopreservação, espermatozoide, ozonioterapia

3.1 INTRODUÇÃO

A equinocultura no Brasil vem se desenvolvendo muito nos últimos tempos, sendo que em certos segmentos, como os esportes, possuem representatividade internacional. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), o país possui a 4ª maior tropa de cavalos do mundo. Segundo o MAPA / Câmara Setorial da Equideocultura - 2016, a atividade movimenta anualmente R\$ 16,15 bilhões e gera 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos, sendo responsável, assim, por 3 milhões de postos de trabalho (LIMA et al., 2016).

No entanto, a criação de equinos de alto valor genético enfrenta diversas barreiras. Uma delas se deve ao fato de que a alta seleção genética dessa espécie é baseada no padrão racial e desempenho atlético e não no aspecto reprodutivo, sendo assim diversos animais com problemas de fertilidade são

selecionados como reprodutores ou matrizes (CAMARGO, 2023). Desta forma, alternativas para melhorar os índices reprodutivos ao mesmo tempo melhorando a genética dos animais são almejadas pelos criadores, o que incentiva a utilização de biotecnologias ligadas à reprodução como a Inseminação Artificial (IA) e Transferência de Embriões (TE) (Papa et al., 2005).

A criopreservação do sêmen proporciona várias vantagens, como aumento da disponibilidade de espermatozoide, facilitando os trabalhos de reprodução assistida. Outras vantagens é a otimização do uso de garanhões com comprovada superioridade genética, com a possibilidade do armazenamento de sêmen, mesmo fora da estação de monta e a quebra das barreiras geográficas, que torna possível a remessa de sêmen para qualquer parte do mundo (BARRETO et al., 2008).

Entretanto, durante a exposição a baixas temperaturas, os espermatozoides são submetidos a diversas alterações bioquímicas, moleculares e de membrana plasmática, alterações de reorganização e são suscetíveis a processos deletérios, principalmente estresse oxidativo (SIEME et al., 2015). Espermatozoides equinos têm grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados (PUFAS) nas membranas, o que os tornam mais sensíveis ao estresse oxidativo uma vez que as ligações carbono-hidrogênio adjacentes às ligações duplas são mais instáveis e mais suscetíveis ao sequestro de hidrogênio por ROS (FRITA et al., 2000).

Neste contexto, também vale lembrar que os espermatozoides têm muito pouco espaço citoplasmático para abrigar as enzimas da via das pentoses fosfato. A via das pentoses fosfato é bioquimicamente ativa em espermatozoides de mamíferos e é capaz de gerar NADPH suficiente para suportar a atividade da glutathione peroxidase (WILLIAMS, 2004) Este último oferece a essas células um grau de proteção antioxidante e facilita a estabilização dos espermatozoides antes da ejaculação por meio da formação de extensas ligações cruzadas de dissulfeto (AITKEN JR et al., 2014).

As ROS reagem com qualquer componente bioquímico da célula, particularmente lipídios nas membranas celulares. Os espermatozoides, como as células somáticas, possuem a capacidade de gerar e degradar ROS que, em

equilíbrio com antioxidantes, são importantes para que a célula realize suas funções fisiológicas. Desempenham, também, um papel importante na função normal dos espermatozoides, incluindo a motilidade hiperativada, a quimiotaxia, a capacitação e a reação acrossômica (GIBB et al., 2014). O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre as ROS e as defesas antioxidantes das células. Este desequilíbrio na produção ou degradação das ROS pode ter efeitos adversos nos espermatozoides (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Diante das complexidades enfrentadas na preservação e manutenção da viabilidade do sêmen equino, a ozonioterapia tem emergido como uma abordagem terapêutica promissora. Pesquisas recentes apontam para o potencial da técnica em melhorar não apenas a motilidade, mas também a integridade morfológica dos espermatozoides em equinos. Seus efeitos benéficos incluem o aumento da motilidade progressiva dos espermatozoides, juntamente com uma redução na incidência de anormalidades morfológicas. Esses resultados promissores sugerem a capacidade da ozonioterapia de contribuir significativamente para a fertilidade e o sucesso reprodutivo dos equinos, oferecendo uma perspectiva promissora para a melhoria contínua das técnicas da reprodução equina (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009).

O ozônio (O_3) é um gás instável, formado pela combinação de três átomos de oxigênio em uma estrutura cíclica e, devido a essa instabilidade, se mostra como uma molécula altamente oxidante (Bocci, 2006). De acordo com Bocci et al. (2011), o ozônio, quando utilizado em concentrações adequadas, produz alguns efeitos importantes, como a regulação positiva das enzimas antioxidantes, a modulação imunológica pela ativação da síntese de neutrófilos e citocinas e o aumento da oxigenação tecidual.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo descrever um caso de um garanhão que apresentou resultados promissores quanto a qualidade seminal após o tratamento com solução Ringer lactato ozonizado via intravenosa.

Relato de caso

O garanhão, quarto de milha, 10 anos de idade, foi selecionado para compor um grupo de animais para projeto de pesquisa de mestrado em

andamento desenvolvido na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. O experimento busca avaliar o potencial da solução Ringer lactato ozonizado na melhoria da qualidade espermática de sêmens congelados de garanhões. Todo estudo está sendo realizado de acordo com preceitos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após aprovação pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS, sob protocolo nº 913/2017.

Ao todo o animal permaneceu durante 7 semanas na pesquisa, com três colheitas seminais cada, sendo realizadas as segundas, quartas e sextas. Na primeira semana não houve a administração da solução apenas colheitas seminais para amostra controle pré-tratamento. A partir da segunda semana foi realizada uma administração semanal de soro Ringer Lactato ozonizado, às segundas-feiras, com o intervalo de 7 dias, além das três colheitas de sêmen até a sexta semana de experimento. A última semana apenas obteve-se colheitas seminais para parâmetros pós-tratamento. A metodologia do experimento encontra-se ilustrada na Figura 16.



Figura 16.

O gerador de Ozônio (O₃) Ozone & life ®1.5 portátil (Ozone & life, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) foi calibrado na concentração de 67 µg/ml para insuflação do gás em soluções Ringer Lactato de 3 litros. Era realizado a ozonização do soro durante 10 minutos para que houve-se o borbulhamento. Em seguida, a reinfusão do soro ozonizado por via intravenosa. O cálculo para dose recomendada de ozônio variava de acordo com o peso do animal, utilizando a fórmula $(Dose\ (\mu g) = \text{concentração de ozônio dissolvido } (\mu g/mL) \cdot \text{peso animal} / \text{Volume (mL) de solução} \cdot 4)$.

A escolha para utilização do Ringer Lactato está na sua disponibilidade e fácil acesso no mercado, além de, quando comparado a solução fisiológica, está apresenta concentração superior de cloreto de sódio, havendo maior risco de a substância desencadear uma reação, junto ao ozônio, que conseqüentemente produza uma quantidade elevada de compostos tóxicos como o hipoclorito de sódio.

Para as sete semanas de colheitas de sêmen do garanhão utilizou-se da vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil), mantida a uma temperatura de 55 °C, com o auxílio de uma fêmea em cio.

As amostras de sêmen eram mantidas em banho-maria a 37°C e submetidas à análise das variáveis macroscópicas (volume, aspecto e cor) e microscópicas (motilidade objetiva e concentração). Em meio a base de leite desnatado e antibióticos, Botusêmen® (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil) o sêmen era diluído e enviado ao laboratório de processamento e análises em container de transporte a 15°C.

Cada amostra foi submetida às seguintes análises: concentração espermática, cinética espermática, integridade de membrana plasmática e do acrossoma e atividade mitocondrial por citometria de fluxo.

Para a concentração espermática utiliza-se uma amostra de 20 µL de sêmen diluída em 2.000 µL de água destilada (diluição 1:100) e a contagem feita em Câmara de Neubauer, sendo os resultados expressos em milhões de espermatozoides por mL.

A cinética espermática foi avaliada objetivamente pelo sistema computadorizado CASA do modelo Sperm Class Analyzer – SCA (Figura 17), obtendo os parâmetros de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP). Para essa avaliação colocou-se 5,0µL de sêmen na câmara de Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) previamente aquecida a 37°C, o aparelho foi calibrado conforme as recomendações do fabricante para análise de sêmen equino.

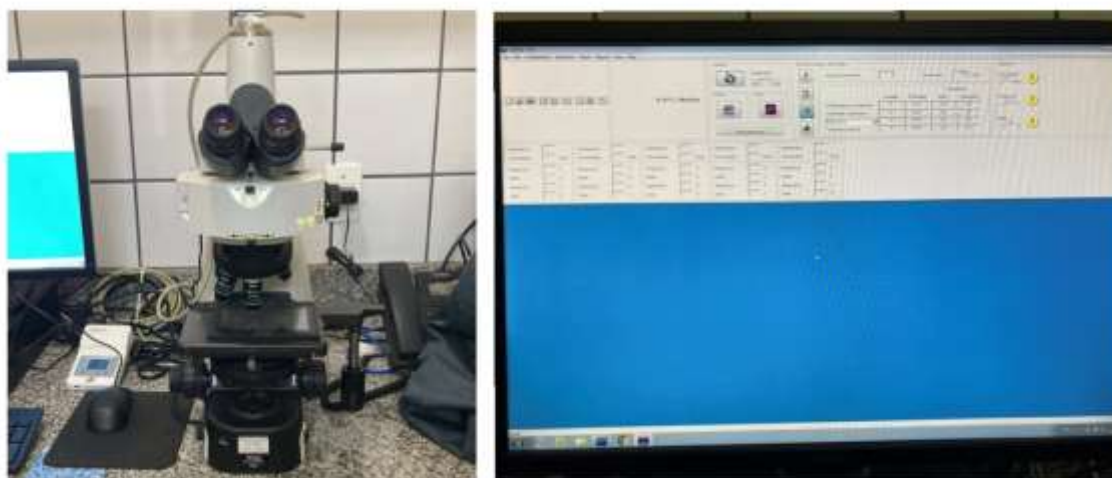


Figura 17. Sistema computadorizado CASA do modelo Sperm Class Analyzer – SCA.

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Na avaliação espermática por citometria de fluxo foi utilizado o equipamento CytoFLEX®, marca Beckman Coulter (Figura 18), fazendo a contagem de, pelo menos, 10.000 eventos, no momento pré-congelação. Para obter a integridade de membrana plasmática associou-se sondas fluorescentes Hoechst 33342 que emite coloração azul de 461 nm quando apresentam a membrana plasmática intacta e iodeto de propídio (IP) um fluorocromo impermeável à membrana, penetrando apenas quando a mesma encontra-se lesada. Já a avaliação da integridade da membrana acrossomal será feita através da sonda fluorescente FITC-PNA, corando em verde quando o acrossoma encontra-se reagido e não cora quando o acrossoma está intacto.

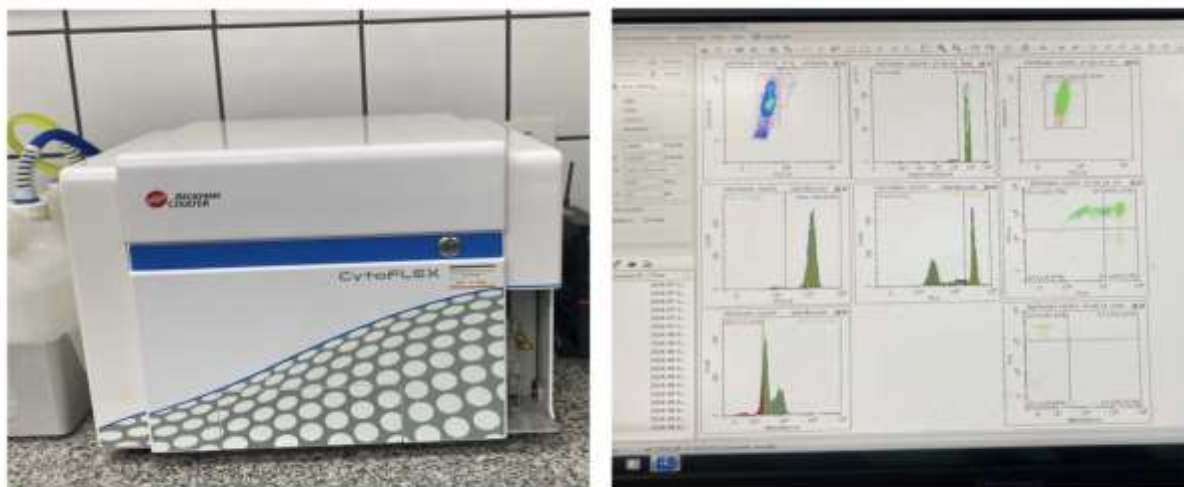


Figura 18. Equipamento CytoFLEX® para avaliação espermática por citometria de fluxo.

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

3.2 RESULTADOS

O garanhão em questão apresentou motilidade total e progressiva de 30% e 25%, respectivamente, na primeira colheita, na qual não houve a administração da solução Ringer Lactato ozonizado. Nas semanas seguintes, onde houve aplicação do tratamento, observou-se uma melhora gradativa (Gráfico 3) dos parâmetros cinéticos do sêmen do animal, proporcional ao número de sessões realizadas. Na sétima e ultima semana de aplicação o animal obteve porcentagens de 80% de motilidade total e 48% de progressiva.

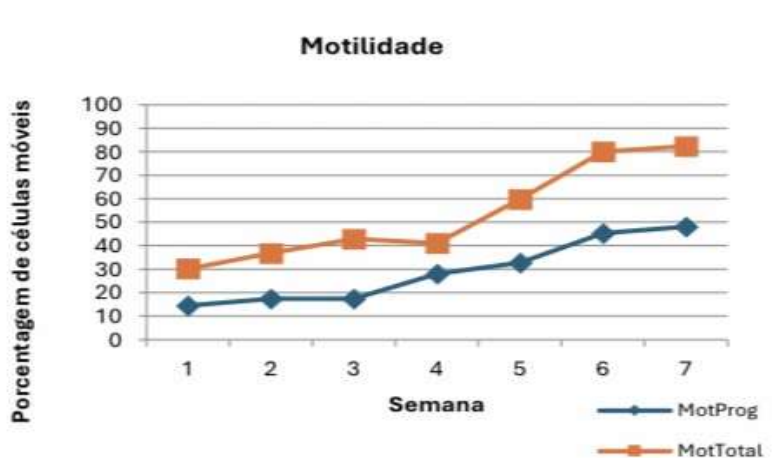


Gráfico 3. Porcentagem de motilidade progressiva e total ao longo das semanas de tratamento com soro ozonizado avaliadas no momento pré-congelamento.

Outra melhora significativa identificada, quando comparado ao da amostra seminal controle, foi na integridade de membrana plasmática (Gráfico 4). Prévio ao tratamento o animal apresentava 35% de células com membrana plasmática íntegra. O aumento gradual após as administrações do soro ozonizada resultaram em um percentual final de 70%, havendo assim um salto positivo nesta análise.

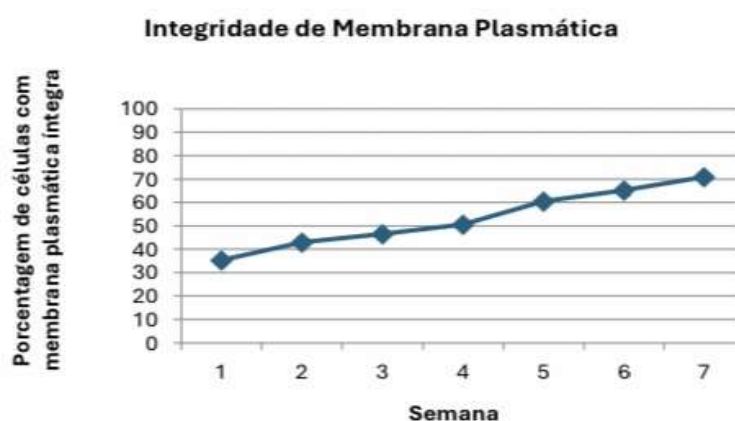


Gráfico 4. Porcentagem de células com membrana plasmática íntegra ao longo das semanas de tratamento com soro ozonizado avaliada no momento pré-congelamento.

Os três parâmetros espermáticos citados apresentam intenso impacto na capacidade de fertilização do espermatozoide. A motilidade o deslocamento do espermatozoide através do trato reprodutivo feminino para atingir o óvulo. Já a membrana plasmática desempenha papéis quanto à proteção e estabilidade celular, além da interação com óvulo. Adiante disso, verifica-se a importância dos resultados obtidos com o ganhão quarto de milha durante o experimento.

3.3 CONCLUSÃO

O O_3 reage com PUFAS, antioxidantes como os ácidos ascórbico e úrico, compostos tiol com grupos -SH, como cisteína, glutathione reduzida (GSH) e albumina. Dependendo da dose de ozônio, carboidratos, enzimas, DNA e RNA também podem ser afetados (Bocci., 2006). Todos esses compostos atuam como doadores de elétrons e sofrem oxidação. A molécula ROS fundamental é o peróxido de hidrogênio, que é um oxidante não radical capaz de atuar como mensageiro do ozônio, responsável por desencadear diversos efeitos biológicos e terapêuticos (Bocci et al., 2011).

A partir do presente relato é possível pontuar os efeitos benéficos que a utilização da solução Ringer lactato ozonizada é capaz de trazer para conservação e, até mesmo, melhora nos parâmetros espermáticos pós colheita e refrigeração. Os efeitos com tal solução ozonizada não possui relatos anteriores até o presente momento, explorando uma nova técnica de auxílio à preservação do semên, campo de imensa importância ao setor de equideocultura e biotecnologia da reprodução equina.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio supervisionado obrigatório do curso de Medicina Veterinária na área de reprodução animal realizada Unesp campus de Botucatu no período de 01 de agosto a 30 de setembro e na empresa Garantia Pec no mês de outubro, foi fundamental, proporcionando prática e desenvolvimento para o futuro profissional.

No primeiro local de estágio, foi possível vivenciar todos os âmbitos da reprodução animal, abrangendo desde casos obstétricos, cirúrgicos e clínicos reprodutivos a aplicação de biotecnologias, tanto em animais de grande como pequeno porte. A intensa rotina foi imprescindível para criação de um raciocínio e agilidade na execução de procedimentos da área acompanhada.

O estágio na empresa de fertilização animal *in vitro*, Garantia Pec, foi uma enorme oportunidade para acompanhar e realizar procedimentos não desenvolvidos anteriormente. Foi possível adquirir conhecimento sobre uma biotecnologia da reprodução em crescimento no país e no mundo, com grandes vantagens no cenário agropecuário.

Esta etapa da graduação permite ao aluno vivenciar, em diferentes locais, novas perspectivas e desafios e com isso também desenvolver um senso crítico e capacidade de se ajustar a novos ambientes e dinâmicas, pontos essenciais para preparação ao mercado de trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AITKEN JR, LAMBOURNE S, GIBB Z. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of Sperm Physiology Oxidative Stress and the Functionality of Stallion Spermatozoa. J. **Equine Vet. Sci.** 2014; 34: 17–27
2. BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; CAIADO, J. R. C.; SOUZA, G. V.; SHIMOYA, A.. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n. 12, p. 2115-2119, 2008.
3. BOCCI V, ZANARDI L, TRAVAGLI V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. **Medical Gas Research** 2011; 1:1-6.
4. BOCCI VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of Medical Research** 2006;37(4):425-435.
5. CAMARGO, Carlos Eduardo. A arte de inseminar éguas com sêmen congelado. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 47, n. 2, p. 226-230, 2023.
6. FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: Saunders Company, p. 547-571, 1996.
7. FRITA M FLESCH, BAREND M GADELLA. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v 1469, ed 3, 2000.
8. GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R.J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v.91, p.1-10, 2014
9. KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**.v. 9, n. 2, p. 164-170, 2004.
10. LIMA, Roberto Arruda de Souza e ANDRÉ GALVÃO CINTRA,. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Brasília: MAPA, 2016.
11. LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 191-200, 2001.

12. LOOMIS, P.R; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, p. 480-491, 2005.
13. MELLO, Cely Marine. **Indução de Ovulação em Éguas**. 2006. 27f. Monografia (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu – São Paulo, 2006.
14. NORDBERG, J; ARNÉR, E.S.J.. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.
15. OLIVEIRA, T.; BUENO, V.; FINGER, I.; NUNES M. Efeito de diferentes temperaturas de descongelamento na motilidade progressiva de sêmen equino criopreservado. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.43, n.2, p.562, abr./jun.2019.
16. ORTEGA-FERRUSOLA, Cristina et al. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. **Animal reproduction science**, v. 114, n. 4, p. 393-403, 2009.
17. PAPA, F. O. et al. Inovações metodológicas na biotecnologia de refrigeração e congelação de sêmen equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. Suppl 1, p. 19-27, 2005.
18. PEREIRA, Raiza R. et al. Use low ozone dosages has positive effects on the cooling and cryopreservation of equine semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 108, p. 103800, 2022.
19. SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 20-26, 2015.
20. VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, v.12, p.779-796, 2006.
21. WILLIAMS, A. C.; FORD, W. C. L. Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1309-1316, 2004.