



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO**

# **DCA**

**1ª REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA DE 2020**

Data: 15 de Maio de 2020 (Sexta-feira)

Horário: 14h30min às 16h00min

Local: Reunião Virtual pelo Google Meet



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIARIDO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS – DCA

## CONVOCAÇÃO

O Chefe do **Departamento de Ciências Animais (DCA)** CONVOCA os professores e o representante estudantil, relacionados na lista anexa, a se fazerem presentes na **1ª Reunião Extraordinária de 2020 do DCA**, com data, local e horário, abaixo determinados, para cumprir a seguinte pauta:

1. Apreciação e deliberação sobre as justificativas de ausências enviadas ao email ([dca@ufersa.edu.br](mailto:dca@ufersa.edu.br));
2. Apreciação e aprovação de projetos de pesquisa cadastrados no SIGAA;
  - Obtenção, caracterização e conservação de espermatozoides de emas (Rhea americanas, Linnaeus, 1758) – *ALEXANDRE RODRIGUES SILVA*
  - APERFEIÇOAMENTO DO DILUENTE PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (Pecari tajacu LINNAEUS, 1758) POR MEIO DA INCORPORAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS, ANTIOXIDANTES E DETERGENTES. – *ALEXANDRE RODRIGUES SILVA*
  - AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES FORRAGEIRAS PARA REGIÕES SEMIÁRIDAS – *LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS*
3. Apreciação e deliberação sobre a minuta que trata da oferta opcional de componentes curriculares em Período Suplementar Excepcional em função do estado de emergência de saúde pública em virtude da COVID-19;

**Data: 15 de Maio de 2020 (Sexta-feira)**

**Local: Reunião Virtual pelo Google Meet**

**Horário: 14:30H às 16:00H**

Mossoró-RN, 14 de maio de 2020

**José Ernandes Rufino de Sousa**

*Chefe do Departamento de Ciências Animais (DCA)*

## RELAÇÃO DOS CONVOCADOS

	CONVOCADO	ASSINATURA
1	ALEXANDRE PAULA BRAGA	
2	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA	
3	ALEX AUGUSTO GONCALVES	AFASTAMENTO
4	ALEX MARTINS VARELA DE ARRUDA	
5	AMBROSIO PAULA BESSA JUNIOR	
6	ARACELY RAFAELLE FERNANDES RICARTE	
7	CARLOS CAMPOS CAMARA	
8	CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA	
9	DEBORA ANDREA EVANGELISTA FAÇANHA	
10	FELIPE DE AZEVEDO SILVA RIBEIRO	AFASTAMENTO
11	GENILSON FERNANDES DE QUEIROZ	
12	GUELSON BATISTA DA SILVA	
13	HUMBERTO GOMES HAZIN	
14	IVANILSON DE SOUZA MAIA	
15	JAEI SOARES BATISTA	
16	JEAN BERG ALVES DA SILVA	
17	JESANE ALVES DE LUCENA	
18	JOSE ERNANDES RUFINO DE SOUSA	
19	JOSEMIR DE SOUZA GONCALVES	
20	JULIANA FORTES VILARINHO BRAGA	
21	KÁTIA PERES GRAMACHO	
22	LERNER ARÉVALO PINEDO	
23	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS	
24	MARCELLE SANTANA DE ARAUJO	
25	MARCELO AUGUSTO BEZERRA	
26	MARCELO BARBOSA BEZERRA	
27	MAURÍCIO FRAGA VAN TILBURG	
28	MICHELLY FERNANDES DE MACEDO	
29	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	AFASTAMENTO
30	PATRICIA DE OLIVEIRA LIMA	
31	PEDRO CARLOS CUNHA MARTINS	
32	RAIMUNDO ALVES BARRETO JUNIOR	
33	RAQUEL LIMA SALGADO	
34	REGINA VALERIA DA CUNHA DIAS	
35	RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA	

<b>36</b>	ROGÉRIO TAYGRA VASCONCELOS FERNANDES	
<b>37</b>	STHENIA DOS SANTOS ALBANO AMORA	
<b>38</b>	VALDIR MARTINS DA FONSECA FILHO	
<b>39</b>	VALERIA VERAS DE PAULA	
<b>40</b>	WIRTON PEIXOTO COSTA	
<b>REPRESENTANTE DISCENTE</b>		
<b>1</b>	JOSIANY DE SOUZA CARNEIRO	



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO**  
Departamento de Ciências Animais  
**1ª Reunião Extraordinária de 2020**

1. Apreciação e deliberação sobre as justificativas de ausências enviadas ao email ([dca@ufersa.edu.br](mailto:dca@ufersa.edu.br));



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO**  
Departamento de Ciências Animais  
**1ª Reunião Extraordinária de 2020**

2. Apreciação e aprovação de projetos de pesquisa cadastrados no SIGAA;
- Obtenção, caracterização e conservação de espermatozoides de emas (Rhea americanas, Linnaeus, 1758) – *ALEXANDRE RODRIGUES SILVA*
  - APERFEIÇOAMENTO DO DILUENTE PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (Pecari tajacu LINNAEUS, 1758) POR MEIO DA INCORPORAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS, ANTIOXIDANTES E DETERGENTES. – *ALEXANDRE RODRIGUES SILVA*
  - AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES FORRAGEIRAS PARA REGIÕES SEMIÁRIDAS – *LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS*

**PORTAL DO DOCENTE > PROJETO DE PESQUISA****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Código:** PID20020-2020  
**Título:** Obtenção, caracterização e conservação de espermatozoides de emas (Rhea americanas, Linnaeus, 1758)  
**Tipo:** INTERNO (Projeto Novo)  
**Financiamento:** NÃO  
**Categoria:** Pesquisa científica  
**Situação:** AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE  
**Unidade:** DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)  
**Centro:** DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)  
**Palavra-Chave:** ema, espermatozoide, epidídimo, reprodução, biobanco  
**E-mail:** alexrs@ufersa.edu.br  
**Período do Projeto:** 01/07/2020 a 31/08/2023  
**Arquivo do Projeto:** [Visualizar arquivo](#)

**ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA**

**Grande Área de Conhecimento:** Ciências Agrárias  
**Área:** Medicina Veterinária  
**Sub-Área:** Reprodução Animal  
**Especialidade:** Inseminação Artificial Animal  
**Grupo de Pesquisa:**  
**Linha de Pesquisa:**

**CORPO DO PROJETO****Resumo**

As emas (Rhea americana) são aves nativas da América do Sul, que possuem grande importância ecológica na manutenção de ecossistemas. No entanto, apesar de seu papel primordial, Segundo a União Internacional para Conservação da Natureza as emas encontram-se globalmente quase ameaçadas. O declínio na população das emas tem como um dos principais causadores a caça pela pele e carne, visto que essa espécie também possui potencial econômico. Nesse contexto, pesquisar os aspectos reprodutivos e aplicar biotécnicas reprodutivas é de fundamental importância para auxiliar na conservação bem como na multiplicação das emas em cativeiro para fins comerciais. Dessa forma o objetivo da presente tese é estabelecer protocolos eficientes para a obtenção, avaliação e conservação de espermatozoides de emas, além disso, propõem-se caracterizar as mudanças esperáticas durante a maturação dos espermatozoides. Para tanto serão utilizadas emas provenientes do abate programado do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). No primeiro experimento espermatozoides serão obtidos por flutuação de diferentes seguimentos do complexo epidídimo-ducto deferente. As amostras serão processadas para as microscopias eletrônicas de varredura e transmissão afim de se caracterizar as mudanças que ocorrem durante a passagem do espermatozoide por essas estruturas. No segundo experimento os espermatozoides serão obtidos pelas técnicas de flutuação e lavagem retrógrada, para se comparar esses dois métodos de obtenção. Após a coleta serão validadas diferentes técnicas de avaliações esperáticas: CASA, teste hiposmótico, integridade da membrana plasmática, acrossoma e cromatina espermática, e atividade mitocondrial. No terceiro experimento os espermatozoides serão obtidos, pela melhor técnica testada no experimento 2, criopreservados em diferentes diluentes (TRIS, TES, ACP e OVODYL™) suplementados com 15% de gema de ovo de galinha e 6% de dimetilcetamida e avaliados conforme os testes validados também no experimento 2. Por fim, os dados coletados serão submetidos a análises estatísticas e em todos os casos será adotado nível de significância p<0,05. Com isso, espera-se descrever os espermatozoides de emas, estabelecer protocolos para avaliação e congelação de espermatozoides de emas.

**Introdução/Justificativa**

**(Incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)**

Do ponto de vista socioeconômico, as aves exercem papel fundamental como fonte de alimento saudável e rico em proteínas; sua carne tenra e nutritiva é considerada de baixo teor calórico e os ovos, energéticos e revigorantes, são apreciados em todos os meios, tanto rural como urbano (MALAVAZZI, 1999). Nesse contexto a criação de emas (rheicultura) no Brasil está aumentando tendo em vista sua carne e plumas de grande valor no mercado agropecuário (MOURA et al., 2012; CERVI et al., 2016). Além disso, possuem importância ecológica na manutenção da biodiversidade. No entanto, devido a caça, bem como a destruição e fragmentação de seu habitat, além da destruição de ovos por máquinas agrícolas, queimadas e predação, as emas (Rhea americana) estão quase globalmente ameaçadas (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016).

Para que as emas tenham mais destaque socioeconômico na avicultura brasileira bem como para garantir sua conservação, faz-se necessário investir em pesquisas que favoreçam o conhecimento das características peculiares desta espécie, incluindo os aspectos morfofisiológicos e biotecnologias relacionadas à sua reprodução (GÖES, 2004). Estudos envolvendo os aspectos reprodutivos das emas já foram relatados como por exemplo, a caracterização ultraestrutural da espermiogênese (PHILLIPS; ASA, 1989), a morfologia dos ovários (PARIZZI et al., 2007), a morfologia dos órgãos genitais masculinos e da cloaca (SANTOS et al., 2011), a obtenção de sêmen e a caracterização de alguns parâmetros esperáticos GÖES et al., 2010), sendo praticamente inexistente a aplicação de técnicas reprodutivas visando a conservação do seu material genético.

Nesse contexto, a criopreservação de espermatozoides aparece como uma valiosa ferramenta para a conservação de material genético de diversas espécies animais (COSTA; MARTINS, 2008), dentre as quais a ema. Assim, em inúmeras espécies de aves, protocolos de criopreservação de espermatozoides vêm sendo testados, mostrando resultados promissores (BLANCO et al., 2000; BLESBOIS et al., 2007; PEIXOTO, 2010; EHLING et al., 2012). Nas emas, não existem relatos de criopreservação de espermatozoides; no entanto, nos avestruzes, espécie mais próxima das emas (GIANNONI, 1996), Smith (2016) relatou a aplicação desta técnica, estabelecendo importantes parâmetros, como por exemplo, as curvas de congelação e descongelação utilizadas, que poderão ser extrapoladas e adaptadas para as emas.

Uma das primeiras etapas, no entanto, para a formação de um banco de germoplasma em emas consiste na obtenção dos espermatozoides. No geral, em aves, os espermatozoides destinados à criopreservação podem ser obtidos por meio da técnica de massagem digital, no entanto este método exige contenção física e condicionamento dos animais, o que pode lhes causar estresse (CARVALHO; FRENEAU; SANTOS, 2006). Em emas, já foram obtidas amostras de sêmen por esta técnica, no entanto muitos ejaculados obtidos não continham espermatozoides ou estavam contaminados dificultando as análises (GÖES et al., 2010). Uma alternativa também interessante à formação de bancos de recursos genéticos, consiste na obtenção de espermatozoides de animais que vieram subitamente a óbito. Em aves, entretanto, a aplicação desta possibilidade é ainda pouco usual. Um dos poucos relatos desta técnica foi reportado em codornas por Góis (2018), que obteve espermatozoides a partir dos ductos deferentes, uma vez que é este o local de armazenamento de espermatozoides em aves. O autor demonstrou então, ser possível a obtenção de espermatozoides viáveis (60%) e com motilidade (79,16±0,95%) (GÓIS, 2018). Por outro lado, em mamíferos, espermatozoides são correntemente obtidos do epidídimo de animais abatidos por meio dos métodos de flutuação e lavagem retrógrada (BEZERRA et al., 2014). Assim, é possível que a adaptação destas metodologias para a ema possibilite a recuperação de espermatozoides em todo o seu trânsito desde o epidídimo ao ducto deferente, fornecendo subsídios não só para sua armazenagem, mas também para a realização de análises que permitam compreender a maturação esperática nesta espécie.

Neste sentido, avaliar a qualidade das amostras esperáticas obtidas, além de permitir a compreensão de fenômenos fisiológicos, permite também a avaliação da eficiência de protocolos de conservação esperática. Em emas, Góes et al. (2010) reportaram a avaliação esperática no tocante aos parâmetros de volume do sêmen, concentração, motilidade e morfologia. No entanto, para aumentar a acurácia em predir o potencial fecundante de uma amostra esperática, outros testes complementares vêm sendo propostos para diferentes espécies. Dentre esses, podem ser citados a Análise Computadorizada de Sêmen (CASA), que fornece dados cinéticos dos espermatozoides (EHLING et al., 2012; SMITH et al., 2016), o teste hiposmótico que avalia a funcionalidade da membrana plasmática (SMITH et al., 2016), a avaliação da integridade da membrana plasmática, da cromatina, do acrossoma e o teste de função mitocondrial por meio de fluorescência (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009; PARTYKA et al., 2012; SMITH et al., 2016; GÓIS, 2018; PARTYKA et al., 2012).

Uma vez obtidos e submetidos à análise inicial, os espermatozoides devem ser processados em um meio diluente que lhes proporcione ação tamponante, nutrientes, substrato energético, estabilidade da membrana plasmática e manutenção da pressão osmótica (DONOGHUE et al., 2000). Em aves já foram descritos a utilização de diluentes para refrigeração e congelação de espermatozoides tais como o ácido N, N-bis (2-hidro-hidroxiethyl) -2-aminoetano sulfônico (BES), ácido N-Tris (hidroximetil) metil-2-aminoetano sulfônico (TES) (DONOGHUE et al., 2000), Água de Coco em pó (ACP) (RONDON et al., 2008; FREITAS et al., 2018), Beltsville Poultry Science Extender (BPSE) (BAKST; SEXTON, 1979; van der LAAN, 2007) e o OVODYL™ (MORRELL et al., 2005; CAVALCANTE, 2006; SLOWIN 'SKA et al., 2007; 2012; CIERESZKO et al., 2011).

Outro fator de suma importância para o sucesso da criopreservação de espermatozoides é a escolha dos crioprotetores e suas concentrações adequadas, capaz de reduzir os danos causados pelas baixas temperaturas (BONGALHADO, 2013). Essas substâncias são divididas em crioprotetores externos e internos dependendo do seu local de ação em relação a célula (van der LAAN, 2007). Alguns exemplos de crioprotetores externos já relatados em criopreservação de espermatozoides de aves são a gema de ovo de galinha (SANTIAGO-MORENO et al., 2012; ABOULEZZE et al., 2015) e a Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) (van der LAAN, 2007; SHAHVERDI et al., 2015). Quanto aos crioprotetores internos, já foram utilizados em aves o glicerol (WISHART, 1995), o etilenoglicol (EG) (KURBATOV et al., 1980), a dimetilformamida (DMF) (EHLING et al., 2012), o dimetilsulfóxido (DMSO) (SMITH, 2016), e a metilacetamida (MA) (EHLING et al., 2012; PARTYKA et al., 2012; SMITH, 2006). Assim, tendo em vista a importância das emas, justifica-se a realização deste estudo por possibilitar a compreensão de eventos relativos à sua maturação esperática no epidídimo e armazenagem no ducto deferente. Além disso, pretende-se obter informações relativas à aplicação de metodologias de obtenção de espermatozoides em animais abatidos e o desenvolvimento de um protocolo para a criopreservação de espermatozoide. Tais conhecimentos poderão auxiliar a conservação da espécie através da formação de bancos de germoplasma.

**Objetivos****Objetivo Geral**

- Estabelecer protocolos eficientes para a obtenção, avaliação e conservação de espermatozoides de emas (Rhea americana).

**Objetivos Específicos**

- Testar os métodos de obtenção de espermatozoides por flutuação e lavagem retrógrada do ducto deferente em emas.
- Caracterizar as mudanças estruturais que ocorrem durante a maturação do espermatozoide ao longo do seu trajeto no epidídimo e ducto deferente
- Caracterizar a morfometria do espermatozoide de emas.
- Testar e validar métodos adequados para avaliações de integridade e funcionalidade da membrana plasmática, atividade mitocondrial, morfologia, condensação de cromatina e integridade do acrossoma de espermatozoides de emas.
- Comparar os diluentes TRIS, TES, ACP e OVODYL™ na criopreservação dos espermatozoides de emas.

**Metodologia****Locais de execução e bioética**

Os animais utilizados serão provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS), da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). A obtenção dos espermatozoides a partir dos complexos epidídimo-ducto deferente, avaliações e refrigeração serão realizadas no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCSGA), o processamento das amostras para as microscopias eletrônicas será realizado no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada e as imagens serão obtidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFERSA. O projeto foi aprovado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEU-UFERSA) sob parecer 05/2020.

**Animais experimentais e manejo**

Para o experimento, serão utilizadas carcaças de animais que tenham vindo a óbito ou animais que tenham se acidentado sendo necessária a eutanásia. Estes animais deverão ser adultos em idade reprodutiva ± 2,0 anos de idade e com peso médio de 34,0 kg. A coleta dos complexos testículos-epidídimos ocorrerá durante a estação reprodutiva, entre os meses de maio ou junho e indo até novembro ou dezembro. Para cada fase experimental espera-se um "N" de pelo menos 5 animais.

**Desenho Experimental**

A presente tese será dividida em três experimentos:

- No primeiro experimento, os espermatozoides serão obtidos por flutuação de diferentes seguimentos do complexo epidídimo-ducto. As amostras serão processadas para as microscopias eletrônicas de varredura e transmissão afim de se caracterizar as mudanças que ocorrem durante a passagem do espermatozoide por essas

estruturas. Além disso, uma alíquota das amostras de espermatozoides será utilizada para a caracterização morfométrica através do software ImageJ®.

- No segundo experimento os espermatozoides serão obtidos pelas técnicas de flutuação e lavagem retrógrada, para se comparar esses dois métodos de coleta. Após a obtenção dos espermatozoides, serão validadas diferentes técnicas de avaliações espermáticas: CASA, teste hiposmótico, integridade da membrana plasmática, acrossoma e cromatina espermática, e, atividade mitocondrial.
- No terceiro experimento, os espermatozoides serão obtidos pela melhor técnica testada no experimento 2 e avaliados conforme os testes validados também no experimento 2. Posteriormente, as amostras serão criopreservadas testando-se os diluentes descritos na figura 4.

Obtenção dos espermatozoides

Os complexos testículo-epidídimo-ducto deferente esquerdo e direito serão dissecados e lavados externamente com solução fisiológica a 38°C. Para a obtenção de espermatozoides do primeiro experimento será utilizada a técnica de flutuação separadamente em diferentes seguimentos do complexo epidídimo-ducto deferente. Resumidamente, esses seguimentos serão fatiados com bisturi em uma placa de Petri contendo solução fisiológica a 38°C. Após 5 minutos em posição estática, os tecidos serão removidos e a suspensão será avaliada (CARY et al., 2004).

No segundo experimento, o ducto deferente será fatiado integralmente sem divisões. Para a lavagem retrógrada, resumidamente, serão realizadas ligaduras nas duas extremidades do ducto deferente, a fim de evitar o extravasamento dos espermatozoides. Na sequência, o segmento será mantido em posição vertical, a ligadura da extremidade inferior retraiada e será feita a injeção de solução fisiológica a 38°C no lúmen, com auxílio de uma seringa e agulha imediatamente abaixo da ligadura superior remanescente, fazendo com que os espermatozoides sejam carreados e recuperados na outra extremidade, sendo acondicionados em tubos apropriados (SILVA et al., 2011).

Morfometria Espermática

Esfregaços de rosa de Bengala serão preparado utilizando-se uma alíquota de 5 µL de espermatozoides que será incubada com 45 µL do corante Rosa de Bengala. Posteriormente, serão retirados 10 µL da amostra e depositados sobre uma lâmina que será coberta com uma lamínula e selada para posterior análises. Campos aleatórios da lâmina serão fotografados através a microscopia de luz conectada a software analisador de imagem. Cem células serão analisadas a partir das fotomicrografias medindo-se estruturas espermáticas como cabeça, peça intermediária e cauda separadamente por meio do software ImageJ® (SAYED et al., 2017).

Processamento e avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Para a análise da MEV, os espermatozoides serão fixados no reagente de Karnovsky (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) a 27 ° C. Após o período de fixação as amostras serão centrifugadas a 800 x g por 10 min, em seguida três lavagens de 5 min cada serão realizadas com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M. Posteriormente, os pellets formados serão desidratados e submetidos a banhos de acetona em concentrações crescentes (50, 70, 90 e 100%) por 10 minutos cada. Os pellets serão desfeitos e uma gota (300 µL) da suspensão será depositada em uma lamínula de vidro e seca ao ar. As lamínulas serão montadas em stubs com a ajuda de fita de carbono. Para metalização, os stubs serão colocados em um metalizador e metalizados com uma camada de ouro de 20 nm para posterior observação com um microscópio eletrônico de varredura (BEZERRA et al., 2018).

Processamento e avaliação por Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

Para a análise da MET, será utilizada a metodologia de Soares e Beletti et al (2006) com modificações, resumidamente, os espermatozoides serão fixados em glutaraldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação por 48 horas, as amostras serão centrifugadas a 800 x g por 10 min, em seguida lavadas em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2) duas vezes por 10 minutos e então, pós-fixados por quatro horas em glutaraldeído a 3% e uma hora em tetróxido de ósmio a 1% mais ferrocianeto de potássio a 1,25%. Finalmente, o pellet será incluído em resina Epon e posteriormente será cortado em ultramicrotomo para obtenção de cortes ultrafinos. Os cortes serão contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Por fim os cortes serão examinados em microscópio eletrônico.

Avaliações espermáticas

Após a coleta dos espermatozoides, será mensurado o volume recuperado utilizado pipetas e tubos graduados. Uma pequena alíquota da solução contendo espermatozoides será depositada sobre lâmina de vidro e levada ao microscópio de luz (100x, 400x), onde serão avaliados a motilidade espermática (0-100%) e o vigor (0-5). A concentração espermática será avaliada em câmara de Neubauer (SMITH, 2016).

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozoides, serão confeccionados esfregaços com o corante Rosa de Bengala. Onde serão analisadas 200 células espermáticas por lâminas sob microscopia de luz (100x), sendo classificadas em morfológicamente normais ou portadores de alterações subdivididas de acordo com a região espermática afetada (cabeça, peça intermediária, cauda) (GÓES, 2003)

Teste Hiposmótico

Alíquotas de sêmen (10µL) serão adicionadas a 90µL de várias soluções hiposmóticas e incubadas por 40 minutos a 37 ° C. Para tanto, serão utilizadas água destilada (0mOsm / L) e soluções de frutose (50, 100, 150 e 200mOsm / L). Após a incubação, as avaliações serão realizadas sob microscopia de contraste de fase (x1000). Um total de 200 espermatozoides serão contados em pelo menos cinco campos e classificados como reativos ou não reativos com base na presença ou ausência de caudas enroladas (inchadas), respectivamente. A porcentagem de espermatozoides com defeitos na cauda (com base na avaliação da morfologia espermática) será subtraída da porcentagem de espermatozoides reativos (SANTOS et al., 2013).

Flash Frozen

Para a validação das avaliações de integridade da membrana plasmática, acrossoma, cromatina e atividade mitocondrial será realizado o flash frozen. Resumidamente, as amostras serão divididas em duas alíquotas: uma mantida viável e a outra submetida à congelação rápida em nitrogênio líquido, seguida de descongelação lenta por três vezes consecutivas para causar injúrias à membrana celular (CELEGHINI, 2005). Três tratamentos serão feitos a partir destas alíquotas com as seguintes proporções de espermatozoides frescos e espermatozoides submetidos ao flash frozen: 100:0 (T100), 50:50 (T50) e 0:100 (T0).

Avaliação da integridade do acrossoma

Para avaliação acrossomal, amostras de espermatozoides serão fixadas em 0,5 mL de solução de paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente por 15 min e, em seguida, armazenadas a 4°C até serem processadas para coloração acrossomal. Os espermatozoides fixos serão então centrifugados por 8 min a 3000g e o sobrenadante descartado. Os pellets serão lavados duas vezes com 0,5 mL de acetato de amônio 0,1 M (pH 9,0) e o sedimento ressuspenso em aproximadamente 50 µL da solução de acetato de amônio. Uma alíquota desta suspensão será espalhada nas lâminas de microscópio e deixada secar à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas serão inundadas com coloração de Coomassie (Coomassie Blue G-250 a 0,22%; 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 40% de água desionizada) por 90 s (Larson e Miller 1999 ), lavada com água desionizada, seca à temperatura ambiente e preservada permanentemente, colocando uma lamínula sobre uma gota de meio de montagem. De cada amostra, 200 espermatozoides serão avaliados individualmente quanto à integridade acrossomal, utilizando microscopia de campo claro a 1000x. A integridade acrossômica será classificada como: (1) intacta (coloração escura uniforme sobre a região do acrossoma com coloração clara ou inexistente da região pós-acrossomal); (2) danificada (coloração não uniforme ou irregular sobre a região acrossomal); ou (3) não intacto (ausência total de coloração acrossomal ou coloração apenas no segmento equatorial; a região pós-acrossomal geralmente é levemente corada em azul) (THIANGTUM et al., 2006).

Avaliação da Condensação da Cromatina

Para a avaliação da integridade da cromatina serão confeccionados esfregaços utilizando-se 10µl das amostras que serão fixados em 3:1 etanol:ácido acético por 1 min e em etanol a 70% por 3 min, posteriormente, serão submetidos a imersão em solução 4M de HCl por 25 min, lavados em água destilada e secados a temperatura ambiente. Em seguida, 5µl de Azul de Toluidina serão depositados sobre o esfregaço, sendo coberto por uma lamínula e imediatamente avaliado em microscopia de campo claro, serão contadas 500 células e classificadas em negativos e positivos. Os espermatozoides levemente corados em azul claro serão considerados normais (negativos) e aqueles corados em azul escuro à violeta serão considerados com cromatina alterada (positivos).

Integridade da membrana plasmática e acrossomal, e atividade Mitocondrial por Fluorescência

A associação de sondas fluorescentes diacetato de 6-diacetato de carboxifluoresceína (0,46 mg C-FDA / 1 ml de dimetilsulfóxido) e iodeto de propídio (Solução salina 0,9% PI / 1 ml 0,5 mg) será testada para avaliação da membrana plasmática, para isso, alíquotas de sêmen (5 µL) serão diluída em 20 µL da solução fluorescente e mantidas em ambiente escuro por dez minutos. Em seguida, serão preparadas lâminas para microscopia recobertas com lamínula, as quais serão avaliadas em microscopia de epifluorescência (400x). Serão avaliadas 200 células, espermatozoides marcados em vermelho (IP) serão considerados sem membrana íntegra espermatozoides marcados em verde (-CFDA) serão considerados com membrana degenerada (SOUZA et al., 2013).

A associação das sondas fluorescentes Iodeto de Propídeo, Hoechst3342, FITC-PS e CMXros (Mito Tracker Red) será utilizada para avaliar simultaneamente a integridade de membrana plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial. Para tanto, serão colocados 150µl das amostras (25 x 106 spz/mL) em um microtubo, posteriormente será adicionado 2µL de Hoechst 33342 (40 µg/mL em DPBS) que serão incubar por 10 minutos a 37° C, em seguida serão adicionados 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS), 0,5 µL de CMXros (500 µM em DMSO) e 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS) e incubados por 8 minutos a 38,5° C. Em seguida, as lâminas para microscopia poderão ser preparadas, colocando uma alíquota sobre uma lâmina e recobrimo com lamínula. As avaliações serão realizadas em microscopia de epifluorescência (1000x). Serão avaliadas 200 células, espermatozoides marcados em vermelho (IP) serão considerados com membrana degenerada, espermatozoides marcados em azul (Hoechst) serão considerados com membranas íntegras, espermatozoides com acrossoma marcado em verde-amarelado serão considerados com acrossoma lesionado e espermatozoides com peças intermediárias marcadas em vermelho serão considerados com atividade mitocondrial (CELEGHINI et al., 2007).

Congelamento e descongelamento dos espermatozoides de emas

Para a congelação dos espermatozoides de emas, serão utilizadas como base, as metodologias propostas por Santiago-Moreno et al. (2012) e Smith et al. (2016) com algumas modificações. Dessa forma, inicialmente as amostras serão diluídas nos tratamentos conforme mostrado na figura 4. Serão resfriadas a uma taxa de 1°C/min até a temperatura final de 5°C. Posteriormente será adicionada a dimetilcetamida pré-resfriada de modo que a concentração final seja 6% e a concentração de espermatozoides seja de 100 milhões/ mL. As amostras então serão equilibradas por 15 min a 5°C, em seguida envasada nas palhetas, em seguida, congeladas uma taxa padronizada de 5 °C/min de 5 °C a -20 °C, nucleação a -20 °C e de -20 °C a -80 °C a uma taxa de 10 °C/minuto. Depois disso, as palhetas serão mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C. As palhetas serão então descongeladas após pelo menos uma semana por 1 minuto e 20 segundos a 5 ° C, posteriormente, as amostras serão transferidas para tubos em banho maria a 38° C e serão avaliadas conforme citado para o material fresco.

Análise Estatística

Todas as variáveis serão expressas como média e erro padrão, a análise de homocedasticidade será realizada pelo teste de Levene e a normalidade será verificada através do teste de Shapiro-Wilk e partir desta análise inicial, serão estabelecidos os testes estatísticos mais adequados para a comparação das médias.

## Referências

- ABOUELEZZ, F. M.; CASTANO, C.; TOLEDANO-DIAZ, T.; ESTESO, M. C.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; et al. Sperm-egg penetration assay assessment of the contraceptive effects of glycerol and egg yolk in rooster sperm diluents. *Theriogenology*, 83: 1541-1547, 2015.
- AGUIAR, L. M. S.; MAURO, R. A. *Ema - Rhea americana*. Fauna e Flora do Cerrado, 2004. Disponível em: < <http://www.cnpqg.embrapa.br/series/ema/Ema.ht m> >.
- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; MARTINEZ-PASTOR, F.; MARTINEZ, F.; CHAMORRO, C.; PAZ, P. Evaluation of three diferente extenders for use in emergency salvaging of epididymal spermatozoa from a cantabric brown bear. *Reprod Dom Anim*, 46: 85-90, 2011.
- AZEVEDO, C. S.; SILVA, M. C.; TEIXEIRA, T. P.; YOUNG, R. J.; GARCIA, Q. S.; RODRIGUES, M. Effect of passage through the gut of Greater Rheas on the germination of seeds of plants of cerrado and caatinga grasslands. *Emu*, 113: 177-182, 2013.
- BAKST, M. R. A microscopist's view of poultry reproductive tracts and gamete. *Brit. Poultry Sci.*, 72: 940-43, 1993.
- BAKST, M. R.; SEXTON, T. J. Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. *J Reprod Fert*, 55: 1-7, 1979.
- BENEZ S.M. *Avés: criação, clínica, teoria e prática*. Róbe, São Paulo, 1998.
- BEZERRA, J. A. B.; SILVA, A. M.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Influence of Recovery Method and Centrifugation on Epididymal Sperm from Collared Peccaries (Pecari tajacu Linnaeus, 1758). *Zoo Sci*, 31: 338-342, 2014.
- BHAT, G.; MAITI, B. R. Sex accessories morphology and during the seasonal testicular cycle of a subtropical wild avian species, the yellow-throat sparrow *Petronia xanthocollis*, Burton. *Biol. Rhythm Res.*, 31:41-49, 2000.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. *Rhea americana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22678073A92754472. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016.3.RLTS.T22678073A92754472.en>, 2016.
- BLANCO, J. M.; GEE, G.; WILDT, D. E.; TSELUTIN, K.; DONOGHUE, A. M. Semen cryopreservation in poultry and non-domestic species: A comparative approach to understanding the fundamentals of avian spermatozoa cryobiology, *British Poultry Science*, 41: 6-7, 2000.
- BLESBOIS, E. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*, 63, 213-222, 2007.
- BONGALHARDO, D. C. Production and preservation of rooster semen. *Rev Bras Reprod Anim*, 37: 131-135, 2013.
- BRUNING, D. E. Social structure and reproductive behavior in the greater rhea. *Living Bird*, 13: 251-294, 1974.
- BURROWS, W. H.; QUINN, J.P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16: 19-24, 1937.
- CARRER, C. C.; KORNFELD, M. E. A criação de avestruzes no Brasil. *Pirassununga, SP*, 304p, 1999.
- CARVALHO, S. F. M. Estudo de morfologia macroscópica, microscópica testicular e epididimária em emas (*Rhea americana*, Linnaeus – 1758) (RHEIDAE). Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor Ciência Animal junto a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2009.
- CARVALHO, S. F. M.; FRENEAU, G. E.; SANTOS, A. L. Q. Methods for semen collecting in ostrich (*Struthio camelus*, Linnaeus, 1758) and emu (*Dromaius novaehollandiae*, Linnaeus, 1758), and some quantitative and qualitative characteristics. *Biosci J*, 22: 159-168, 2006.
- CARY, J. A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K.; HAYNA, J. T.; DUOOS, L.; FAHNING, M. L. A. Comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. *Can Vet J* 41: 45-35, 2004.
- CAVALCANTE, A. K. S. Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006.
- CERVI, R. C.; CAFÉ, M. B.; CAVALLIERI, A. L. F.; ANDRADE, M. A. Physical, chemical and microbiological features in rattias eggs - A review. *Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ*,

3: 107-116, 2016.

CIERESZKO, A.; DIETRICH, G. J.; LISZEWSKA, E.; KRZYWIŃSKI, A.; KOBUS, A. Short-term storage and cryopreservation of black grouse and capercaillie semen. *European Journal of Wildlife Research*, Springer Verlag, 57: 383-388, 2010.

CODENOTTI, T. L.; BENINCA, D.; ALVAREZ, F. Etograma y relacion de la conducta con el habitat y con la edad en el fiandú. *Doñana, Acta Vertebrata*, Sevilla, 22: 65-86, 1995.

CODENOTTI, T. L.; ALVAREZ, F. Cooperative breeding between males in the Greater Rhea *Rhea americana*. *IBIS*, 139: 568-571, 1997.

CODENOTTI, T. L.; ALVAREZ, F. Mating behavior of the male greater rhea. *The Wilson Bulletin*, 113: 85-89, 2001.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; COGNIE, Y.; CHAI, N.; LEGENDRE, X.; MAUGE, R. Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology* 55: 649-659, 2001.

COSTA, P. M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. *Univ Ci Saúde*, 6(1):39-55, 2008.

DANI, S. A. *ema Rhea americana*. Belo Horizonte, FundaçãoAcangau, 136p, 1993.

De REVIERS, M. Transport, survie et pourvoir fecondant des spermatozoïdes chez les vertébrés. *Ins. Natl. Santie. Rech. Med.*, 26: 35-60, 1974.

DONOGHUE, A. M.; WISHART, G. J. Storage of poultry semen. *Anim Reprod Sci*, 62: 213-232, 2000.

EHLING, C.; TAYLOR, U.; BAULAIN, U.; WEIGEND, S.; HENNING, M.; RATH, D. Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Agriculture and Forestry Research*, 3 (62): 151-158, 2012.

FERNANDEZ, G. J.; REBOREDA, J. C. Male parental care in greater rheas (*Rhea americana*) in Argentina. *Auk: a journal of ornithology*, Lawrence, 120: 418-428, 2003.

FOOTE, R. Fertilizing ability of epididymal sperm from dead animals. *J Androl* 21: 355, 2000.

FREDIANI, M. H.; GUIDA, F. J. V.; SALGADO, P. A. B.; GONÇALVES, D. R.; BLANK, M. H.; NOVAES, G. A.; PEREIRA, R. J. G. Semen collection by electro-stimulation in a variety of bird orders. *Theriogenology*, 125:140-151, 2019.

FREITAS, B. K. M.; CRUZ, F. G. G.; RUFINO, J. P. F.; FEIJO, J. C.; MELO, R. D.; MELO, L. D. Powdered coconut water as preservant of semi-heavy cocks semen. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, 19: 216-222, 2018.

FROMAN, D. P.; KIRBY T. D. Reprodução em aves, p.207-242. In: Hafez E.S.E. (Ed.), *Reprodução Animal*. 7ª ed. Manole, São Paulo, 2004.

FRANZO, V. S.; VULCANI, V. A. S. Epidídimo e testículo de aves: Revisão literária. *PUBVET*, Londrina, V. 4, N. 21, Ed. 126, Art. 852, 2010.

GIANNONI, M. L. *Emas e Avestruzes - uma alternativa para o produtor rural*. Jaboticabal: FUNEP, 49, 1996.

GÓES, P. A. Características reprodutivas de emas machos (*Rhea americana*) criadas em cativeiro no Estado de São Paulo. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2004.

GÓES, P. A. A.; CAVALCANTE, A. K. S.; NICHU, M.; PEREZ, E. G. A.; BARNABE, R. C.; BARNABE, V. H. Reproductive Characteristics of Captive Greater Rhea (*Rhea americana*) Males Reared in the State of São Paulo, Brazil. *Braz J of Poultry Sci*, 2: 57-62, 2010.

GÓIS, R. C. S. Toxicidade reprodutiva da semente de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) em codorna (*Coturnix coturnix* japônica Linnaeus, 1758) macho: características seminais, estudo histopatológico e histomorfométrico do parênquima testicular. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semiárido, 2018.

GOPINGER, E.; BORELLI, A. S. F.; XAVIER, E. G.; BONGALHARDO, D. C.; DIONELLO, N. J. L.; ZANUSSO, J. T.; ROLL, V. F. B. Effect of flaxseed oil in the diet of male quail (*Coturnix coturnix coturnix*) on semen characteristics and biometric evaluation of testicles. *RPCV*, 107: 177-181, 2012.

GRUNDER, A. A.; PAWLUCZUK, F. A. Comparison of procedures for collecting semen from genders and insemination geese. *Poultry Science*, 70: 1975-1980, 1991.

GVARYAHU, G.; ROBINZON, B.; MELTZER, A.; PEREK, M.; SNAPIR, N. An improved method for obtained semen from Muscovy drakes and some its quantitative and qualitative characteristics. *Poultry Science*, 63: 548-553, 1984.

HEROLD, F. C.; AURICH, J. E.; GERBER, D. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed® and with TriladyITM but the addition of seminal plasma is detrimental. *Theriogenology*, 61: 715-724, 2004.

HICKS-ALLREDGE, K. D. *Ratite reproduction*. In: Tully TN, Shan SM. *Ratites: management, medicine and surgery*. Malabar: Krieger Publishing Company; 188p, 1996.

HOSKEN, F. M.; SILVEIRA, A. C. *Criação de Emas*. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, P362, 2003.

KOTŁOWSKA, M.; DIETRICH, G.; WOJTCZAK, M.; KAROL, H.; CIERESZKO, A. Effects of liquid storage on amidase activity, DNA fragmentation and motility of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, 67: 276-286, 2007.

KOZDROWSKI, R.; NIZ 'AN' SKI, W.; DUBIEL, A.; OLECH, W. Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected post-mortem for cryopreservation and artificial insemination: a pilot study. *Reprod Biol Endocrinol*, 9: 31, 2011.

KURBATOV, A. D.; NARUBINA, L.; IVANOV, B.G.; BUBLIAEVA, G. B.; MOSKALENKO, L. I.; Effect of ETG on cock sperm at temperatures above and below 08C. *Bull. VNIRG* 43: 15-20, 1980.

LAKE, P. E. Male genital organs, p.2-61 In: King A.S. & McLelland J. (Eds), *Form and Function in Birds*. Vol.2. Academic Press, London, 1981.

LEIDENS, D. Efeitos da exposição ao chumbo no sistema reprodutivo de *Chrysomus rufigapillus* (AVES: Icteridae). Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, 2013.

MACHADO, A.B.M.; G.A.B. FONSECA; R.B. MACHADO; L.M.S. AGUIAR & L.V. LINS. *Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais*. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, 605p, 1998.

MALAVAZZI, G. - *Avicultura: manual de práticas*. São Paulo: Nobel, 156p, 1999.

MALECKI, I. A.; MARTIN, G. B.; LINDSAY, D. R. Semen production by the male emu (*Dromaius novaehollandiae*). 1. Methods for semen collection. *Poultry Science*, 76: 615-621, 1997.

MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.; DELLAQUA, J. A.; MELO, C. M.; MAZIERO, R. R.; et al. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim Reprod Sci*, 127: 197-201, 2011.

MORRELL, J. M.; PERSSON, B.; TJELLSTROÖM, H.; LAESSKER, A.; NILSSON, H.; DANILOVA, M.; HOLMES P. V. Effect of Semen Extender and Density Gradient Centrifugation on the Motility and Fertility of Turkey Spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 40, 522-525, 2005.

PARTYKA, A.; ŁUKASZEWICZ, E.; NIZAN 'SKI, W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77: 1497-1504, 2012.

PEIXOTO, J. V. Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805). Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa - Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária, 2010.

PÉREZ-GARNELO, S. S.; GARDE, J.; PINTADO, B.; BÓRQUE, C.; TALAVERA, C.; DELCLAUX, M.; et al. Characteristics and in vitro fertilizing ability of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) frozen-thawed epididymal spermatozoa obtained 4 hours postmortem: A case report. *Zoo Biology* 23: 279-285, 2004.

PHILLIPS, D. M.; ASA, C. S. Development of Spermatozoa in the Rhea. *The Anatomical Record*, 223: 276-282, 1989.

RAUTENFELD, D. B. V. Mitteilungen zur kunstlichen besamung geschlechts und alterbestimmung beim straub (*Struthio camelus australis*). *Der praktische Tierarzt*, 5: 359-366, 1977.

SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESO, M. C.; VILLALVERDE-MORCILLO, S.; TOLEDANO-DIAZ, A.; CASTAÑO, C.; VELÁZQUEZ, R.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GOYA, A. L.; MARTÍNEZ, J. G. Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction Technologies. *Asian Journal of Andrology*, 18: 882-888, 2016.

SANTOS, T. C.; SOUSA, J. A.; OLIVEIRA, M. F.; SANTOS, J. M.; PARIZZI, R. C.; MIGLINO, M. A. Morfologia dos órgãos genitais masculinos e da cloaca da ema (*Rhea americana americana*). *Pesq Vet Bras*, 31(5):430-440, 2011.

SCHOMMER, M. K. *Rhea americana* (common rhea, gray rhea and greater rhea) University of Michigan: June, 1999. Disponível Internet via url: [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rhea\\_americana.htm](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rhea_americana.htm)

SETIOKO, A. R.; HETZEL, D. J. S. The effect of collecting method and housing system on semen production and fertility of Slabio drakes. *British Poultry Science*, 25: 167-172, 1984.

SHAHVERDI, A.; SHARAFI, M.; GOURABI, A.; YEKTA, A.; ESMAEILI, V.; SHARBATOGHLI, M.; JANZAMIN, E.; HAJNASROLLAHI, M.; MOSTAFAYI. F. Fertility and Flow Cytometric Evaluations of Frozen-thawed Rooster Semen in Cryopreservation Medium containing Low Density Lipoprotein. *Theriogenology*, 83: 78-85, 2015.

SICK, H. Ornitologia brasileira: uma introdução. Brasília: UNB, v. 1, 482p, 1985.

SICK, H. Ornitologia Brasileira. Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira, 862p, 1997.

SILVA, J. B. *Rheacultura-Criação de emas*: (manual prático) nutrição, reprodução, manejo e enfermidades. Guaíba: Agropecuária, 144p, 2001.

SILVA, M. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SANTOS, E. A. A.; CASTELO, T. S.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta agouti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology* 76: 1084-1089, 2011.

SŁOWIN 'SKA, M., LISZEWSKA, E.; DIETRICH, G. J.; CIERESZKO, A. Characterization of proacrosin/acrosin system after liquid storage and cryopreservation of turkey semen (*Meleagris gallopavo*). *Theriogenology* 78: 1065-1077, 2012.

SMITH, A. M. J. A protocol for liquid storage and cryopreservation of ostrich (*Struthio camelus*) semen. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctorate of philosophy in science of agriculture (Animal Sciences), in the Faculty of AgriSciences at Stellenbosch University, 2016.

SMITH, A. M. J.; BONATO, M.; DZAMA, K.; MALECKI, I. A.; CLOETE, S. W. P. Classification of ostrich sperm characteristics. *Anim Reprod Sci*, 168:138-150, 2016.

VAN DER LAAN, G. M. Criopreservação de sêmen de galos. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, 2007. WESTENDORF, M.; ALTIZIO, B. Ostrich, Emú and Rhea production. *Rutgers Cooperative Extension*, 2004. Disponível em: <http://www.rce.rutgers.edu/pubs/pdfs/fs886>.

MEMBROS DO PROJETO																	
CPF	Nome		Categoria		CH Dedicada						Função						
702.982.543-87	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA		DOCENTE		Não informada						Coordenador						
325.949.504-59	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA		DOCENTE		Não informada						Membro						
CRONOGRAMA DE ATIVIDADES																	
Atividade	2020					2021					2022						
	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov
<b>COLETA DE AMOSTRAS</b>																	
<b>CARACTERIZAÇÃO ESPERMÁTICA</b>																	
<b>CRIOPRESERVAÇÃO E ANÁLISE ESPERMÁTICA</b>																	
<b>ANÁLISE DE DADOS E REDAÇÃO DE RESUMOS E ARTIGOS</b>																	
AVALIAÇÕES DO PROJETO																	
HISTÓRICO DO PROJETO																	
Data	Situação					Usuário											
27/04/2020 17:32	CADASTRO EM ANDAMENTO					ALEXANDRE RODRIGUES SILVA ( <i>alexrs</i> )											
27/04/2020 17:46	CADASTRADO					ALEXANDRE RODRIGUES SILVA ( <i>alexrs</i> )											
27/04/2020 17:46	AGUARDANDO APROVAÇÃO CEUA					ALEXANDRE RODRIGUES SILVA ( <i>alexrs</i> )											
12/05/2020 14:08	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE					EMANUELLE FONTENELE RABELO ( <i>rabelo.ef</i> )											

#### Portal do Docente

**PORTAL DO DOCENTE > PROJETO DE PESQUISA****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Código:** PID20021-2020**Título:** APERFEIÇOAMENTO DO DILUENTE PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (Pecari tajacu LINNAEUS, 1758) POR MEIO DA INCORPORAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS, ANTIOXIDANTES E DETERGENTES.**Tipo:** INTERNO (Projeto Novo)**Financiamento:** NÃO**Categoria:** Pesquisa científica**Situação:** AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE**Unidade:** DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)**Centro:** DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)**Palavra-Chave:** Cateto; Antimicrobianos; Antioxidantes; Detergentes; Criopreservação**E-mail:** alexrs@ufersa.edu.br**Período do Projeto:** 01/07/2020 a 28/12/2021**Arquivo do Projeto:** [Visualizar arquivo](#)**ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA****Grande Área de Conhecimento:** Ciências Agrárias**Área:** Medicina Veterinária**Sub-Área:** Reprodução Animal**Especialidade:** Inseminação Artificial Animal**Grupo de Pesquisa:****Linha de Pesquisa:****CORPO DO PROJETO****Resumo**

No intuito de desenvolver estratégias para a conservação do germoplasma de catetos, têm sido estabelecidos estudos voltados para o aprimoramento do protocolo de criopreservação, sendo esta uma ferramenta muito importante para a formação de bancos de germoplasma. Diante disso, o presente estudo objetiva avaliar o efeito da adição de antimicrobianos, antioxidantes e detergentes no meio de congelamento de sêmen de catetos. Para tanto, serão utilizados 12 animais machos, sexualmente maduros com idade média de 40 meses, provenientes do Centro de multiplicação de animais silvestres (UFERSA-Mossoró/RN). Os animais serão inicialmente contidos com o auxílio de puçá, seguido de indução anestésica com o propofol (Propovan®, Cristália, Fortaleza, Brasil) a 5 mg/kg em bolus, via endovenosa. Posteriormente, os animais serão submetidos a um protocolo de eletroejaculação como já estabelecido para a espécie e as amostras serão coletadas em tubos plásticos graduados. As amostras serão analisadas quanto ao aspecto, coloração, volume, pH, concentração espermática, morfologia espermática, funcionalidade da membrana, estado de condensação da cromatina, atividade mitocondrial e viabilidade espermática, estresse oxidativo intracelular, teste de ligação à membrana perivitelina da gema do ovo de galinha e análise microbiológica do sêmen. Adicionalmente, os parâmetros cinéticos serão obtidos mediante a análise computadorizada de sêmen (CASA). As amostras serão diluídas em Tris-gema-glicerol e criopreservadas, utilizando-se as substâncias a serem testadas nas distintas fases experimentais. Na primeira fase, serão testados os antimicrobianos gentamicina a 70 µg/mL e a combinação penicilina/estreptomicina na concentração 100.000 UI/mL/1 mgE/mL de estreptomicina. Na segunda fase, serão testados os antioxidantes: superóxido dismutase – SOD (0, 150 ou 300 UI/mL), catalase – CAT (0, 200 ou 400 UI/mL) e sua combinação (SOD 150 UI/mL + CAT 200 UI/mL) durante a congelamento. Na última fase, será realizada a congelamento das amostras com o uso do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) em suas respectivas concentrações (0%, 0,1%, 0,3% e 0,5%), bem como um grupo controle positivo com o Equex a 0,5%. Os resultados serão expressos em média e erro padrão. As análises serão realizadas pelo software Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os dados obtidos serão avaliados quanto à sua normalidade e homocedasticidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A partir destes, serão estabelecidos os testes estatísticos mais adequados para a comparação das médias e identificação de diferenças entre os tratamentos, considerando-se a significância de P<0,05. Desta forma, espera-se identificar o antimicrobiano bem como o agente antioxidante e a concentração ideal do detergente SDS para a congelamento do sêmen de catetos, de modo a aumentar as taxas de células potencialmente viáveis e a longevidade espermática após a descongelamento.

**Introdução /Justificativa****(Incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)**

O cateto (Pecari tajacu LINNAEUS, 1758) é um taissuídeo silvestre cuja população é classificada como globalmente estável, porém encontra-se em declínio em alguns biomas, principalmente a Mata Atlântica. Assim, seu desaparecimento nos ecossistemas acarretaria uma grande perda ecológica, haja vista que os catetos atuam como dispersores de sementes e servem de presas para grandes carnívoros (Gongora et al., 2011). Aliado à sua importância ecológica, a espécie possui um estimado potencial produtivo, sendo bem adaptados ao cativeiro. Visto isso, vem sendo criados com propósito científico em pesquisas conservacionistas, visando o uso sustentável da espécie, bem como com o propósito econômico, devido à alta palatabilidade da sua carne e boa aceitação de sua pele no mercado internacional para fabricação de produtos de couro (Garcia et al., 2015). Além disso, tecnologias desenvolvidas para os catetos podem servir de modelos para espécies filogeneticamente próximas como o Tayassu pecari (Keuroghlian et al., 2013) e Catagonus wagneri (Altrichter et al., 2015), que são vulneráveis à extinção.

Nesse contexto, fica evidente o impacto positivo que o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas poderia trazer para a conservação e multiplicação da espécie. Dentre as biotécnicas, destaca-se a criopreservação de germoplasmas, em especial do sêmen, ferramenta importante para a formação de bancos genéticos (Domingues et al., 2011). A criopreservação de sêmen permite que o material genético de diferentes espécies e regiões sejam armazenados por um indefinido período de tempo a baixas temperaturas (Pegg, 2007). Neste sentido, desde 2010 (Castelo et al. 2010a) quando foi relatada o primeiro trabalho com criopreservação de sêmen em catetos, diversos estudos têm sido desenvolvidos no intuito de aprimorar o protocolo. Desta forma, foram já definidas diferentes etapas como o uso da suplementação energética ao meio diluente (Castelo et al., 2010a), as curvas de congelamento/descongelamento (Castelo et al., 2010a; Silva et al., 2013), e os crioprotetores em diferentes concentrações (Alves et al., 2013; Souza et al., 2015; Souza et al., 2016).

Estando definido um meio base capaz de promover a conservação em torno de 50% de espermatozoides móveis após a descongelamento, o próximo passo para a otimização do diluente seria a busca por aditivos que promovessem melhorias à qualidade espermática pós-descongelamento. Neste sentido, a incorporação de agentes antimicrobianos torna-se necessária visto que a maioria dos microrganismos resultantes do processamento do sêmen pode sobreviver a baixas temperaturas (- 196° C) (Bielanski; Vajta, 2009), causando danos às células espermáticas (Prieto-Martínez et al., 2014), ou contribuindo para a disseminação de doenças infecciosas através da inseminação artificial (Eaglesome; Garcia, 1997).

Em adição, o processo de criopreservação pode ocasionar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que quando em proporções equilibradas, estão envolvidas nos processos de capacitação espermática, hiperativação e reação acrossomal (O'Flaherty et al., 2006; Rao et al., 2015; Aitken et al., 2017). No entanto, acima do necessário, ocasionam efeitos negativos à membrana celular, motilidade espermática (Griveau; Lelannou, 1997). DNA e mitocôndrias (Aitken; Marshall, 2002). Sabe-se que existem mecanismos fisiológicos presentes no plasma seminal capazes de regular o excesso da produção de EROs. Porém, durante a criopreservação, tais mecanismos fisiológicos não costumam ser suficientemente eficientes para prevenir o dano espermático, fazendo-se importante o uso de antioxidantes de modo a permitir uma constância nos níveis de EROs no meio, mantendo a qualidade do sêmen pós-descongelamento (Halliwell; Gutteridge, 1999). Finalmente, é necessário relatar que um dos principais desafios observados na criopreservação do sêmen de catetos é o baixo período de sobrevivência espermática, no qual os seus parâmetros já são reduzidos aos 15 minutos pós-descongelamento (Campos et al., 2014). Neste sentido, seria justificada a avaliação de detergentes à base de dodecil sulfato de sódio (SDS), os quais são conhecidos por promover um aumento na longevidade espermática em outras espécies (Wu et al., 2013).

Em suma, este trabalho objetiva aprimorar o protocolo de criopreservação na espécie a partir da adição de antimicrobianos, antioxidantes e detergentes ao meio diluente de congelamento. Para melhor subsidiar a compreensão do assunto, segue-se revisão de literatura a respeito destas temáticas.

**Objetivos****OBJETIVO GERAL**

- Investigar a eficiência do uso de antimicrobianos, antioxidantes e detergentes como aditivos ao meio diluente de congelamento de sêmen de catetos (Pecari tajacu).

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Examinar a ação dos antimicrobianos: penicilina e estreptomicina (1000 UI e 1 mgE) e gentamicina (70 µg) sobre o crescimento bacteriano, qualidade seminal e potencial ligante das células espermáticas após o processo de congelamento-descongelamento do sêmen.

- Investigar a ação dos antioxidantes: superóxido dismutase (SOD) (0, 150 ou 300 UI/mL), catalase (CAT) (0, 200 ou 400 UI/mL) e sua combinação (150 UI/mL de SOD e 200 UI/mL de CAT) sobre os parâmetros espermáticos, estresse oxidativo e potencial ligante de espermatozoides de catetos durante após a descongelamento de sêmen;

- Identificar a concentração ideal do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) (0%, 0,1%, 0,3% e 0,5%) em comparação ao Equex STM® (Nova Chemical, Scituate, MA12) a 0,5% e sua ação sobre a longevidade espermática.

**Metodologia****LOCAL DO EXPERIMENTO**

As atividades experimentais serão realizadas conforme a autorização SISBIO n. 37329. Os protocolos experimentais serão submetidos à apreciação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFERSA. As coletas acontecerão no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) (5°100' S. 37°100' W) e as avaliações no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA), ambos situados na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em Mossoró/RN (50 12' 48" S de latitude, 370 18' 44" W de longitude e altitude de 37 m), cujo clima predominante é o semiárido. Os reagentes utilizados serão obtidos na Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), em caso contrário, serão citados no texto.

**ANIMAIS**

Para cada Fase Experimental, serão utilizados doze machos sexualmente maduros, com idade média de 40 meses, mantidos sob fotoperíodo natural. Os animais serão separados em grupos de três animais e mantidos em piquetes (20 m x 3 m), com área coberta (3 m x 3 m) sob fotoperíodo natural de 12 h. Os animais receberão alimentação comercial para suínos e frutas tropicais da estação, além de água à vontade.

**CONTENÇÃO E ELETROEJACULAÇÃO**

Previamente à coleta, os animais serão mantidos em jejum alimentar de 12 h. Desse modo, serão então contidos com o auxílio de um puçá, procedendo-se a indução anestésica com o propofol (Propovan®, Cristália, Fortaleza, Brasil) a 5 mg/kg em bolus, via endovenosa (Souza et al., 2009). No decorrer do procedimento, os animais terão seus parâmetros fisiológicos de temperatura, frequência cardíaca e respiratória constantemente monitorados.

Os animais serão dispostos em decúbito lateral, no qual será efetuada a higienização da região peniana utilizando solução fisiológica a 37° C. Após a limpeza, será feita a coleta por intermédio da aplicação do protocolo de eletroejaculação como já estabelecido anteriormente para a espécie (Castelo et al., 2010), através de um dispositivo portátil (Autojac®, Neovet, Campinas, SP, Brasil) conectado a uma fonte de 12 V, utilizando uma sonda transretal com 15 cm de comprimento e 1,3 cm de diâmetro, inserindo aproximadamente 12 cm no reto do animal. Os ejaculados serão coletados em tubos de plástico graduados e imediatamente avaliados.

**AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS**

Serão procedidas avaliações quanto ao aspecto, coloração, volume por meio de sucessivas pipetagens, bem como do pH através de tiras indicadoras de pH (Neutralit®,

Merck, Bucareste, Romênia) (Souza et al., 2009).

#### 1 Concentração espermática

Em seguida, os ejaculados serão avaliados microscopicamente quanto a concentração espermática (em milhões de espermatozoides/mL) a partir da contagem em câmara de Neubauer efetuando a diluição de alíquotas de 10 µL de sêmen (1:2) em 1 mL de solução formalizada tamponada (10%) (Silva et al., 2014).

#### 2 Morfologia espermática

A morfologia espermática será avaliada a partir de esfregaços de 5 µL de sêmen corados em 45 µL de rosa de bengala, contando 200 células por lâmina através da microscopia de luz (1000×) com auxílio do óleo de imersão e classificando-as quanto a presença de defeitos espermáticos (Sousa et al., 2013).

#### 3 Funcionalidade da membrana

Para a funcionalidade da membrana será utilizado o teste hipo-osmótico, no qual 5 µL de sêmen será incubado durante 40 minutos em 45 µL de água destilada (0 mOsm/L) para avaliar a respostasmática dos espermatozoides. Por tanto, serão contados 200 células, sob microscopia de luz, e aqueles espermatozoides apresentando caudas enroladas e edemaciadas serão consideradas como apresentando membrana funcional (%) (Santos et al., 2013).

#### 4 Análise do estado de condensação da cromatina

A análise do estado de condensação da cromatina decorrerá de esfregaços de sêmen fixados em etanol (3:1): ácido acético durante 1 min, seguida de etanol a 70% durante 3 min e solução de HCl 4 M durante 25 min. Posteriormente será feita a coloração em azul de toluidina (azul 0,025% toluidina em tampão McIlvaine (citrate de sódio: pH fosfato = 4,0), onde os espermatozoides corados de azul claro serão classificados como normais (negativos) e aqueles corados de violeta a azul escuro serão considerados como tendo cromatina alterada (positiva) (Beletti et al., 2004; Castelo et al., 2015).

#### 5 Atividade mitocondrial e viabilidade espermática

A atividade mitocondrial e viabilidade espermática serão avaliadas mediante a incubação do sêmen (10 µL) em 5 µL de Hoechst 342 (H342; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (998,4 µL de DPBS + 1,6 µL da solução estoque: 25 µg/mL) em banho seco a 37° C por 8 minutos. Em seguida, será acrescentado 5 µL de CMXRos (Mito Tracker red®, Molecular Probes, M-7512 ) (1 mL de TRIS + 0,1 µL da solução estoque: 50 µg/ 94 µL) e 3 µL de IP (Iodeto de Propídio, Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, USA) (980 µL de DPBS + 20 µL da solução estoque: 25 µg/mL) por mais 10 minutos, seguida da avaliação em microscópio de epifluorescência (Episcopic Fluorescent attachment EFA Halogen Lamp Set. Leica. Kista, Sweden) contando-se um total de 200 células, cujos espermatozoides com cabeça marcada em azul (H-342) serão julgados com membrana intacta e aqueles com cabeça total ou parcialmente marcada em vermelho (IP) serão ditos com membrana não intacta e com peça intermediária marcada em vermelho serão considerados com função mitocondrial (Sousa et al., 2013).

#### 6 Análise computadorizada do sêmen

Adicionalmente, será realizada a análise computadorizada de sêmen (CASA – IVOS 12.0, Hamilton-Thorne, Beverly, USA,) a fim de obter detalhes a respeito da cinética espermática. Quanto aos parâmetros analisados incluirão: número de células contadas, motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade média da trajetória (VAP; mm/s), velocidade linear progressiva (VSL; mm/s), velocidade curvilínea (VCL; mm/s), amplitude lateral da cabeça (ALH; mm), frequência de batimento cruzado (BCF; Hz), índice de progressão (STR; %) e índice de linearidade (LIN; %). Ainda a população total de espermatozoides será subdividida em quatro categorias: rápida, com VAP> VMV; médio, com (VLV <VAP <VMV); lento, com VAP < VLV; e estático, a proporção de células que não estarão se movendo (Souza et al., 2016).

#### 7 Teste de ligação a membrana perivitelina da gema do ovo de galinha

Para a análise da capacidade ligante das células espermáticas submetidas aos diferentes tratamentos, será utilizado o teste de ligação a membrana perivitelina da gema de ovo de galinha. Para isto, serão utilizados ovos de galinha frescos e não férteis, no qual as membranas serão obtidas mediante separação da gema e da clara e o excesso de clara será retirado em papel filtro com posterior separação das membranas. Após separação das membranas, estas serão lavadas sucessivas vezes em solução fisiológica a 37° C e submetidas a cortes de 1 cm<sup>2</sup> com o auxílio de uma cubeta de espectrofotômetro empregada como molde, no qual para cada tratamento serão destinadas duas membranas. Conjuntamente, será feita a diluição das amostras espermáticas (1:1) em solução de meio de incubação (114 mM NaCl; 3,1 mM KCl; 0,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM lactato de cálcio; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 10 µg/mL vermelho fenol; 1,4 mM cafeína; 2,0 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM HEPES; 6 mg/mL BSA; 5,5 mM glicose; 0,45 mM piruvato de sódio; 40 µg/mL sulfato de gentamicina; pH 7,4-7,8) (Campos et al., 2017), e posteriormente centrifugadas a 700 x g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante será descartado e o pellet re-diluído a fim de obter uma concentração final de 1 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL (Campos et al., 2017). Cada fragmento da membrana perivitelina será mantido em placa de 4 poços com 1 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL a 38,5° C por 20 min em banho-maria. Após a incubação, cada membrana será lavada em gotas de 100 µL de meio de incubação para a retirada dos espermatozoides não ligados à membrana. Por fim, as membranas serão estendidas sobre uma lâmina e recobertas com lamínula e avaliadas quanto ao número de espermatozoides ligados em seis campos distintos e aleatórios através da microscopia contraste de fase (ABM-200 Series Biological Microscope, China) (Campos et al., 2017).

#### CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE SÊMEN

Para a congelação, os ejaculados serão inicialmente diluídos em Tris adicionado de glicerol (3%) e gema de ovo (20%). Em cada fase do experimento o diluente base será adicionado de diferentes concentrações de antibióticos, antioxidantes ou detergentes, conforme citado posteriormente. As amostras serão então refrigeradas a 15° C durante 40 minutos em caixas isotérmicas e posteriormente estabilizadas a 5° C por mais 30 min em incubadora biológica (Quimis, Diadema, SP, Brazil). Em seguida será feito o envase em palhetas plásticas de 0,25 mL e finalmente as palhetas serão posicionadas em contato com o vapor do nitrogênio (5 cm) por 5 minutos e então acondicionadas em botijão criobiológico a – 196° C. Decorrido pelo menos 1 semana, as amostras serão descongeladas em banho maria a 37° C por 1 minuto conforme reportado anteriormente (Silva et al., 2013).

#### FASES DO EXPERIMENTO

##### 1ª fase: Adição dos antimicrobianos durante a congelação de sêmen

A princípio, uma alíquota de 100 µl de cada ejaculado será destinada para a análise da concentração bacteriana. Em seguida, as amostras de sêmen serão diluídas em Tris-gema (20%) e glicerol (3%), adicionado ou não dos antimicrobianos, constituindo os seguintes grupos: (A) Controle (sem antimicrobiano) (B) 70 µg/mL de gentamicina; (C) 1000 UI/ml de penicilina + 1 mg/EI/ml de estreptomicina (Santos et al., 2019) e posteriormente expostas a refrigeração, no qual seus parâmetros cinéticos serão novamente verificados e então realizada a congelação. Após pelo menos 1 semana, as amostras serão descongeladas e submetidas às mesma avaliações do sêmen fresco, incluindo a análise microbiológica.

Para a análise microbiológica do sêmen, será inoculada uma alíquota de 100 µl de cada amostra em 900 µl de solução salina estéril a 0,85%, obtendo-se a diluição 10-1, seguindo-se com uma diluição seriada até 10-5. Em seguida, alíquotas de 100 µl de cada diluição serão semeadas, com auxílio de uma alça de Drigalski, na superfície de placas de Petri contendo Plate Count Agar (Hi Media, Mumbai, Índia), todas em duplicata e incubadas em estufa bacteriológica (Fanem LTDA, São Paulo, Brasil) a 35 ± 1° C por 24 a 48 horas (Tortora, 2005). Após esse período as colônias serão contadas em cada placa e o número de microrganismos será expresso em Unidade Formadora de Colônia – UFC/ml multiplicado pelo inverso de cada diluição. As colônias com aspectos diferentes serão isoladas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Hi Media, Mumbai, Índia) e identificadas a partir de suas características macroscópicas, morfológicas e perfil bioquímico (Macfaddin, 2000).

##### 2ª fase: Adição de antioxidantes durante a congelação de sêmen

A segunda fase consistirá na congelação das amostras com os antioxidantes, constituindo-se dos passos de diluição em diluente Tris-gema (20%) e glicerol (3%), adicionado do melhor antimicrobiano definido na fase anterior. Nesta fase, será utilizado um grupo controle sem adição de antioxidantes, e grupos teste suplementados com superóxido dismutase (SOD) a 150 ou 300 UI/mL (Roca et al., 2005), catalase (CAT) a 200 ou 400 UI/mL (Roca et al., 2005) e ambos combinados (SOD: 150 UI /mL e CAT: 200 UI/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (Roca et al., 2005), bem como um grupo controle sem antioxidantes. Decorrido pelo menos uma semana, as amostras serão descongeladas e efetuadas as mesmas avaliações descritas para o sêmen a fresco.

Nesta fase, o sêmen fresco e descongelado será também avaliado quanto ao estresse oxidativo intracelular por meio da microscopia de fluorescência, utilizando-se o marcador 2', 7'-diclorofluoresceína (H2DCFDA) (Thermo Fisher Scientific, EUA). Desta forma, 2 µL de diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína (5 mM) serão adicionados a 1 mL de suspensão espermática, homogeneizados e incubados a 37° C durante 30 minutos na ausência de luz. Posteriormente, as amostras serão incubadas com 5 µL de IP por mais 10 minutos a 37° C no escuro e lavados três vezes em solução PBS. Por fim, serão analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51TF, Tokyo, Japan) a fim de determinar a porcentagem de espermatozoides viáveis com EROs intracelular, onde a intensidade de fluorescência das imagens serão quantificadas através do software ImageJ 1.45c (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) (Pang et al., 2016). A intensidade do sinal de fundo será subtraída dos valores obtidos para as imagens de tratamento. O grupo sem suplementação antioxidante (EOSAO) será avaliado como calibrador e o valor medido de cada micrografia de tratamento será dividido pela média do calibrador para gerar níveis de expressão relativos (unidades de fluorescência arbitrárias).

##### 3ª fase: Adição de detergente durante a congelação de sêmen

Na última fase, os ejaculados serão congelados mediante diluição em Tris-gema (20%), glicerol (3%), adicionados de antimicrobianos e antioxidantes conforme definidos nas fases anteriores. As amostras diluídas serão então distribuídas nos seguintes grupos: controle negativo sem detergente, controle positivo contendo 0,5% de Equex STM® (Nova Chemical, Scituate, MA12 – Bezerra et al. 2019), e os grupos teste suplementados com dodecil sulfato de sódio (SDS) nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 0,5%. Decorrido pelo menos uma semana, as amostras serão descongeladas e submetidas às mesmas avaliações do sêmen a fresco.

Neste experimento, para análise da sobrevivência espermática após a descongelação, as células serão submetidas também a um teste de termorresistência (TTR), no qual as amostras serão mantidas a 37° C e avaliadas quanto a viabilidade, atividade mitocondrial, funcionalidade da membrana e cinética espermática através do CASA nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 min, descartando aquelas que não se mostrarem móveis (Campos et al., 2014).

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados serão expressos em média e erro padrão. As análises serão realizadas pelo software Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os dados obtidos serão avaliados quanto à sua normalidade e homocedasticidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A partir destes, serão estabelecidos os testes estatísticos mais adequados para a comparação das médias e identificação de diferenças entre os tratamentos, considerando a significância de p<0,05.

#### Referências

- Althouse, G.C.; Kuster, C.E.; Clark, S.G.; Weisiger, R.M. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, v.53, p.1167–76, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00261-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00261-2)
- Althouse, G.C.; Lu, K.G. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.573–84, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.031>
- Althouse, G.C.; Plerdon, M.S.; Lu, K.G. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology*, v. 70, p.1317–1323, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.010>
- Althouse, G.C. Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod Domest Anim.*, v. 43,p. 374-378, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01187.x>
- Altrichter, M., Taber, A., Noss, A., Maffei, L. e Campos, J. 2015. *Catagonus wagneri* . Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN de 2015: e.T4015A72587993. 27 de julho de 2019<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T4015A72587993.en> .
- Alves, H. M.; Oliveira, I. R. S.; Castelo, T. S.; Lima, G. L.; Souza, A. L. P.; Moreira, M. A. P.; Paula, V. V.; Silva, A.R. Comparison of different glycerol and egg yolk concentrations added to tris-based extender for the collared peccaries (Tayassu tajacu) semen freezing. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 48, p. 506 - 511, 2013. <https://doi.org/10.1111/rda.12115>
- Anel, L.; Gomes-Alves, S.; Alvarez, M.; Borragan, S.; Anel, E.; Nicolas, M.; Martinez-Pastor, F.; Paz, P. Effect of basic factors of extender composition on post-thawing quality of brown bear electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, v.74, n.4, p.643 – 651, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.004>
- Anel-López, L.; García-Alvarez, O.; Parrilla, I.; Olmo, D.D.; Santos, M.R.F.; Soler, A.J.; Morales, A.M.; Ortiz, A.M.; Alkmin, D.V.; Tarantini, T.; Roca, J.; Martnez, E.A.; Vazquez, J.M.; Garde, J.J. The Effect of Oxidative Stress on Thawed Bulk-Sorted Red Deer Sperm. *Reprod Dom Anim*, v. 51, p.407-414, 2016. <https://doi.org/10.1111/rda.12694>
- Aurich, C.; Spergser, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.67, n.5, p. 912-918, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.004>
- Halliwel, B.; Gutteridge, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, v.219, n.1, p. 1-14, 1984. <https://doi.org/10.1042/bj2190001>

Bezerra, L. G. P.; Souza, A. L. P.; Silva, H. V. R.; Vasconcelos, F. R.; Moura, A. A. A.; Pereira, A. F.; Oliveira, M. F.; Silva, A. R. Ultrastructural description of fresh and frozen/thawed sperm derived from collared peccaries (Pecari tajacu Linnaeus, 1758). *Microscopy Research and Technique*, v. 81, p. 1301-1309, 2018.

Bezerra, L.G.P.; Souza, A. L.P.; Lago, A. E.A.; Campos, L.B.; Nunes, T.L.; Paula, V.V.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Addition of Equex STM to Extender Improves Post-Thawing Longevity of Collared Peccaries' Sperm. *Biopreservation And Biobanking*, v. 17, n. 2, p.143-147, 2019. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0096>

Bianchi, I.; Schaaf, S.; Corrêa, E. K.; Perondi, A.; Lucia, Jr. T.; Dechamps, J. C.; Corrêa, M. N. Importância do uso da inseminação artificial na prevenção da veiculação de patógenos através do sêmen suíno. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v. 30, n. 1/2, p. 72-77, 2006.

Bielanski, A.; Vajta, G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human Reproduction*, Canada, v. 24, n. 10, p.2457-2467, 2009. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep117>

Bilodeau, J.F.; Blanchette, S.; Cormier, N.; Sirard, 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. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00702-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00702-6)

Bing, F.C. Assaying the availability of iron. *J. Am. Diet Assoc.*, v.60, n.2, p. 114-122, 1972.

Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.*, v. 5, n.1, p. 9-19, 2012. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613

Brinsko, S.P.; Varner, D.D.; Love, C.C.; Hartman, D.L.; Blanchard, T.L.; Schumacher, J.; Hinrichs, K. Manual of Equine Reproduction. 3. ed. Texas: Mosby, 2011. 336 p.

Buranaamruak, K.; Tummaruk, P.; Singlor, J.; Rodriguez-Martinez, H.; Techakumphu, M. Effects of straw volume and Equex STM on boar sperm quality after cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.69-73, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00996.x>

Bussalieu, E.; Yeste, M.; Sepúlveda, L.; Torner, E.; Pinart, E.; Bonet, S. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic E. coli on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*, v.127, p.176-82, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.07.018>

Câmara, T.S.; Nunes, T.G.P.; Tonioli, R. Diluentes seminais para pequenos ruminantes. *Ciência Animal*, v. 28, n. 2, p.67-83, 2018.

Castelo, T. S.; Silva, A. M.; Bezerra, L. G. P.; Costa, C.Y.M.; Lago, A. E. A.; Bezerra, J. A. B.; Campos, L. B.; Praxedes, E. C. G.; Silva, A.R. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (Dasyprocta leporina). *Cryobiology*, v. 71, p. 442-447, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.09.005>

Castelo, T.S., Bezerra, F.S.B., Lima, G.L., Alves, H.M., Oliveira, I.R.S., Santos, E.A.A., Peixoto, G.C.X., Silva, A.R. 2010. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (Tayassu tajacu). *Cryobiology*, v. 61, p. 275-279. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.09.005>

Cerolini, S.; Maldjian, A.; Surai, P.; Noble, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, v.58, p.99-111, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(99\)00035-4](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(99)00035-4)

Chatterjee, S.; Gagnon, C. Production of Reactive Oxygen Species by Spermatozoa Undergoing Cooling, Freezing, and Thawing. *Molecular Reproduction And Development*, v. 59, p.451-458, 2001. <https://doi.org/10.1002/mrd.1052>

Cormier, N.; Sirard, M.A.; Beilley, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl.*, v. 18, n.4, p.461 - 468, 1997.

Costa, L. L. M.; Castelo, T. S.; Souza, A. L. P.; Lima, G. L.; Silva, A. R. Criopreservação de sêmen canino em diluente Tris adicionado de dodecil sulfato de sódio. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 37, n.1, p. 53-58, 2013.

De Lamirande, E.; Gagnon. C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biology Medicine*, v. 14, p.157 - 166, 1993. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90006-g](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90006-g)

Fraser, L.; Jasiewicz, E.; Kordan, W. Supplementation of different concentrations of Orvus Es Paste (OEP) to ostrich egg yolk lipoprotein extender improves post-thaw boar semen quality. *Polish Journal Of Veterinary Sciences*, Poland, v. 17, n. 2, p.225-230, 2014.

Gall, T.J.; Wilson, M.E.; Althouse, G.C. Quantification of bacteria in fractionated boar ejaculates. In: Swine Conference, 5, 1998, Minnesota. Proceedings. Minneapolis, Minnesota: The Conference, 1998. p.45. Resumo.

García, M.G.V., Sánchez, E.Q., Reyes, U.A., Vilchis, O.M., Mora, J.M.V., Blasio, A.L., Guadarrama, V.F. Urogenital system of collared peccary (Pecari Tajacu Chordata: Artiodactyla): an anatomical study. *Ciencia Ergo-sum*, v. 22, p. 54-62, 2015.

Gavriliouk, D.; Aitken, R.J. Damage to sperm DNA mediated by reactive oxygen species: its impact on human reproduction and the health trajectory of offspring. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.868, p.23-47, 2015. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18881-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18881-2_2)

Ghorbani, M.; Amir, I.; Khodadadi, I.; Fattahi, A.; Atabakhsh, M.; Tavilani, H. Influence of BHT inclusion on post-thaw attributes of human semen. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, v.61, p.57-61, 2015. <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.968267>

Ginsburg, I. O papel da bacteriólise na fisiopatologia da inflamação, infecção e sequelas pós-infecções. *APMIS*, v.110, p. 753 - 770, 2002.

Goldberg, A.M.; Argenti, L.E.; Faccin, J.E.; Linck, L.; Santi, M.; Bernardi, M.L.; Cardoso, M.R.I.; Wentz, I.; Bortolozzo, F.P. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Res vet Sci.*, v.95, p.362-367, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.06.022>

Gongora, J.; Reyna-Hurtado, R.; Beck, H.; Taber, A.; Altrichter, M.; Keuroghlian, A. 2011. Pecari tajacu. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T41777A10562361. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011.2.RLTS.T41777A10562361.en>. Downloaded on 13 August 2018.

Kelly, F.J.; Mudway, I.S. Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids*. v.25, p.375-396, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0024-x>

Keuroghlian, A., Desbiez, A., Reyna-Hurtado, R., Altrichter, M., Beck, H., Taber, A.; Fragoso, J.M.V 2013. Tayassu pecari . Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN 2013: e.T41778A44051115. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013.1.RLTS.T41778A44051115.en> . Baixado em 02 julho 2018.

Kuster, C.E.; Althouse, G.C. The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology*, v.85, p.21-26, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.049>

Macfaddin, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore: Lippincott William & Wilkins, 2000, 912p.

Madeira, E.M.; Goularte, K.L.; Pradié, J.; Mondadori, R.G.; Jr, T.L.; Bianchi, I.; Vieira, A.D.; Leite, F.R.L. The Use of Antibiotics in Cryopreservation of Ram Sperm. *International Journal Of Veterinary Medicine: Research & Reports*, v. 2014, p.1-7, 2014. <https://doi.org/10.5171/2014.154947>

Maes, D.; Nauwynck, H.; Rijsselaere, T.; Mateusen, B.; Vyt, P.; De Kruijff, A.; Van Soom, A. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology*, v. 70, n. 8, p. 1337-1345, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.018>

Maia, M.S.; Azevedo, H.C.; Bicudo, S.D.; Sousa, D.B.; Rodello, L. Efeito da adição do equex-STM ao diluente tris-gema na motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. *Acta Sci Vet.* v.33, p.311-2, 2008.

Maia, K.M.; Souza, A.L.P.; Praxedes, E.C.G.; Bezerra, L.G.P.; Silva, A. M.; Campos, L.B.; Moreira, S.S.J. ; Apolinario, C.A.C.; Souza-Junior, J.B.F.; Silva, A.R. Environmental Factors Related to a Semiarid Climate Influence the Freezability of Sperm from Collared Peccaries (Pecari tajacu Linnaeus, 1758). *Biopreservation and Biobanking*, v. 16, p. 186-190, 2018. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0124>

Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000. <https://doi.org/10.1021/np9904509>

Sousa, P. C.; Santos, E.A.A.; Souza, A.L.P.; Lima, G. L.; Barros, F. F. P. C.; Oliveira, M. F.; Silva, A.R. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (Pecari tajacu). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, p. 924-930, 2013. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2013000700014>

Souza, A.L.P.; Lima, G.L.; Peixoto, G.C.X.; Silva, A.M.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Use of Aloe vera-based extender for chilling and freezing collared peccary (Pecari tajacu) semen. *Theriogenology*, v. 85, p. 1432-1438, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.007>

Storey, B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int. J. Dev. Biol.*, v. 52, p. 427-37, 2008. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072522bs>

Tonioli, R.; Fiúza, R.F.; Jatahy, P.C.; Barros, D.Q.; Santos, B.S. Efeito do uso de diferentes antibióticos no controle bacteriano do ejaculado do varrão. *Ciência Animal*, v. 11, n. 1, p.33-38, 2001.

Tortora, G.R. *Microbiologia*. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. *Microbiologia*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 962 p.

Trzcinska, M.; Bryla, M. Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Polish Journal Of Veterinary Sciences*, v. 18, n. 3, p.473-480, 2015. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0062>

Trzcinska, M.; Bryla, M.; Gajda, B.; Gogol, P. Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology*, v. 83, p.307-313, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.045>

Ubeda, J.L.; Aulsejo, R.; Dahmani, Y.; Falceto, M.V.; Usan, A.; Malo, C.; Perez-Martinez, F.C. Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. *Theriogenology*, v.80, p.565-70, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.022>

Upreti, G.C.; Jensen, K.; Munday, R.; Duganzich, D.M.; Vishwanath, R.; Smith, J.F. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Animal Reproduction Science*, v. 51, p.275-287, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(98\)00082-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(98)00082-7)

Vyt, P.; Maes, D.; Dejonckheere, E.; Castryck, F.; Van Soom, A. Comparative study on five diferente commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim.*, v. 39, p. 8-12, 2004. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00468.x>

Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.*, v.60-61, p.481-492, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3)

Wu, T.U.; Cheng, F.P.; Chen, H.L.; Yang, C.H.; Tsai, M.Y.; Chang, M.H.; Wang, J.H.; Wu, J.T. The Combinatorial Effect of Different Equex STM Paste Concentrations, Cryoprotectants and the Straw-Freezing Methods on the Post-Thaw Boar Semen Quality. *Reproduction In Domestic Animals*, Taiwan, v. 48, n. 1, p.53-58, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02022.x>

Yamamoto, Y.; Omori, M. Antioxidative activity of egg yolk lipoproteins. *Biosci. Biothec. Biochem.*, v.58, p. 1711-1713, 1994. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.1711>

Yáñez, J.L.; Marco-Aguado, M.A.; Mateos, J. A.; Santolaria, P. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Animal Reproduction Science*, v. 122, n. 1-2, p.142-149, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.006>

Zhang, X.G.; Li, H.; Wang, L.; Hao, Y.Y.; Liang, G.D.; Ma, Y.H.; Yang, G.S.; HU, J.H. The effects of different levels of superoxide dismutase in Modena on boar semen quality during liquid preservation at 17°C. *Animal Science Journal*, v.88, p. 55-62, 2017. <https://doi.org/10.1111/asj.12574>

Zhu, Z.; Kawai, T.; Umehara, T.; Hoque, S.A.M.; Zengá, W.; Shimada, M. Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria. *Free Radical Biology And Medicine*, v. 141, p.159-171, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.018>

MEMBROS DO PROJETO			
CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada <b>Coodenador</b>
702.982.543-87	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA	DOCENTE	<b>Não informada</b> <b>Coodenador</b>
325.949.504-59	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	DOCENTE	<b>Não informada</b> Membro

Atividade	2020						2021											
	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Feb	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>																		
<b>COLETA DE AMOSTRAS</b>																		
<b>ANÁLISE DE AMOSTRAS</b>																		
<b>ANÁLISE DE RESULTADOS</b>																		
<b>CONFEÇÃO DE RESUMOS E ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>																		

AVALIAÇÕES DO PROJETO		
HISTÓRICO DO PROJETO		
Data	Situação	Usuário
28/04/2020 15:45	CADASTRO EM ANDAMENTO	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA ( <i>alexrs</i> )
28/04/2020 15:54	CADASTRADO	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA ( <i>alexrs</i> )
28/04/2020 15:54	AGUARDANDO APROVAÇÃO CEUA	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA ( <i>alexrs</i> )
12/05/2020 14:22	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	EMANUELLE FONTENELE RABELO ( <i>rabelo.ef</i> )

[Portal do Docente](#)

SIGAA | Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação - (84) 3317-8210 | Copyright © 2006-2020 - UFRSA  
- srv-sigaa01-prd.ufersa.edu.br - v3.13.27

**PORTAL DO DOCENTE > PROJETO DE PESQUISA****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Código:** PID20018-2020**Título:** AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES FORRAGEIRAS PARA REGIÕES SEMIÁRIDAS**Tipo:** INTERNO (Projeto Novo)**Financiamento:** NÃO**Categoria:** Pesquisa científica**Situação:** AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE**Unidade:** DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)**Centro:** DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)**Palavra-Chave:** GRAMÍNEAS, LEGUMINOSAS, NATIVAS, CULTIVADAS, FORRAGEM**E-mail:** liz@ufersa.edu.br**Período do Projeto:** 08/06/2020 a 31/12/2021**Arquivo do Projeto:** [Visualizar arquivo](#)**ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA****Grande Área de Conhecimento:** Ciências Agrárias**Área:** Zootecnia**Sub-Área:** Pastagem e Forragicultura**Especialidade:** Avaliação, Produção e Conservação de Forragens**Grupo de Pesquisa:****Linha de Pesquisa:****CORPO DO PROJETO****Resumo**

O estudo de espécies forrageiras nativas e cultivadas é de grande importância para os alunos das áreas de ciências Agrárias. Esta possibilidade de conhecer o máximo de espécies forrageiras, auxiliar o aluno em formação para melhor utilização destes recursos na alimentação animal, bem como no aprimoramento de suas atividades junto as consultorias e extensão. Baseado nesta percepção, o objetivo deste projeto é semear no setor de Forragicultura e Pastagem, espécies forrageiras, gramíneas e leguminosas, com potencial forrageiro, para serem utilizadas em aulas práticas e na avaliação de seu comportamento morfo-fisiológico e estrutural. Serão utilizados canteiros de alvenaria já construídos no setor de forragicultura, receberão tratamento de solo e preparação da área para recebimento das espécies. Conterá com a melhoria do sistema de irrigação e com o monitoramento dos alunos ligados ao projeto. As sementes serão adquiridas por empresas da área de sementes forrageiras, coleta em propriedades e de produtores particulares. As espécies serão implantadas na área e serão avaliadas algumas variáveis: produção de matéria seca (Kg MS/ha), altura, número de folhas e/ou ramos, valor nutritivo e morfogênese. As avaliações serão a cada quatro semanas. Serão implantados o máximo de espécies possíveis (gramíneas, Leguminosas e outras). Após coleta de dados os integrantes do projeto farão resumos e artigos que possibilitem a divulgação do trabalho com as espécies forrageiras no setor de forragicultura da UFERSA-RN

**Introdução/Justificativa****(Incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)**

As pastagens cultivadas vêm ocupando áreas cada vez maiores no Brasil, principalmente devido ao padrão de produção que se firmou nos últimos anos, exigindo cultivares mais produtivos e adaptados. Estima-se que dos 180 milhões de hectares de pastagens existentes no país, cerca de 100 milhões de hectares são de pastagens cultivadas (Dias-Filho, 2014).

A quase totalidade dos cultivares de plantas forrageiras tropicais foi obtido por processos de coleta e, ou introdução praticados por instituições de pesquisa. Entre essas espécies, os gêneros *Brachiaria* e *Panicum* apresentam maior importância. Cerca de 80% da área de pastagens cultivadas no Brasil utiliza cultivares desses gêneros (Fernandes et al., 2000). Segundo Valle et al. (2003), esses dois gêneros de plantas forrageiras dizem respeito a aproximadamente 85% das sementes comercializadas para implantação, recuperação ou renovação de pastagens. Porém, na região nordeste o gênero *Cenchrus* tem se destacado pela sua notável adaptação às condições do semi-árido (Dantas Neto et al., 2000). Dentre as leguminosas arbustivas a *Leucena leucocephala* é a mais estudada e é relativamente bem disseminada em todo o Brasil, tendo o seu uso se consolidado na formação de bancos de proteína. No semi-árido tem sido utilizada como componente do sistema CBL (caatinga, buffel, leucena,). Entre outras leguminosas o *Guandu* e *Gliricídia* também são utilizadas na dieta de ruminantes no Nordeste brasileiro. Nesse contexto, a perspectiva e a necessidade de aumentar a diversidade das pastagens passa pelo lançamento de novos cultivares, mas só esta medida não constitui solução eficaz. Nascimento Jr. et al. (2004) chamaram a atenção para o fato de já existir uma ampla gama de opções de espécies e cultivares de plantas forrageiras, sendo o problema, portanto, mais relacionado com a necessidade de melhor conhecimento das plantas forrageiras existentes e de seu potencial de uso nos diferentes ecossistemas.

O desenvolvimento, crescimento e senescência de folhas e perfilhos são os principais processos fisiológicos que determinam o fluxo de tecidos na planta e consequentemente sua capacidade de produção. A produtividade das gramíneas forrageiras está diretamente relacionada com sua capacidade de emitir folhas de meristemas remanescentes após a desfolhação, característica de extrema importância para o restabelecimento da área foliar e consequentemente para a persistência da planta forrageira na pastagem. Dessa forma, torna-se essencial que estudos de dinâmica de produção das gramíneas forrageiras por meio de avaliações de características morfogênicas, além daquelas de produção, sejam conduzidos a fim de gerar conhecimentos básicos para definição de estratégias ideais de manejo. Estudos de características morfogênicas, estruturais e produtivas de plantas forrageiras tem sido bastante difundidos no Brasil e os resultados dessas pesquisas muito tem auxiliado na condução do manejo adequado das forrageiras, principalmente para os ecossistemas do Brasil Central. Considerando-se as peculiaridades do Estado do Rio Grande do Norte, torna-se essencial a avaliação de forrageiras que possam ser utilizadas em sistemas de produção animal, a fim de se identificar aquelas mais adaptadas e com máximo potencial produtivo para a região em estudo.

Nesse sentido, avaliações ecofisiológicas, via morfogênese e estrutura do pasto , estudo morfo-anatômicos e nutricional, assim como de produção de forragem serão de suma importância para identificação de cultivares adaptados, definição de práticas de manejo eficientes tanto para produtividade e caracterização quanto para sustentabilidade dos sistemas de produção animal na região de Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte.

Este projeto tem como meta: Identificar espécies Nativas e Cultivadas adaptados às condições edafoclimáticas da região de Mossoró, bem como outras espécies que estejam alocadas no setor de produção de alimento forrageiro da UFERSA e/ou regiões próximas. Caracterizar o padrão de crescimento, via fluxo de tecidos, das gramíneas e leguminosas forrageiras na região de Mossoró. Selecionar materiais promissores para utilização em futuros experimentos. Reestruturar o campo agrostológico da UFERSA que retornará a ser utilizado para aulas práticas da disciplina de forragicultura. Incluir a participação de alunos na condução do experimento para que possam adquirir conhecimento prático e científico na área de forragicultura e pastagem, bem como incentivá-los à pesquisa. Criar e consolidar um grupo de pesquisa em forragicultura e pastagem na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, fortalecendo o Programa de Mestrado em Produção Animal (UFERN/UFERSA).

**Objetivos**

- Plantar e avaliar espécies forrageiras que consigam se adaptar as condições locais de semiárido;
- Avaliar aspectos agronômicos, morfogênicos e estruturais das espécies;
- Avaliar a qualidade das espécies forrageiras;
- Avaliar o consumo de algumas espécies na alimentação de ovinos e/ou bovinos;
- Implantar o maior número de espécies forrageiras, entre gramíneas e leguminosas, para conhecimento didático e científico na UFERSA. Disponibilizá-los para as disciplinas de Forragicultura e qualquer outra disciplina afim.

**Metodologia**

O experimento será conduzido na área física estruturada para produção de alimento forrageiro da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), em Mossoró, RN. Os capins utilizados serão das espécies variadas, adquiridas por empresas de sementes, produtores rurais e coletadas em propriedades particulares, bem como outras espécies que estejam alocadas no setor de produção de alimento forrageiro da UFERSA e/ou regiões próximas.

Serão implantados em canteiros no setor de forragem da UFERSA, de dimensionamento de 2 x 1,5 m.

As espécies serão semeadas em linhas contínuas, sendo que a densidade de semeadura considerará a recomendação para cada cultivar e o VC% (valor cultural) das sementes utilizadas. A profundidade da semeadura será entre 3 e 4 cm. O campo será mantido permanentemente livre de plantas daninhas e será realizado o controle de formigas durante todo o período de avaliação. Além de reestruturar e reavaliar algumas áreas já plantadas.

O experimento tem previsão de duração de 24 meses. Antes da implantação dos cultivares, serão retiradas amostras de solo (cinco para cada área de 432 m<sup>2</sup>) nas camadas de 0-10 e 0-20 cm de profundidade para verificar o grau de fertilidade. De posse dessas informações, serão realizadas as correções e adubações de acordo com as exigências nutricionais de cada gênero.

As plantas deverão ser cortadas (uniformização) 8 semanas após a emergência, data a partir da qual serão determinados os futuros cortes de avaliação a cada 4 semanas durante a época de maior precipitação. A altura de corte deverá ser de 15 à 20 cm. Essas alturas de corte deverão ser respeitadas durante todo o período de avaliação e espécies forrageira estudada.

Serão feitas medidas de altura do dossel (cm) determinada antes de cada corte utilizando-se uma régua graduada em centímetros, sendo medidos cinco pontos aleatórios por unidade experimental. A altura de cada ponto corresponderá à altura média do dossel em torno da régua. A altura no momento do corte também será tomada, para assegurar que a altura de corte pré-estabelecida seja cumprida.

O primeiro dado de forragem considerará o acúmulo de forragem entre a semeadura e o corte de uniformização. Após a eliminação das bordaduras a área útil será cortada e pesada no campo individualmente para estimativa do acúmulo de MS total. Será retirada uma sub-amostra (mínima de 500 gramas), que será pesada, para determinação do peso verde, e separação das frações lâmina foliar, colmos e material morto. Esses componentes serão levados à estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas. De posse da informação do peso seco de cada fração da amostra será estimada a percentagem de matéria seca (MS) e cálculos da percentagem de folhas, colmos e material morto e a relação folha:colmo. O acúmulo de MS total da parcela será determinado por estimativa. Características morfogênicas e estruturais, a partir de um ciclo de rebrotação serão marcados três perfilhos ao acaso, por parcela, para avaliação das características morfogênicas e estruturais do dossel durante o período de intervalo entre cortes. Os perfilhos serão identificados com fios coloridos e, para melhor visualização no campo, ao lado de cada perfilho, será fixada uma haste com etiquetas numeradas. As avaliações serão realizadas a cada 15 dias na época de menor precipitação e a cada 7 dias nas épocas de maior precipitação. Serão medidos, com auxílio de uma régua milimetrada, o comprimento de lâminas foliares e a altura da ligula da última folha expandida além de registrado o número de novas folhas surgidas em cada um dos perfilhos e em cada uma das datas de avaliação.

Os dados referentes a densidade populacional de perfilhos (DPP) serão obtidos por meio da contagem do número de perfilhos em uma área delimitada de cada parcela. Será utilizado um quadro de 0,5 m<sup>2</sup> (0,5 x 1,0 m). A escolha dos pontos de amostragem será realizada de forma a representar a condição média da parcela no momento da avaliação. Essas áreas serão mantidas fixas durante o período de avaliação, sendo alteradas somente quando as áreas deixarem de ser representativas da condição média. A contagem dos perfilhos será realizada após cada corte. Todos os dados serão convertidos para perfilhos/m<sup>2</sup>. Para avaliação de valor nutritivo, amostras de lâminas foliares, colmos e material morto obtidas após o corte e secas em estufa de ar forçado a 65°C, por 72 h, serão moídas em moimho, identificadas e submetidas a análise de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e digestibilidade "in vitro" da matéria orgânica (DIVMO). Para as análises das amostras da forragem será utilizado a espectrometria de reflectância do infra-vermelho próximo (NIRS - Embrapa Gado de Corte), de acordo com os procedimentos descritos por Marten et al. (1985). Caso não possa utilizar o NIRS, estaremos fazendo todas as análises possíveis no Laboratório de nutrição animal da UFERSA.

**Referências**

DANTAS NETO, J.; SILVA, J.F.A.S.; FURTADO, D.A. et al. Influência da precipitação e idade da planta na produção e composição química do capim-buffel. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 35, n. 9, p. 413-420, 2000.

DIAS-FILHO, M.B. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Embrapa. Documento Técnico 402. 2014.

FERNANDES, C.D.; VALÉRIO, J.R.; FERNANDES, A.T.F. Ameaças apresentadas pelo atual sistema de produção de sementes à agropecuária na transmissão de doenças e pragas. In: WORKSHOP SOBRE SEMENTES DE FORRAGEIRAS, 1., 1999, palestra: Embrapa Negócios Tecnológicos, 2000. p. 55-68.

NASCIMENTO JÚNIOR, D.; Da SILVA, S.C.; ADESE, B. Perspectivas futuras do uso de gramíneas em pastagem. In: Medeiros, S.P., et. Al, (Eds.) Simpósio sobre forrageiras e produção em pastagens, Embrapa Gado de Corte, 2004, p.130-141.

VALLE, C.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S.; BONATO, A.L.V. Lançamento de cultivares forrageiras: O processo e seus resultados - cvs. Massai, Pojuca, Campo Grande, Xaraés. In: ANAIS DO IV SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS. Lavras: UFLA. P. 179-226. 2003.  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br>. Consultado em 20 de junho de 2016.

#### MEMBROS DO PROJETO

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Função
287.366.478-96	ANGELA PATRICIA ALVES COELHO GRACINO	EXTERNO	4	Membro
664.726.364-00	GENILDO FONSECA PEREIRA	EXTERNO	4	Membro
898.828.143-87	JOSEMIR DE SOUZA GONCALVES	DOCENTE	4	Vice-Coordenador
765.177.804-91	PATRICIA DE OLIVEIRA LIMA	DOCENTE	4	Vice-Coordenador
025.448.374-70	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS	DOCENTE	8	Coordenador
918.849.343-15	FRANCYELLE GURGEL DE CASTRO ALVES	SERVIDOR	4	Membro
140.896.884-34	ALEXANDRE PAULA BRAGA	DOCENTE	4	Membro
050.194.674-80	CLARISSE PEREIRA BENEDITO	DOCENTE	2	Membro
076.579.243-57	NAYRA RACHEL NASCIMENTO LUZ	DISCENTE	4	Membro
087.711.354-80	IONARA DARCYA LIMA DA COSTA	DISCENTE	4	Membro
702.155.154-12	JANILSON OLEGARIO DE MELO FILHO	DISCENTE	4	Membro
700.040.024-23	ANTONIA GESSICA BEATRIZ DE ARAUJO NORONHA	DISCENTE	4	Membro
088.517.474-74	FRANCISCO DA COSTA RODRIGUES TERCEIRO	DISCENTE	4	Membro
057.038.533-46	ANDERSON ALVES COELHO	DISCENTE	4	Membro
101.146.444-62	WANDERSON LUCAS ALVES DOS SANTOS	DISCENTE	4	Membro
069.363.924-58	CARLOS ALBERTO QUEIROZ DE AQUINO	DISCENTE	4	Membro
050.393.573-54	RAIMUNDO MARCEL GOMES PRACIANO	DISCENTE	4	Membro
700.903.254-86	HUDSON YURI BARRETO DE OLIVEIRA	DISCENTE	4	Membro
110.130.984-98	ALINE CAVALCANTE FELIPE DA SILVA	DISCENTE	4	Membro
067.009.283-54	DANIELA LACERDA DA SILVA	DISCENTE	4	Membro
603.709.883-29	JOSIANY DE SOUSA CARNEIRO	DISCENTE	4	Membro
083.809.054-07	NATANAHEL VICTOR FERNANDES DOS SANTOS	DISCENTE	4	Membro

#### CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade	2020							2021											
	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
<b>PLANTIO E MANUTENÇÃO E COLETA DE SEMENTES DOS CANTEIROS</b>																			
<b>AVALIAÇÃO MORFOGÊNICA E AGRONÔMICA DAS ESPÉCIES FORRAGEIRAS</b>																			
<b>AVALIAÇÃO BROMATOLÓGICA DAS ESPÉCIES</b>																			
<b>REVISÃO DE LITERATURA E TABULAÇÃO DOS DADOS</b>																			
<b>ORGANIZAÇÃO DE ARTIGO E RESUMOS EXPANDIDOS</b>																			
<b>ELABORAÇÃO DE BANNERS E RELATÓRIO DOS EXPERIMENTOS COM AS ESPÉCIES FORRAGEIRAS</b>																			

#### AVALIAÇÕES DO PROJETO

#### HISTÓRICO DO PROJETO

Data	Situação	Usuário
09/09/2019 09:19	CADASTRADO	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS ( <i>liz</i> )
09/09/2019 09:19	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS ( <i>liz</i> )
25/09/2019 16:00	SUBMETIDO	IVANILSON DE SOUZA MAIA ( <i>ivanilson.maia</i> )
<b>Parecer (19/09/2019)</b> : PROJETO APROVADO NA 9ª REUNIÃO ORDINÁRIA DO DCA		
22/10/2019 08:15	RETORNADO PARA CORREÇÕES	NAELSON EXPEDITO ALVES DA SILVA ( <i>naeldson</i> )
<b>Parecer</b> : Não aprovamos projetos com captura de telas. Você pode utilizar as mesmas informações importantes do projeto que colocou no SIGAA, porém, coloque numa estrutura de projeto de pesquisa (pode utilizar nosso modelo disponível na página da PROPPG).		
04/11/2019 10:45	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS ( <i>liz</i> )
17/11/2019 21:38	SUBMETIDO	JOSE ERNANDES RUFINO DE SOUSA ( <i>ernandes25</i> )
<b>Parecer (14/11/2019)</b> : Aprovado.		
05/12/2019 09:41	RETORNADO PARA CORREÇÕES	KATIANE DANTAS SOARES ( <i>katiane</i> )
<b>Parecer</b> : Alterar vigência do projeto		
04/05/2020 12:56	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS ( <i>liz</i> )

#### Portal do Docente

SIGAA | Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação - (84) 3317-8210 | Copyright © 2006-2020 - UFRSA  
- srv-sigaa01-prd.ufersa.edu.br - v3.13.27



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO**  
Departamento de Ciências Animais  
**1ª Reunião Extraordinária de 2020**

3. Apreciação e deliberação sobre a minuta que trata da oferta opcional de componentes curriculares em Período Suplementar Excepcional em função do estado de emergência de saúde pública em virtude da COVID-19;



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**

**RESOLUÇÃO CONSEPE/UFERSA Nº XXX/XXXX, de XX de XXXXXXX de 2020.**

Dispõe sobre a oferta opcional de componentes curriculares em Período Suplementar Excepcional em função da pandemia de COVID-19, durante a suspensão emergencial do calendário acadêmico 2020.1 da graduação.

**Estabelece** a oferta opcional de componentes curriculares em Período Suplementar Excepcional em função da pandemia de COVID-19, durante a suspensão emergencial do calendário acadêmico 2020.1 da graduação.

O Presidente do CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO, no uso de suas atribuições legais e regimentais, com base na deliberação deste órgão colegiado em sua XXª Reunião Ordinária do ano de 2020, realizada no dia XXXXXXX.

**CONSIDERANDO** a necessidade de regulamentar os critérios para oferta e funcionamento de componentes curriculares durante a suspensão do calendário acadêmico 2020.1 da graduação no âmbito da UFERSA, nos termos da Decisão CONSEPE/UFERSA Nº 021/2020, de 17 de março de 2020;

**CONSIDERANDO** a Portaria **UFERSA/GAB** Nº 208 de 17 de março de 2020, que dispõe sobre as medidas a serem adotadas no âmbito da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – Ufersa, em virtude da necessidade de mitigar ameaças de propagação do COVID-19;

**CONSIDERANDO** a Declaração de Emergência em Saúde Pública de Importância Internacional pela Organização Mundial da Saúde, em 30 de janeiro de 2020, em decorrência de surto de novo Coronavírus (COVID-19);

**CONSIDERANDO** a Orientação Normativa **UFERSA/GAB** Nº 1 de 27 de abril de 2020, que estabelece orientações sobre o período letivo de que trata a Resolução **CONSUNI/UFERSA** Nº 012/2017;

**CONSIDERANDO** a Portaria Nº 188, de 3 de fevereiro de 2020, do Ministério da Saúde, que declara Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional em decorrência da Infecção Humana pelo novo Coronavírus (COVID-19);



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**

**CONSIDERANDO** a Portaria N° 356, de 11 de março de 2020, do Ministério da Saúde, que dispõe sobre a regulamentação e operacionalização do disposto na Lei N°. 13.979, de 6 de fevereiro de 2020, que estabelece as medidas para enfrentamento da emergência de saúde pública de importância internacional decorrente do Coronavírus (COVID-19);

**CONSIDERANDO** as Portarias N° 343 e N° 345 do Ministério de Educação, de 17 e 19 de março de 2020, que tratam da possibilidade de substituição das aulas presenciais excepcionalmente durante o período de pandemia do Coronavírus (COVID-19);

**CONSIDERANDO** a Portaria MEC n° 395, de 15 de abril de 2020, que prorroga o prazo previsto no § 1° do art. 1° da Portaria n° 343, de 17 de março de 2020;

**CONSIDERANDO** as Instruções Normativas N° 19, 20 e 21 do Ministério da Economia, de 12, 13 e 16 de março de 2020, respectivamente, que estabelecem orientações aos órgãos e entidades do Sistema de Pessoal Civil da Administração Pública Federal, quanto às medidas de proteção para enfrentamento da emergência de saúde pública de importância internacional decorrente do Coronavírus (COVID-19);

**CONSIDERANDO** o Decreto Estadual N° 29.668, de 04 de maio de 2020, que prorroga as medidas de saúde para o enfrentamento do novo Coronavírus (COVID-19) no âmbito do Estado do Rio Grande do Norte e dá outras providências;

**CONSIDERANDO** o Parecer CNE/CP N° 5/2020, aprovado em 28 de abril de 2020, que trata da reorganização do Calendário Escolar e da possibilidade de cômputo de atividades não presenciais para fins de cumprimento da carga horária mínima anual, em razão da Pandemia da COVID-19.

**CONSIDERANDO** a Medida Provisória N° 934, de 1° de abril de 2020, que estabelece normas excepcionais sobre o ano letivo da educação básica e do ensino superior decorrentes das medidas para enfrentamento da situação de emergência de saúde pública de que trata a Lei n° 13.979, de 06 de fevereiro de 2020.

**RESOLVE:**

**Art. 1°** Estabelecer a oferta opcional de componentes curriculares em Período Suplementar Excepcional em função da pandemia de COVID-19, durante a suspensão emergencial do calendário acadêmico 2020.1 da graduação.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO**  
**CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**

**Art. 2º** O Período Suplementar Excepcional consiste na oferta excepcional e opcional de componentes curriculares de forma não presencial enquanto durar a suspensão do calendário acadêmico 2020.1.

**Art. 3º** A oferta opcional de componentes curriculares será desenvolvida por meio de atividades pedagógicas não presenciais.

**Parágrafo único.** As Atividades Pedagógicas Não Presenciais constituem-se de um Plano/Programa Especial de Estudos Domiciliares disponibilizado aos discentes no SIGAA, podendo ou não ser mediadas por tecnologias e/ou plataformas virtuais de ensino e aprendizagem a critério do docente (Ambientes Virtuais de Aprendizagem - AVA, Moodle, redes sociais, e-mail, blogs, WhatsApp, Google Meet, etc.).

**Art. 4º** O cronograma e procedimentos para a oferta opcional de componentes curriculares durante o Período Suplementar Excepcional serão dispostos em edital publicado pela Pró-Reitoria de Graduação.

**Art. 5º** O Período Suplementar Excepcional será opcional e destinado aos(às) discentes matriculados em componentes curriculares no semestre 2020.1.

**Art. 6º** Os componentes curriculares terão duração de até 5 semanas ministrados em até 12h semanais.

**Parágrafo único.** Serão mantidas a ementa e a carga-horária dos componentes curriculares oferecidos em período regular, assim como respeitadas as exigências de pré-requisitos.

**Art. 7º** Os docentes que optarem por ofertar componente curricular em Período Suplementar Excepcional deverão efetuar a solicitação através da inscrição em edital conforme **Art. 4º**.

**§ 1º.** No ato da inscrição o docente deverá apresentar Plano de Ensino do Componente Curricular contendo no mínimo os seguintes itens.

- A. Quantidade de vagas;
- B. Os conteúdos a serem estudados em acordo com o PGCC vigente;



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**

- C. A metodologia a ser utilizada;
- D. As Atividades síncronas e assíncronas;
- E. Os critérios de exigência do cumprimento das tarefas;
- F. Prazos de execuções;
- G. Procedimentos avaliativos;
- H. Bibliografia Básica.

§ 2º. O Plano de Ensino do Componente Curricular deverá ser aprovado pelo Departamento ao qual o componente está vinculado.

**Art. 8º** A criação de turmas no Período Suplementar Excepcional será realizada pelas chefias de departamento, mediante solicitação do docente.

**Art. 9º** A aprovação e acompanhamento das Turmas de Período Suplementar Excepcional são de competência do Departamento ao qual a disciplina está vinculada, assegurando o cumprimento integral do Programa Geral do Componente Curricular;

**Art. 10.** A matrícula será realizada via Sistema Integrado de Gestão de Atividades Acadêmicas (SIGAA), conforme cronograma definido em edital.

**Art. 11.** Cada discente realizará matrícula em, no máximo, 02 (dois) componentes curriculares do tipo disciplina por Período Suplementar Excepcional.

§ 1º. O discente poderá optar pela matrícula em qualquer componente curricular ofertado no Período Suplementar Excepcional, ainda que esteja matriculado no mesmo componente curricular no semestre 2020.1.

§ 2º. Os discentes aprovados em componentes curriculares ofertados no Período Suplementar Excepcional, caso estejam matriculados neste mesmo componente no semestre 2020.1, terão esta última matrícula excluída de seu Histórico Escolar.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**

**Art. 12.** O preenchimento das vagas de Turmas de Período Suplementar Excepcional, durante a matrícula será efetuado mediante ordem decrescente do Índice de Eficiência Acadêmica - IEA.

**Art. 13.** O sistema de avaliação será dado conforme o estabelecido na RESOLUÇÃO CONSEPE/UFERSA N° 004/2018, de 13 de setembro de 2018, excetuando-se a exigência de 75% de registro de presença.

**Parágrafo Único.** O registro de frequência será vinculado à entrega de atividades definidas no Plano de Ensino.

**Art. 14.** Será permitido o trancamento de matrícula em disciplina oferecida em Turmas de Período Suplementar Excepcional conforme cronograma definido em edital citado no **Art.4º**.

**Art. 15.** A matrícula nos componentes curriculares do tipo atividades acadêmicas será realizada pelas coordenações de curso.

§1º A matrícula nas atividades do tipo Trabalho de Conclusão de Curso só poderá ser efetuada caso o discente tenha condições de defender durante o Período Suplementar Excepcional, devendo seguir os procedimentos estabelecidos na RESOLUÇÃO CONSEPE/UFERSA N° 003/2019, de 22 de setembro de 2019.

§2º Os componentes do tipo Atividades Complementares devem seguir os procedimentos da RESOLUÇÃO CONSEPE/UFERSA n° 01/2008, de 17 de abril de 2008.

**Art. 16.** O prazo para a consolidação das turmas será estabelecido em cronograma do edital conforme Art 4º.

**Art. 17.** A carga horária do componente curricular do Período Suplementar Excepcional será computada na carga horária docente e discente.

**Art. 18.** Os casos omissos nesta Resolução serão resolvidos e deliberados pelo CONSEPE.

**Art. 19.** Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO**  
**CONSELHO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**

Mossoró/RN, XX de XXXX de 2020

José de Arimatea de Matos

Presidente



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
CONSELHO UNIVERSITÁRIO

ANEXO I

Parecer sobre proposta de Ato Normativo do CONSEPE

<b>Relator</b>		<b>Manoel Quirino da Silva Júnior</b>
<b>Documento</b>	<b>MINUTA de RESOLUÇÃO CONSEPE que dispõe sobre a oferta opcional de componentes curriculares em Período Suplementar Excepcional em função da pandemia de COVID-19, durante a suspensão emergencial do calendário acadêmico 2020.1 da graduação.</b>	
<b>1. Relatório</b>		
<p>A Minuta de Resolução, em análise, dispõe sobre a oferta opcional de componentes curriculares em Período Suplementar Excepcional em função da pandemia de COVID-19, durante a suspensão emergencial do calendário acadêmico 2020.1 da graduação.</p> <p>A minuta é produto de cooperação da equipe da PROGRAD (setor pedagógico e DRE), sendo ouvidas as coordenações de curso, chefias de departamento, direções dos centros.</p> <p>A Minuta apresenta conformidade à resolução vigente, em destaque nos “CONSIDERANDOS”. A Minuta está bem embasada com terminologia adequadas especificidades da UFERSA.</p> <p>Como relator, proponho a aprovação do texto com alterações. As alterações são propostas em 03(três) emendas simples com uma pequena alteração Preâmbulo e incremento de mais dois “CONSIDERANDOS”, com intuito de promover um melhor entendimento da referida minuta.</p> <p>As emendas de alterações propostas estão inseridas no próprio texto para uma melhor visualização.</p>		
<b>2. Voto</b>		
	Aprovar texto da norma sem alterações	
<b>X</b>	Aprovar texto da norma com alterações	
	Não aprovar texto da norma	
<b>3. Emendas</b>		
<b>Emenda 01.</b> Proposta para Proposta para o Preâmbulo. Estabelece a oferta opcional de componentes curriculares em Período Suplementar Excepcional em função da pandemia de COVID-19, durante a suspensão emergencial do		



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
CONSELHO UNIVERSITÁRIO

calendário acadêmico 2020.1 da graduação.

**Emenda 02.** Proposta para acrescentar CONSIDERANDO.

**CONSIDERANDO** a Orientação Normativa UFERSA/GAB Nº 1 de 27 de abril de 2020, que estabelece orientações sobre o período letivo de que trata a Resolução CONSUNI/UFERSA Nº 012/2017,;

**Emenda 03.** Proposta para acrescentar CONSIDERANDO .

**CONSIDERANDO** a Medida Provisória Nº 934, de 1º de abril de 2020, que estabelece normas excepcionais sobre o ano letivo da educação básica e do ensino superior decorrentes das medidas para enfrentamento da situação de emergência de saúde pública de que trata a Lei nº 13.979, de 6 de fevereiro de 2020.

Mossoró, 07 de 05 de 2020.

Assinatura manuscrita em tinta preta, sobre uma linha horizontal.

**Manoel Quirino da Silva Júnior**

Conselheiro do CONSEPE