

Corumbá, MS
Dezembro, 2017

Sêmen Bovino Refrigerado e Aumento de Prenhez de Vacas de Corte Submetidas à IATF

Foto: Juliana Corrêa Borges Silva



Autores

Juliana Corrêa Borges Silva
Médica-veterinária, Dra.
Embrapa Pantanal

Márcio Ribeiro Silva
Médico-veterinário, Dr.
Melhore Animal Consultoria Ltda

Oswaldo Almeida Resende
Médico-veterinário, Dr.
Embrapa Agrobiologia

Deiler Costa Sampaio
Médico-veterinário, Dr.
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Erikliis Nogueira
Médico-veterinário, Dr.
Embrapa Pantanal

Urbano Gomes Pinto Abreu
Médico-veterinário, Dr.
Embrapa Pantanal

Luiz Orcirio Fialho de Oliveira
Agrônomo, Dr.
Embrapa Pantanal

Walvonvitis Baes Rodrigues
Médico-veterinário, Dr.
SENAR AR-MS

Roberto Sartori Filho
Médico-veterinário, Dr.
Escola Superior Agricultura
Luiz de Queiroz

Introdução

O uso da inseminação artificial (IA) em gado de corte tem aumentado nos últimos anos, devido ao desenvolvimento de protocolos que efetivamente sincronizam o desenvolvimento folicular e o momento da ovulação para permitir a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (LAMB et al., 2010; WILTBANK et al., 2010). Por essa razão, a utilização desta tecnologia é cada vez mais difundida em muitos países e em regiões de difícil manejo, como o Pantanal por exemplo, com taxas médias de prenhez cada vez mais satisfatórias.

No entanto, existem muitos fatores que influenciam os resultados da IATF, tais como: estrutura da fazenda (mangueiro, cerca, divisão de lotes), categoria animal (primíparas e múltiparas), escore de condição corporal, tamanho do lote, protocolo hormonal, inseminador e, especificamente sobre o que vamos discutir, a qualidade do sêmen.

O objetivo da criopreservação espermática é garantir a capacidade de fertilização indefinidamente. Embora o processo de congelamento tenha se tornado uma rotina na indústria de inseminação artificial (CHEN et al., 1993), um número considerável de espermatozoides não consegue sobreviver nesse processo (NAGY et al., 2004). Em geral, a criopreservação é responsável por uma diminuição de 50% na viabilidade dos espermatozoides (GRAVANCE et al., 1998; YOSHIDA, 2000), devido a várias alterações bioquímicas e estruturais das células espermáticas e consequente redução do número e qualidade dos espermatozoides (WATSON, 2000).

Embora existam inúmeras vantagens e aplicações, a criopreservação induz danos às células. Esse dano ocorre, principalmente, na membrana e é causado por alterações da temperatura a que a célula é submetida (curva de refrigeração e congelamento), além do processo de pós-descongelamento. Ou seja, em última análise, ocorre a diminuição da

viabilidade das células, principalmente porque a membrana espermática é submetida a rearranjos estruturais envolvendo lipídios e proteínas (HOLT, 2000).

O sêmen refrigerado não é submetido ao processo de congelamento e descongelamento e, portanto, sofre menos lesões, resultando em maior viabilidade e aumentando a capacidade de fertilizar. Essa abordagem permite reduzir o número de espermatozoides por dose, otimizando o uso de touros com alto mérito genético, especialmente em programas de IATF (VERBERCKMOES et al., 2005; BUCHER et al., 2009).

Estudos envolvendo sêmen refrigerado são comuns em algumas espécies, tais como equinos (LINDAHL et al., 2012), caninos (VERSTEGEN et al., 2005) e suínos (ZOU; YANG, 2000). No entanto, após a descoberta bem sucedida de glicerol para a criopreservação (POLGE et al., 1949), o sêmen bovino refrigerado raramente tem sido usado na maioria dos países, com algumas exceções, como a Nova Zelândia e Austrália. Atualmente, com o advento da IATF, o sêmen refrigerado de touro representa uma alternativa promissora para melhorar a eficiência reprodutiva em bovinos. Isso ocorre porque não há necessidade de detecção do estro e porque um grande número de fêmeas pode ser inseminado no mesmo dia, com agendamento prévio da coleta de sêmen do reprodutor desejado.

Um problema da IATF é que o momento exato de ovulação não é conhecido. Em outras palavras, há uma janela de tempo desconhecida entre inseminação e ovulação que pode diminuir a chance de fecundação quando um sêmen de qualidade inferior é utilizado. Consequentemente, espera-se que, quando se utiliza sêmen com viabilidade prolongada, como no caso do sêmen refrigerado, vacas ou novilhas acasaladas por IATF tenham melhores taxas de fertilidade. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a prenhez em vacas múltiparas submetidas à IATF, utilizando sêmen refrigerado, no primeiro experimento, e avaliar o diluidor, contendo ou não glicerol, no segundo experimento.

Material e métodos

Experimento 1

Touros e coleta de sêmen

Três touros Nelore (*Bos indicus*) (3 anos de idade) foram geneticamente avaliados em programas de melhoramento, nas mesmas condições, criados em pastagens com oferta adequada qualitativa e quantitativa das gramíneas forrageiras (que consiste em cerca de 40% *Brachiaria brizantha*, 50% *Panicum maximum* e 10% de outras gramíneas). Eles receberam suplemento mineral e água *ad libitum* e foram utilizados em rebanho comercial, ou seja, vieram de rebanho selecionado e depois foram submetidos a outra realidade. A mesma concentração espermática foi utilizada para ambos os tratamentos. Coletas de sêmen para criopreservação foram realizadas por meio de

eletroejaculação em uma central de sêmen. Posteriormente, os touros foram transportados para uma fazenda no Pantanal sul-mato-grossense e, após um período de adaptação de 20 dias, foram realizadas as coletas de sêmen para produzir as amostras de sêmen refrigerado. Após cada coleta na fazenda para refrigeração (intervalo de 2 dias entre coletas), o sêmen foi avaliado para ser utilizado dentro dos padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, ou seja, > 70% de espermatozoides morfológicamente normais e > 70% de motilidade (HENRY; NEVES, 1998). O sêmen foi mantido em banho de água a 35°C durante o período das avaliações e processos de diluição. Para produzir as doses de inseminação um total de 15 ejaculados (cinco ejaculados por touro) foi coletado de acordo com critérios mínimos de qualidade adotados.

Avaliação da qualidade do sêmen

Cada ejaculado foi avaliado, subjetivamente, pelo mesmo técnico para a motilidade progressiva (0-100%) após a coleta, diluição, congelamento-descongelamento e refrigeração, com microscópio de contraste de fase com aumento de 400x (Nikon Eclipse E200, Melville, NY, Estados Unidos). A concentração espermática foi determinada utilizando a câmara de Neubauer. A morfologia espermática foi avaliada em preparação úmida entre lâmina e lamínula (HANCOCK, 1957), e os espermatozoides foram contados sob um microscópio de contraste de fase com aumento de 1000x. Um total de 200 espermatozoides, por amostra, foi avaliado para calcular a porcentagem de defeitos espermáticos totais (BLOM, 1973).

A integridade da membrana plasmática foi avaliada após o descongelamento e refrigeração utilizando o teste hiposmótico (HO), (0,49 g de citrato de sódio e 0,9 g de frutose em 100 mL de água destilada, 100 mOsm / kg). Cem espermatozoides foram contados por microscopia de contraste de fase, com uma ampliação de 400x. Os resultados foram calculados utilizando a seguinte fórmula: HO (%) = inchaço% caudas após teste HO - % inchaço caudas antes do teste HO; (REVELL; MRODE, 1994). A longevidade espermática foi avaliada pelo teste de termorresistência lento (TT; incubação a 37 °C, durante 3 h) para ambos os tipos de processamento de sêmen (congelado/descongelado ou refrigerado; DIMITROPOULOS, 1967).

Processo de congelação e refrigeração

O sêmen foi diluído em temperatura ambiente (~ 27°C) a uma concentração final de 25×10^6 espermatozoides/0,25 mL por palheta e mantida a 4°C durante 5 horas. A curva de refrigeração foi de cerca de 0,55°C/min. Em seguida, as palhetas foram congeladas utilizando a máquina Digit Cool (IMV, modelo - 5300; IMV, L'Aigle Cedex, França), mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas até a avaliação. Para avaliação ou utilização pós-congelação, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 35°C durante 20 segundos.

Para o sêmen refrigerado, as palhetas foram mantidas em caixas de Botu-Tainer® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) a 5°C durante 24 horas, até a sua utilização, sem serem descongeladas em banho-maria, antes da IATF (Figura 1).

O meio diluidor utilizado foi o ácido cítrico (1,5 g / dL), Tris (2,42 g / dL), glicose (1,25 g / dL), gema de ovo (20 ml / dL), penicilina G sódica (1000 UI / mL), estreptomicina (1,000 mg / mL), glicerol (6 ml) e água destilada (100 mL). O mesmo diluidor, sem glicerol, foi usado para sêmen refrigerado, com mesma concentração espermática.

Foto: Juliana Corrêa Borges Silva



Figura 1A. Processamento no laboratório após colheita e avaliação para a diluição do sêmen refrigerado;

Foto: Juliana Corrêa Borges da Silva



Figura 1B. Sêmen envasado (palheta fina) mantido na caixa de transporte onde fazem a curva de refrigeração até o momento da utilização na IATF;

Foto: Juliana Corrêa Borges



Figura 1C. Retirada da palheta de sêmen que **NÃO** precisa ser descongelada e vai direto para a montagem do aplicador. Utilização de duas caixas de transporte para ter maior controle sobre a temperatura interna da caixa.

Protocolo de IATF

Vacas múltiparas Nelore (35 a 45 dias pós-parto, n = 838) foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação para serem inseminadas. As vacas foram tratadas com 2 mg de benzoato de estradiol (BE; RIC-BE®, im, Tecnopec-Agener União, São Paulo, Brasil) e um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) (Primer®, 1 g P4, Tecnopec-Agener União) em um dia aleatório do ciclo estral (dia 0). No dia 8, no momento da retirada do dispositivo P4, as vacas receberam 150 mg d-cloprostenol (Prolise®, im, Arsa SRL, Buenos Aires, Argentina), 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon 5000®, im, Intervet, International BV, Boxmeer, Holanda), e 1 mg BE. No dia 10, 44-48 horas após a retirada do dispositivo, as vacas foram inseminadas com sêmen descongelado (n = 408) ou refrigerado (n = 430). Os tratamentos (com mesma concentração espermática) e touros foram alternados a cada 10 IATFs. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal 40 dias após a IATF (DP 2200 VET®, Mindray, Mainland, China).

Experimento 2

Única alteração neste experimento foi o diluidor utilizado no processamento do sêmen refrigerado, sendo que vacas múltiparas nelore (35 a 45 dias pós-parto, n=346) foram inseminadas com diluidor contendo ou não glicerol, metade dos animais para cada tratamento.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada por modelo linear generalizado misto, utilizando o procedimento GLIMMIX /SAS (SAS, 1996), para avaliar a prenhez por IA. As variáveis incluídas no modelo para analisar a prenhez foram fazendas ($n = 2$), sêmen de cada touro (congelado/descongelado ou refrigerado), ($n = 3$), escore de condição corporal (ECC) de vacas no primeiro dia do protocolo de sincronização (escala de 1-5, onde 1 = magra e 5 = obesa) e interações. As variáveis em que os efeitos não foram significativos ($P > 0,05$) foram eliminadas do modelo. Percentagens de morfologia espermática, motilidade, viabilidade após termorresistência e hiposmótico foram avaliadas por análise de variância e testes de comparação de médias (teste de Tukey; $P < 0,05$). Os dados foram apresentados como a média $\pm$ SEM.

Resultados e discussão

Experimento 1

Sêmen refrigerado apresentou maior percentagem de células com membrana plasmática intacta, avaliados pelo teste HO e maior motilidade imediatamente após a refrigeração, bem como no final do TT, quando comparado com sêmen congelado-descongelado ($P < 0,05$; Figura 2). Apesar disso, os testes HO e TT não foram significativos no modelo para prenhez P/IA ($P = 0,17$ e $P = 0,81$, respectivamente) e, portanto, não foram capazes de prever os resultados de prenhez.

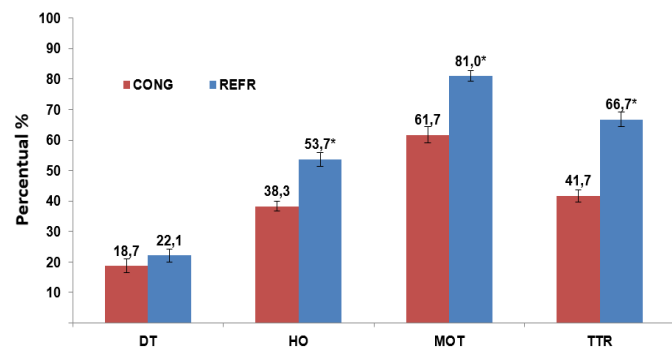


Figura 2. Percentual de defeitos totais (DT), células responsivas ao teste hiposmótico (HO), motilidade espermática (MOT) e motilidade espermática após teste de termorresistência lento (TTR) de acordo com o tipo de processamento de sêmen (congelado vs refrigerado). a e b para mesma característica indica diferença $P < 0,05$.

Percentagem de defeitos maiores (anormalidades da cabeça e peça intermediária, gotas citoplasmáticas proximais e anormalidades individuais presentes), defeitos menores (caudas dobradas, cabeças isoladas e gotas citoplasmáticas distais) e defeitos totais não diferiram entre os processos de congelamento/descongelamento e refrigeração do sêmen ($P > 0,10$). Os defeitos mais comuns foram acrossoma ($3,9\% \pm 2,11\%$, média $\pm$ SEM), cabeça isolada ($5,4\% \pm 2,18\%$), gota citoplasmática distal ($8,2\% \pm 4,95\%$), e

cauda dobrada ($2,0\% \pm 1,55\%$). Houve diferença na P/IA entre touros ($P < 0,05$).

O sêmen refrigerado aumentou P/IA em 10,5 pontos percentuais, quando comparado com sêmen descongelado, ou seja, houve um aumento relativo de ~ 20% em P/IA ($P < 0,005$; Figura 3).

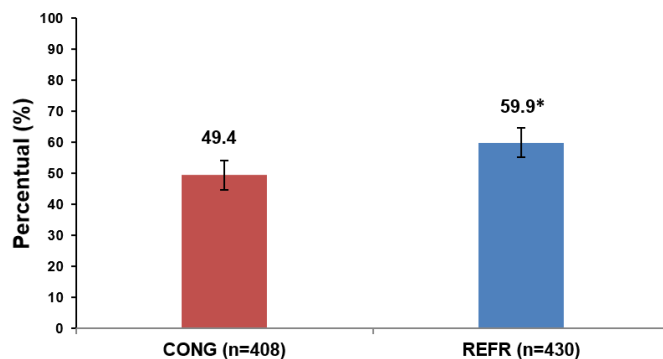


Figura 3. Percentual de prenhez de vacas Nelore multíparas (35 a 45 dias pós-parto) submetidas ao protocolo de IATF de acordo com o tipo de processamento de sêmen (congelado – CONG vs refrigerado – REFR) (* $P < 0,05$).

Houve efeito de ECC na P/IA ($P < 0,05$), ou seja, vacas mais magras tiveram menor P/IA que vacas com maiores ECC. No entanto, não houve interação entre ECC e tipo de tratamento do sêmen para P/IA ($P > 0,10$).

Experimento 2

Não houve diferença de prenhez por IA (P/IA) comparando o diluidor contendo ou não glicerol, respectivamente ($50,0 \pm 4,7$ vs. $53,0 \pm 5,0\%$; $P>0,05$, Figura 4).

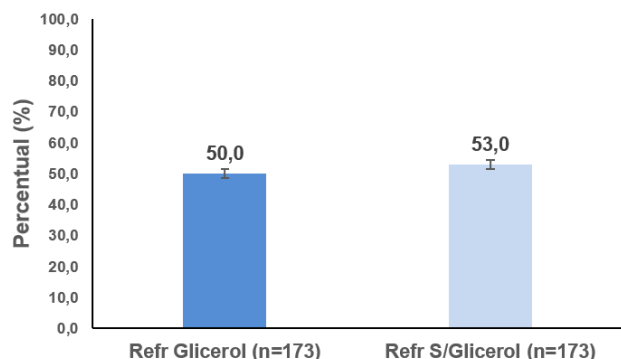


Figura 4. Prenhez de vacas Nelore múltiparas submetidas ao protocolo de IATF com sêmen refrigerado com e sem glicerol ($P>0,05$).

Não houve diferença na P/IA entre touros ($P=0,44$) e entre tratamentos (com e sem glicerol) no sêmen refrigerado quando avaliados a motilidade espermática ($81,7$ vs. $79,0\%$), teste de termorresistência lento ($68,1$ vs. $66,7\%$) e teste hiposmótico ($55,3$ vs. $53,7\%$), respectivamente ($P>0,05$; Figura 5).

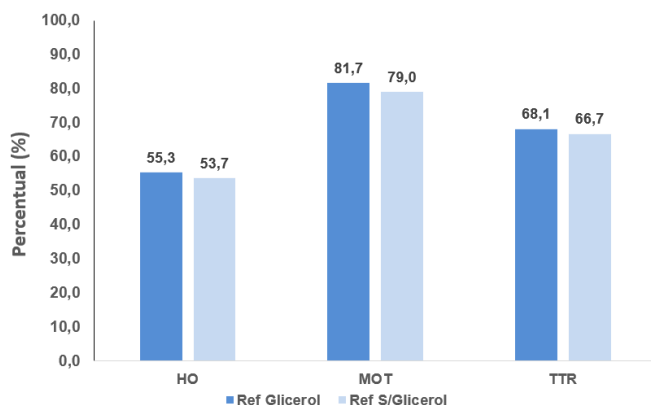


Figura 5. Percentual de células responsivas ao teste hiposmótico (HO), motilidade espermática (MOT) e teste de termorresistência lento (TTR) do sêmen refrigerado com e sem glicerol ($P>0,05$).

A suposição de que o uso de sêmen refrigerado melhora a fertilidade em bovinos em comparação com o uso de sêmen descongelado foi comprovada pelo aumento relativo de 20% na P/IA. Esse resultado demonstra que, embora o sêmen congelado possua vantagens em relação ao seu período de armazenamento e facilidade de logística, tem a desvantagem de causar danos às células e perda de espermatozoides viáveis durante a criopreservação.

O uso da mesma concentração (25×10^6 espermatozoides) e porcentagem de espermatozoides normais, seguido de uma redução na qualidade avaliada pela motilidade e outros testes (HO e TT) corrobora dados de vários estudos que relatam a perda da viabilidade espermática durante a criopreservação (PARKS; GRAHAM, 1992; VISHWANATH, 2003;

BAILEY et al., 2000; BLÄSSE et al., 2012). As principais causas relatadas da perda de viabilidade devido ao processo de congelamento foram lesões na membrana plasmática dos espermatozoides (HAMMERSTED et al., 1990; WATSON, 1995; BLÄSSE et al., 2012).

Atualmente, existem métodos sofisticados para avaliar a célula espermática, utilizando modernas tecnologias baseadas em fluorescência e citometria de fluxo (PETRUNKINA; HARRISON, 2013). No entanto, numerosos testes adicionais, de forma independente, ainda não são capazes de prever a fertilidade (também verificado nesse experimento), com exceção da taxa de prenhez. A fim de facilitar a avaliação espermática imediata no campo (touro na fazenda para o uso de sêmen refrigerado), utilizaram-se testes mais simples (HO e TT), ao invés de avaliações computadorizadas, testes de fluorescência e citometria de fluxo.

Esses exames complementares utilizados foram suficientes para provar nossa hipótese inicial, em que o processo de congelamento provoca mais danos do que o processo de refrigeração.

A curva de refrigeração (37 a 5°C) deve ser controlada, especialmente entre 19°C e 8°C , para não ocorrer o choque térmico (MORAN et al 1992; WATSON, 2000; CELEGHINI et al., 2008). Nesse intervalo de temperatura os lipídios da membrana estão em fase de transição do estado fluido para gel e, por isso, a temperatura e período de armazenamento de espermatozoides podem afetar as características de motilidade espermática (VERBERCKMOES et al., 2005; BLÄSSE et al., 2012), interferindo negativamente na prenhez. Processos associados com o envelhecimento celular e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) agravam a qualidade do sêmen (AITKEN, 1995).

A temperatura ideal para armazenagem do sêmen tem sido abordada por pesquisadores e depende do dano ao espermatozoide que ocorre devido ao choque pelo frio, taxa de crescimento microbiano, estresse oxidativo da membrana e manipulação do sêmen. Estudos têm demonstrado que a manutenção de uma temperatura entre 15°C e 20°C é eficaz na preservação do sêmen e características de fertilidade. Por outro lado, outros estudos reivindicam melhores resultados quando o armazenamento do sêmen ocorre entre 4°C e 5°C , porque reduz o metabolismo da célula, diminuindo assim a atividade do Na/K e a produção de ROS, e, consequentemente, reduzindo a atividade da AAO (aminoácido aromático enzima-oxidase), que é dependente da temperatura (VERBERCKMOES et al., 2005; MUNSI et al., 2007). Em nosso estudo, a temperatura de armazenamento foi realizada a 5°C , devido ao local do experimento ser em região quente e úmida - média no verão: 32°C e $76,8\%$ de umidade relativa (CORUMBÁ, 2017).

Após a ejaculação e durante o manuseio, o sêmen está exposto a vários fatores, especialmente o processo de peroxidação lipídica da membrana plasmática promovido pela ROS (FUNAHASHI; SANO, 2005; KANKOFER et al., 2005; BORGES, 2008). Os danos celulares podem ser minimizados pela adição de lipídios

(gema de ovo) ou lipoproteínas (leite) no diluidor (AMANN; GRAHAM, 1993) ou de antioxidantes (MUNSI et al., 2007; VERBERCKMOES et al., 2005; BORGES et al., 2011). Assim, se a viabilidade da célula é mantida durante períodos mais longos, otimizando o armazenamento, tempo e temperatura de transporte, a prenhez será satisfatória. No entanto, a maioria dos estudos que testam a composição dos diluidores e a viabilidade do sêmen bovino refrigerado foi realizada *in vitro* (VERBERCKMOES et al., 2005; MUNSI et al., 2007), e muito pouco *in vivo*.

A qualidade do sêmen refrigerado diminuiu com o tempo e manteve-se apropriada para utilização de até 48 horas, tal como avaliado pela motilidade e morfologia (CRESPILO et al., 2012), o que limita a sua utilização. No entanto, com o crescente uso de IATF, o sêmen refrigerado torna-se viável porque o tempo de colheita e momento da inseminação pode ser agendada, aproximadamente, em conjunto com a ovulação. Além disso, devemos considerar que é possível inseminar um grande número de animais no mesmo dia, o que permite o armazenamento por período mais curto e aumenta a utilização de um único ejaculado. Supondo que um ejaculado de touro possa render mais de 300 doses, em um único programa de IATF poderíamos usar sêmen refrigerado de apenas um touro geneticamente superior. Nesse caso, a preservação da viabilidade espermática durante pelo menos 24 horas seria suficiente para o transporte e utilização em fazendas longe de onde os touros são mantidos.

Como mencionado acima, em virtude dos protocolos de sincronização para IATF não permitirem um controle preciso do momento da ovulação, o processo de refrigeração, que comprovadamente causa menos danos às células, aumentou a sobrevivência do espermatozoide, aumentando a fertilidade e prenhez, como demonstrado neste estudo. Talvez, se o sêmen refrigerado fosse utilizado sob as mesmas condições que o sêmen congelado (mesma concentração) na IA convencional, onde se o cio for observado pela manhã a inseminação ocorrerá à tarde (Trimberger, 1948), ou seja, após a detecção do estro, o aumento da P/AI poderia não ser tão significativo. Isso ocorreria devido a um melhor controle do tempo da ovulação e condições menos desafiadoras para os espermatozoides.

Assim, nessas condições de IA convencional, o uso do sêmen refrigerado seria inviabilizado por dois motivos: primeiro por não compensar as limitações que o sêmen refrigerado possui em relação à logística; segundo, e principal motivo, pelo fato de ser impraticável depender da observação de cio, para então realizar o procedimento do sêmen refrigerado. Por isso, somente agora, com a massificação do uso da IATF, é que o retorno do uso do sêmen refrigerado torna-se possível e promissor.

Um estudo comparando o uso de sêmen refrigerado com a concentração de espermatozoides em 3×10^6 versus o uso de sêmen descongelado a uma dose de 20×10^6 espermatozoides por palheta, em um programa de IATF em bovinos de corte, descreveu taxas de prenhez semelhantes 51,5% vs 50,4%, respectivamente para

sêmen refrigerado e congelado (BUCHER et al., 2009). No entanto, os autores não avaliaram P/AI em vacas inseminadas com a mesma dose de sêmen para a comparação dos procedimentos de manipulação do sêmen (refrigerado vs congelado). Hoje em dia, sêmen refrigerado bovino não é comumente usado na maioria dos países. Por essa razão, este trabalho fornece contribuição científica, com grande número de animais, para estimular seu uso descrevendo as diferenças entre sêmen descongelado e refrigerado em qualidade espermática avaliada tanto *in vitro*, como *in vivo* (BORGES-SILVA et al., 2015). Outros autores corroboram nossos achados *in vivo* e observaram diferença ainda maior na prenhez para o sêmen refrigerado comparado ao congelado, respectivamente 68% versus 45,3%, onde 150 vacas Brahman foram inseminadas com dose inseminante de 20.10^6 espermatozoides (RESENDE; ALMEIDA, 2013) e 61,5% versus 45,7%, onde 349 vacas Nelore foram inseminadas com dose inseminante de 30.10^6 espermatozoides; (CRESPILO et al., 2012), ambos a 5°C por 24 horas.

Quanto ao uso de sêmen refrigerado, a composição de diluidores (MUNSI et al., 2007; VERBERCKMOES et al., 2005), concentração de espermatozoides (BUCHER et al., 2009), períodos de temperatura e armazenamento (SHANNON et al., 1984), diluição, variação individual, frequência de recolha e hora da IATF (BUCHER et al., 2009) são questões que merecem atenção e mais investigação.

No segundo experimento testamos o sêmen refrigerado contendo ou não glicerol 6% no diluidor TRIS - gema utilizada nos protocolos de IATF de bovinos de corte, sendo que, até o presente momento, é desconhecida a atuação do agente crioprotetor na célula espermática e, portanto, poderia ter efeito tóxico durante o período de refrigeração. Não observamos efeito deletério (BORGES-SILVA et al., 2016), nem efeito protetor como observado por Papa (2013), que verificou melhor preservação espermática das amostras mantidas sob refrigeração com crioprotetor glicerol 7% a 5°C/24horas, quando comparado com a amostra congelada.

Conclusões e Recomendações

Assim, em comparação com o sêmen congelado/descongelado, o sêmen refrigerado aumentou a prenhez por inseminação em vacas pós-parto Nelore multíparas, que foram submetidas a protocolo de IATF. O diluidor com glicerol pode ser utilizado para sêmen refrigerado sem interferir na prenhez, assim pode-se adotar diluidor comercial com 6% de glicerol para refrigeração de sêmen em protocolos de IATF.

As principais vantagens relacionadas ao sêmen refrigerado são o uso otimizado de touros, menor custo do sêmen e armazenamento, além de ser prático no momento de montagem do aplicador na IATF. Outra vantagem importante do sêmen refrigerado é a possibilidade de investir na compra de animais melhoradores (touros geneticamente superiores), maximizando sua utilização, além da possibilidade de uso de touros de interesse econômico, mas que não passariam no processo de criopreservação, seja por desempenho e/ou excesso de patologia espermática. O sêmen refrigerado é uma alternativa interessante para melhorar a eficiência reprodutiva em programas de IATF em gado de corte, com grande potencial de expansão.

Lembrete importante:

Não descongelar as palhetas, já que não houve processo de congelação. Assim, ao retirar a dose da caixa de armazenamento, monta-se imediatamente o aplicador (Figura 1C)!

Cuidado com a temperatura de armazenamento durante o processo de IATF. Para não ficar abrindo e fechando a mesma caixa (ou isopor), **recomenda-se trabalhar com duas caixas de transporte**, revesando-as a cada 10 doses retiradas (Figura 1C).

A **legislação** para o sêmen refrigerado é a mesma que para o sêmen congelado, ou seja, só é permitido que o proprietário do touro utilize esse sêmen em suas propriedades, não podendo ser comercializado, a menos que esse animal esteja em central de processamento de sêmen para prestação de serviço.

Referências

- AITKEN, R. Y. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p. 659-668, 1995.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoa functional. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.) **Equine reproduction**. 1.ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. p. 715-745.
- BAILEY, J. L.; BILAODEAN, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, n.1. p. 1-7, jan./fev. 2000.
- BLÄSSE, A. K.; OLDENHOF, H.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; WOLKERS, W. F.; SIEME, H.; BOLLWEIN, H. Osmotic tolerance and intracellular ion concentrations of bovine sperm are affected by cryopreservation. **Theriogenology**, v.78, p. 1312-1320, 2012.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinæ Medicin**, v. 3, p. 383-391, 1973.
- BORGES, J. C. **Efeito da utilização do antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação in vitro**. 2008. 96f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. Plasmatic membrane of bovine spermatozoa: effect of the species oxygen reactive, antioxidant and cryopreservation. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.3, p. 303-314, 2011.
- BORGES - SILVA, J. C.; SILVA, M. R.; MARINHO, D. B.; NOGUEIRA, E.; SAMPAIO, D. C.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; MOURÃO, G. B.; SARTORI, R. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v.28, n.7, p.1004-1008, jan. 2015.
- BORGES – SILVA, J. C.; SILVA, M. R.; OLIVEIRA, L. O. F. de; ABREU, U. G. P. de; MARINHO, D. B.; SARTORI, R. Semên bovino refrigerado utilizado na IATF contendo ou não glicerol no diluidor. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY, 30., 2016, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Foz do Iguaçu: SBTE, 2016. p. 209.
- BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J. B.; DEJARNETTE, J. M.; WHITTIER, W. D.; KÄHN, W.; AND XU, Z. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. **Theriogenology**, v.71, abril, n.7, p. 1180-1185, 2009.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n.2, p. 119-131, 2008.
- CHEN, Y.; FOOTE, R. H.; TOBBACK, C.; ZHANG, L.; HOUGH, S. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-Tris and whole milk extenders. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1028-1034, 1993.
- CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; SANTOS, M. D. P.; FILHO, M. F. D. S. Use of cooled bull semen as a strategy to increase the pregnancy rate in fixed-time artificial insemination programs-case report. **American**

Journal Animal Veterinary Sciences, v.7, n.4, p. 175-179, 2012.

CORUMBA (Site). **Clima**. Disponível em: <http://www.corumba.com.br/pantanal/pant_clima.htm>. Acesso em: 25 nov. 2017.

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **Animal Medicine Veterinary**, v. 4, p. 215-224, 1967.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. **Theriogenology**, v. 63, n.6, p. 1605-1616, abr. 2005.

GRAVANCE, C. G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D. L.; AND CASEY, P. J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, v.19, n.6, p. 704-709, nov./dec., 1998.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n.1, p. 73-88, jan./fev. 1990.

HANCOCK, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Microscopy**, v.76, p. 84-97, 1957.

HENRY, M.; NEVES, J. P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. CBRA Press: Belo Horizonte, 1998. 91p.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.18, p. 3-22, aug. 2000.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.63, p. 1354-1365, 2005.

LAMB, G. C.; DAHLEN, C. R.; LARSON, J. E.; MARQUEZINI, G.; STEVENSON, J. S. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. **Journal Animal Science**, v. 88, suppl. E, p.181-192, 2010.

LINDAHL, J.; DALIN, A. M.; STUHTMANN, G.; MORRELL, J. M. Stallion spermatozoa selected by single layer centrifugation are capable of fertilization after storage for up to 96 h at 6 °C prior to artificial insemination. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n.1, p. 1-5, jul. 2012.

MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, n.6, p. 999-1012, dec. 1992.

MUNSI, M. N.; BHUIYAN, M. M.; MAJUMDER, S., AND ALAM, M. G. Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. **Reproduction Domestic Animal**, v. 42, p. 358-362, 2007.

NAGY, S., HALLAP, T., JOHANNISSON, A., AND RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during 4°C incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n.3-4, p. 225-235, fev. 2004.

PAPA, P. M. **Efeitos da incorporação do glicerol sobre a viabilidade e fertilidade do sêmen bovino refrigerado**. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p. 209-222, aug. 1992.

PETRUNKINA, A. M.; HARRISON, R. A. P. Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys)function. **Reproduction Domestic Animal**, v.48, suppl. 1, p. 11-24, sep. 2013.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; AND PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, p.164 -166, 1949.

RESENDE, O. A; ALMEIDA, J. Efeito do método de conservação do sêmen (congelado vs. refrigerado) nas taxas de concepção de vacas Brahman inseminadas em tempo fixo. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 20, 2013, Uberlândia, MG. **Anais...** Belo Horizonte, MG: CBRA, 2013.

REVELL, S. G.; MRODE, R. A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 77-86, 1994.

SAS. Statistical analyses system. **User's guide**. Version 9.2. Cary: SAS Institute, 1996. 192 p.

SHANNON, P.; CURSON, B.; RHODES, A. P. Relationship between total spermatozoa per insemination and fertility of bovine semen stored in Caprogen at ambient temperature. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 27, p. 35-41, jan. 1984.

TRIMBERGER, G. W. Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. **Bulletin of the Agricultural Experiment Station of Nebraska**. v.153, p. 1-26, 1948.

VERBERCKMOES, S.; SOOM, A. V.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, v. 63, n.3, p. 912-922, 2005.

VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v.64, n.3, p. 720-733, aug. 2005.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v. 59, n.2, p. 571-584, jan. 2003.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 349-355, 2000.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n.2, p. 481-492, jul. 2000.

WILTBANK, M. C.; SARTORI, R.; VASCONCELOS, J. L.; NASCIMENTO, A. B.; SOUZA, A. H.; CUNHA, A. P.; GUMEN, A.; SANGSRITAVONG, S.; GUENTHER, J. N.; LOPEZ, H.; AND PURSLEY, J. R. Managing the dominant follicle in high-producing dairy cows. **Society for Reproduction and Fertility Supplement**, v. 67, p. 231-245, 2010.

ZOU, C.; YANG, Z. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during *in vitro* storage under different temperatures. **Theriogenology**, v. 53, p. 1477-1499, 2000.

Circular Técnica, 114

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Embrapa Pantanal

Rua 21 de Setembro, 1880
Caixa Postal 109
CEP 79320-900 Corumbá, MS
Fone: 67-3234-5800
Fax: 67-3234-5815
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

1ª edição

Formato digital (2017)

Comitê de Publicações

Presidente: *Ana H. B. Marozzi Fernandes*
Secretária-Executiva: *Marilisi Jorge da Cunha*
Membros: *Fernando Rodrigues Teixeira Dias*
Juliana Correa Borges Silva
Márcia Furlan Nogueira Tavares de Lima
Sandra Mara Araújo Crispim
Suzana Maria de Salis
Viviane de Oliveira Solano

Expediente

Supervisão editorial: *Ana H.B. Marozzi Fernandes*
Revisão de texto: *Ana Maria Dantas de Maio*
Editoração eletrônica: *Marilisi Jorge da Cunha*
Normalização: *Viviane de Oliveira Solano*