

Foto: Juliana Corrêa Borges Silva



## Processamento de Sêmen Bovino Refrigerado

Juliana Corrêa Borges Silva<sup>1</sup>  
Eriklis Nogueira<sup>2</sup>  
Márcio Ribeiro Silva<sup>3</sup>

### Introdução

O processamento de sêmen bovino, especificamente a manipulação do sêmen refrigerado, para utilização na inseminação artificial em tempo fixo (IATF), tem sido utilizado com índices satisfatórios (BORGES-SILVA et al.; 2015, 2016) e será abordado neste documento. Cabe ressaltar que vários fatores (coleta, diluidor, manuseio, temperatura) podem comprometer a técnica. E que esses procedimentos devem ser realizados somente por médicos veterinários capacitados. Além disso, a utilização do sêmen refrigerado deve ser restrita à própria fazenda, não podendo ser comercializado, a menos que seja coletado em central de processamento de sêmen, atendendo todas as exigências sanitárias e legais.

### Material e Métodos

Para a realização do processamento de sêmen, seja para refrigeração e/ou congelação precisaremos dos seguintes materiais e equipamentos:

#### Para coleta de sêmen:

- Luva de palpação (para palpação das glândulas anexas)
- Fita para mensuração do perímetro escrotal
- Tubo coletor plástico graduado de 15 mL
- Proteção contra luminosidade para tubo coletor
- Solução fisiológica (para lavagem do prepúcio)
- Seringa de 20 mL

- Pipeta de infusão uterina (para lavagem do prepúcio)
- Tesoura (para limpeza do prepúcio)
- Eletro ejaculador (equipamento)

#### Para análise de sêmen:

- Lâmina
- Lamínula
- Câmara de Neubauer
- Ponteiras (brancas, amarelas e azuis)
- Formol salino-tamponado
- Eppendorf (1,5 mL)
- Tubo plástico de 50 mL
- Becker
- Palhetas de envase de sêmen (média - 0,5, ou fina - 0,25 mL);
- Massinha de modelar ou álcool polivinílico para fechamento das palhetas
- Gelos recicláveis
- Balança de precisão (equipamento)
- Placa aquecedora (equipamento)
- Banho-maria (equipamento)
- Microscópio (equipamento) - indicado o de contraste de fase;
- Pipetas automáticas (equipamento)
- Caixas térmicas para refrigeração do sêmen – mais indicada as especializadas para esse fim (equipamento) ou
- Geladeira (equipamento)

<sup>1</sup> Médica Veterinária, doutora em Medicina Veterinária, pesquisadora da Embrapa Pantanal, Corumbá, MS

<sup>2</sup> Médico Veterinário, doutor em Medicina Veterinária, pesquisador da Embrapa Pantanal, Corumbá, MS

<sup>3</sup> Médico Veterinário, doutor em Zootecnia, diretor da Melhor Animal Consultoria Ltda, Jaboticabal, SP

- Diluidor de sêmen – diluidor comercial<sup>1</sup> ou preparado pelo prestador de serviço, que no caso, ainda deverá ter os reagentes necessários e condições adequadas para sua formulação. O mesmo diluidor, com 6% de glicerol, pode ser utilizado para sêmen refrigerado. Isso significa que diluidores encontrados no mercado, e contendo glicerol, podem ser utilizados sem causar danos aos espermatozoides.

E se for congelar:

- Nitrogênio líquido
- Pinça para raquear as doses
- Raques
- Botijão de nitrogênio líquido (equipamento).

### Iniciando a coleta

Analise as glândulas anexas do touro por meio de palpação retal, bem como, realize a mensuração do perímetro escrotal, para verificar sua consistência e mobilidade, a fim de detectar possíveis causas de alterações morfológicas no sêmen.

Realize a limpeza do prepúcio: corte os pêlos e lave o prepúcio, internamente, com solução fisiológica.

Para recepção dos ejaculados nas coletas utilize tubos coletores protegidos contra luminosidade por meio de capa protetora e utilize o método da eletroejaculação.

Imediatamente após a coleta, coloque os tubos coletores em banho-maria a 35°C, e mantenha-os durante todo processo de avaliação dos aspectos físicos e diluição do sêmen, para então realizar o processo de refrigeração

### Avaliação dos Aspectos Físicos e Morfológicos do Sêmen

Mensure o volume do ejaculado pelo tubo coletor graduado.

Coloque uma gota de sêmen (10µL) do ejaculado na lâmina, previamente aquecida a 37°C (placa aquecedora), para observação do turbilhonamento (escala de zero a cinco) em microscópio ótico com aumento de 100 vezes.

Coloque outra gota (10µL) entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C, para avaliação da motilidade espermática progressiva retilínea (expressa em porcentagem) e o vigor espermático (escala de zero a cinco) com aumento de 100 a 400 vezes.

Utilize a câmara de Neubauer para determinar a concentração espermática do ejaculado. Cada lado da câmara possui 25 quadrados, dos quais no mínimo, 5 deverão ter os espermatozoides contados. Fazer a contagem em L ou L invertido dos espermatozoides que se encontram sobre a linha. Contar os 5 quadrados na diagonal, e fazer a média dos dois lados da câmara (Figura 1).

### Seguem os cálculos:

**Concentração =  $N \times 5 \times 200 \times 10 \times 1000$** , onde:

N = média dos espermatozoides contados nos dois lados da câmara

5 = número de quadrados contados em 1mm<sup>2</sup> ou em cada 25,

200 = fator de diluição,

10 = fator de profundidade da câmara

1000 = para a transformação para mL.

Exemplo:

Foram contados no lado 1 = 78 e lado 2 = 64, portanto,

$78 + 64/2 = 71 = N$

Diluição 1:200 (10 µL de sêmen em 2 mL de água).

Concentração =  $71 \times 5 \times 200 \times 10 \times 1000 = 710.10^6$  espermatozoides/mL.

Para efetuar a análise da morfologia espermática, retire uma alíquota de sêmen, e dilua em solução de formol salina tamponada até turvar (HANCOCK, 1957). Avalie a patologia em preparações úmidas, entre lâmina e lamínula (10µL), num aumento de 1000 vezes sob objetiva de imersão, em microscopia de contraste de fase. Em cada preparação analise 400 células, para determinar o percentual de espermatozoides normais e de anomalias de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda (BLOM, 1973). Classifique os defeitos de acordo com Henry e Neves (1998).

Continue com o processamento do sêmen se o mesmo estiver, com no mínimo, 70% de motilidade e 3 de vigor.

<sup>1</sup> **Diluidor Tris-Gema**

Ácido cítrico (1,5 g / dL)

Tris (2,42 g / dL)

Glicose (1,25 g / dL)

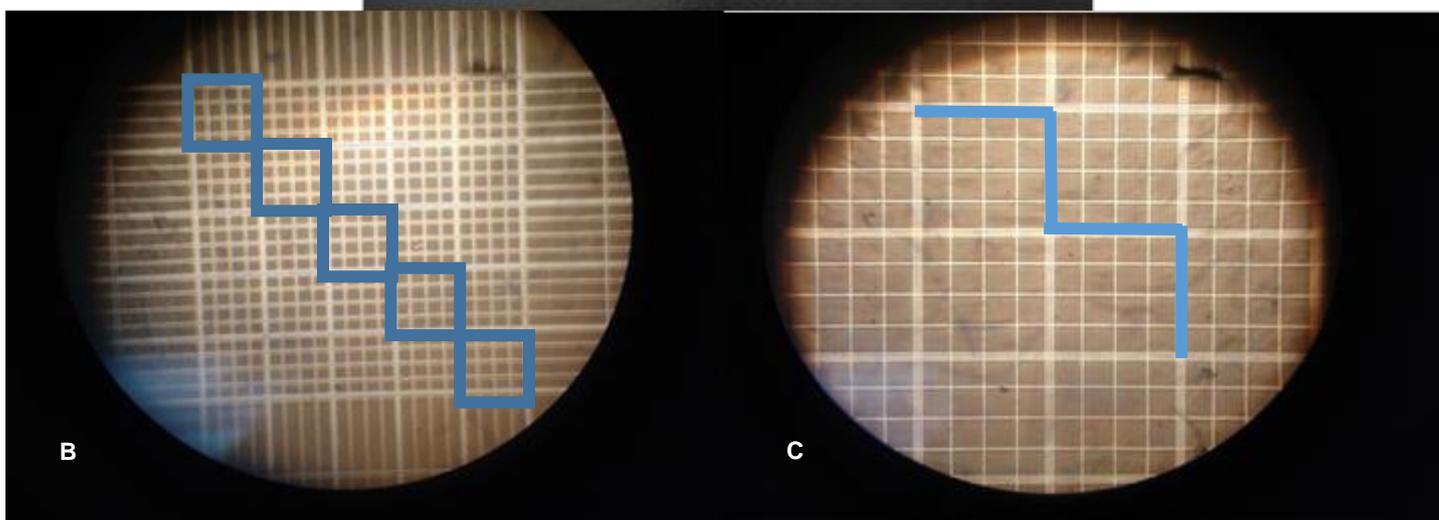
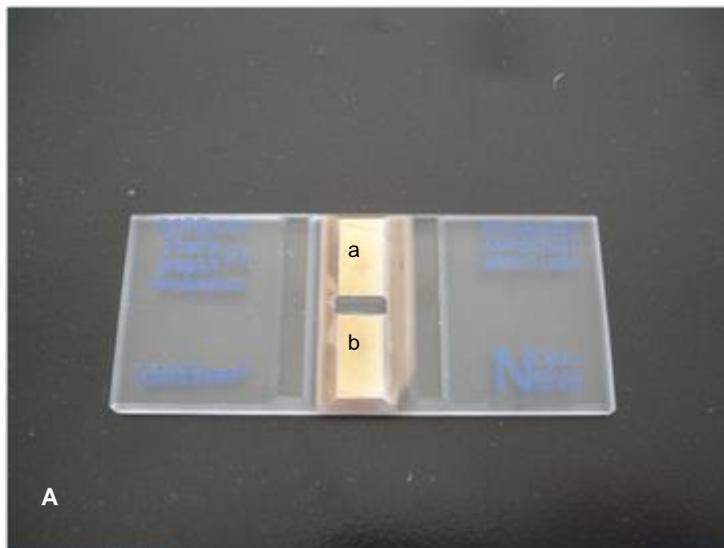
Gema de ovo (20 mL / dL)

Penicilina G sódica (1000 UI / mL,

Estreptomicina (1,000 mg / mL)

Água destilada (100 mL)

Fotos: Juliana Corrêa Borges Silva



**Figura 1.** Câmara de Neubauer. (A) Cada lado (a e b) possui 25 quadrados, dos quais cinco deverão ser contados; (B) cinco quadrados contados na diagonal; (C) contagem em L invertido dos espermatozoides que se encontram sobre a linha.

### Primeira diluição

Quanto mais rápido for todo o processo para que o sêmen seja diluído até sua diluição final, certamente melhor será o resultado.

Após retirada das alíquotas para a avaliação seminal, faça, imediatamente, a diluição de 1:1, ou seja, acrescente o mesmo volume do diluidor ao volume de sêmen.

Exemplo: acrescente 8 mL de diluidor em 8 mL de sêmen (mesmo antes de realizar os cálculos de concentração espermática).

**Importante:** o diluidor deve estar na mesma temperatura do sêmen, para que não ocorra choque térmico.

### Diluição Final

O cálculo do volume final do diluidor a ser adicionado com base na concentração espermática do ejaculado leva em

consideração o volume do ejaculado, dose inseminante, motilidade espermática e volume útil da palheta.

*Total de células móveis = concentração espermática x volume ejaculado x motilidade (1)*

*Número de doses = total de células móveis/dose inseminante por palheta (2)*

*Volume total = número de doses x volume útil da palheta (3)*

*Volume do semen previamente diluído = volume de semen + volume da primeira diluição (4)*

*Volume a acrescentar de diluente = volume total – volume de sêmen previamente diluído (5)*

Exemplo:

Volume do ejaculado = 8 mL

Concentração espermática = 710 milhões de espermatozoides/mL ( $710 \times 10^6$ )

Dose inseminante = 25 milhões de espermatozoides/mL ( $25 \times 10^6$ )

Volume útil da palheta = 0,225 mL;

Motilidade = 75% (0,75)

#### Cálculos:

(1) Total de células móveis =  $[(710 \cdot 10^6) \times (0,75) \times 8] = 426 \cdot 10^7$  milhões de espermatozoides/mL

(2) Número de doses =  $426 \cdot 10^7 / 25 \cdot 10^6 = 170,4$  doses

(3) Volume total =  $170,4 \times 0,225 = 38,34$  mL

(4) Volume do semen previamente diluído = 16 mL (8 mL de sêmen + 8 mL da primeira diluição)

(5) Volume a acrescentar de diluente =

$$38,34 - 16 = 22,34 \text{ mL}$$

Portanto, o volume do diluidor acrescentado para completar a diluição final, antes da refrigeração do sêmen é **22,34 mL**.

#### Envase

Após diluição final, envase as palhetas finas (0,25 mL) ou médias (0,5 mL) por sucção com bomba de vácuo, retirando o excesso com pente ou agulha e seringa.

Seque as pontas e feche as palhetas com massinha de modelar não tóxica ou álcool polivinílico (Figura 2). Utilize diversas cores para identificar a palheta com touros diferentes. Anote a partida com data e todas as informações do touro (número de registro e raça).

Fotos: Juliana Corrêa Borges Silva

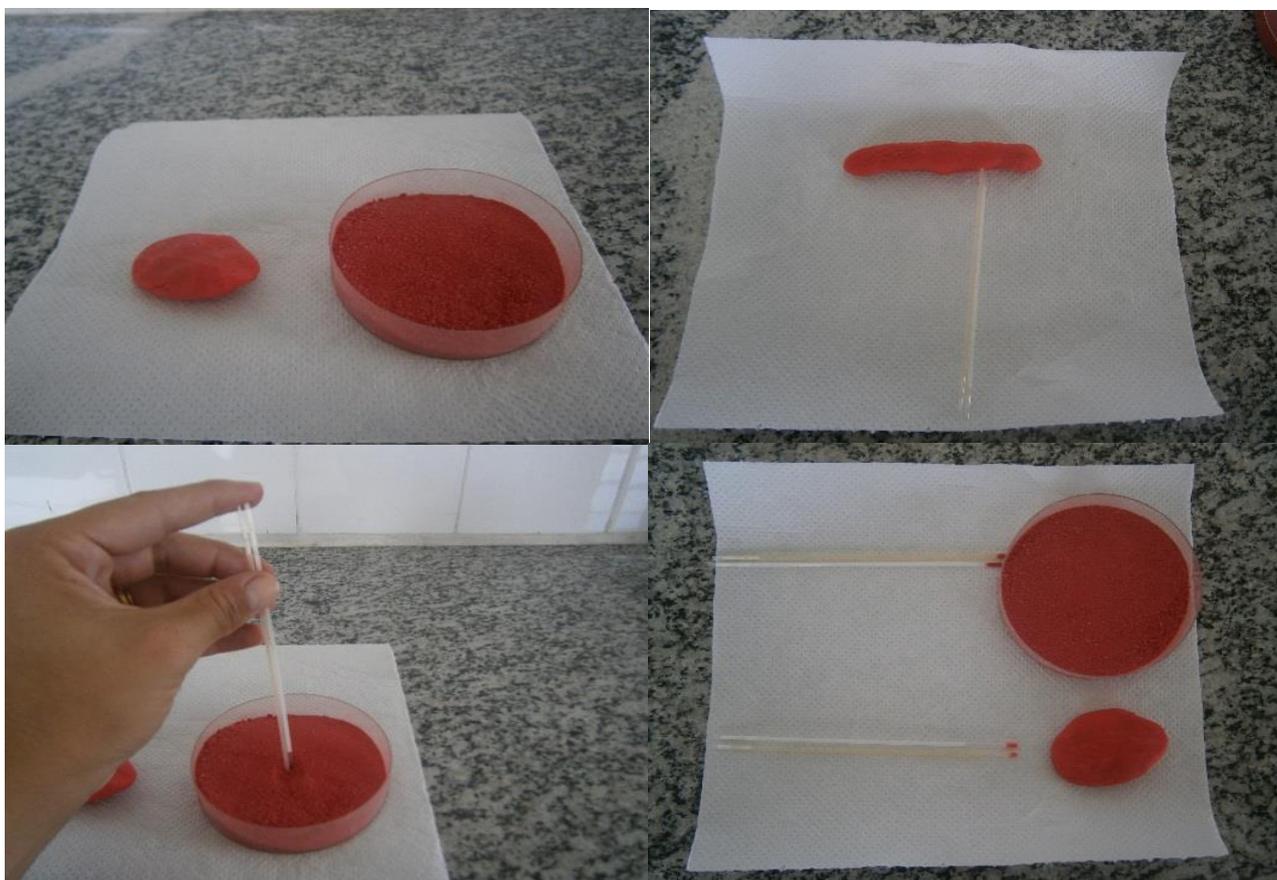


Figura 2. Fechamento das palhetas com massinha de modelar e álcool polivinílico.

#### Refrigeração

##### Método 1 – utilização de caixas específicas

Coloque as palhetas nas caixas para refrigeração **junto com os gelos recicláveis**, lembrando que o volume contido na caixa deve ser igual a 100 mL, ou seja, completar com água a quantidade para 100 mL, para que a curva seja correta e chegue até 5°C após o

período de 5 horas. Não abrir a caixa antes desse período. Se possível abrir a caixa somente no momento da IATF (Figura 3).

**Importante:** os gelos recicláveis específicos das caixas devem estar bem congelados, com no mínimo 24 horas de *freezer*. É importante que as palhetas não entrem em contato com o

gelo reciclado para que não ocorra choque térmico.

Exemplo: se existem 300 doses de 0,25mL temos um total de 75 mL, complete com 25 mL de água. Isso é para que a caixa faça a curva corretamente e mantenha as palhetas a 5°C.

### Método 2 – utilização de geladeira

Coloque as palhetas na geladeira sobre papelão ou isopor, mas nunca em contato direto com a grade da geladeira. Deixe na geladeira até o momento da utilização quando então serão transportadas, o mais rápido possível, para isopor (já refrigerado com gelo, ou seja, a caixa deve estar na mesma temperatura que a geladeira) e que será utilizada no manejo durante a realização da IATF (Figura 3).

### Utilização do sêmen refrigerado

As palhetas de sêmen refrigerado devem ser mantidas a temperatura de 5°C até o momento da sua utilização, sendo que quanto menor for o período de estocagem, melhor será o resultado de prenhez



Figura 3. Refrigeração das palhetas. (A) caixas específicas; (B) geladeira

### Utilização do sêmen refrigerado

As palhetas de sêmen refrigerado devem ser mantidas a temperatura de 5°C até o momento da sua utilização, sendo que quanto menor for o período de estocagem, melhor será o resultado de prenhez.

Retire a palheta da caixa e monte o aplicador. Não há necessidade de descongelamento, visto que não houve processo de congelação.

**Importante:** cuidado com a temperatura da caixa térmica, pois, ficar abrindo e fechando altera a temperatura interna, e conseqüentemente, a qualidade das demais palhetas. Assim, o recomendado é retirar cerca de cinco palhetas por vez e colocar em outro isopor que contenha gelos recicláveis iguais ao da primeira caixa, **evitando o contato direto das palhetas com o gelo.**

### Conclusões

A utilização do sêmen refrigerado, decorrente do aumento da IATF, é um procedimento que tem aumentado tanto os índices de prenhez quanto a utilização do touro na propriedade.

É imprescindível que o médico veterinário seja capacitado para obtenção de bons resultados. Também é indicado que se utilize touros com melhor desempenho, tanto genético, quanto de qualidade seminal.

### Referências

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk Veterinae Medicin*, v. 25, n. 7, p. 383-391, 1973.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; NOGUEIRA, E.; SAMPAIO, D. C.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; MARINHO, D. B.; SARTORI, R. Sêmen 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

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, Jun. 2016.

HANCOCK, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Microscopy**, v.76, n. 3, p. 84-97, Sep. 1957.

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

### Comunicado Técnico, 108

**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/](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/)

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



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 Corrêa Borges Silva*  
*Márcia Furlan N. 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 H B Marozzi Fernandes*  
Editoração eletrônica: *Marilisi Jorge da Cunha*  
Normalização: *Viviane de Oliveira Solano*