

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO - CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

USO DE SÊMEN FRESCO E REFRIGERADO EM  
PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO  
FIXO EM FÊMEAS BOVINAS

Autora: Natalia do Carmo Silva

Orientadora. Dr.<sup>a</sup>. Karen Martins Leão

Rio Verde - GO

junho - 2013

USO DE SÊMEN FRESCO E REFRIGERADO EM  
PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO  
FIXO EM FÊMEAS BOVINAS

Autora: Natalia do Carmo Silva

Orientadora. Dr.<sup>a</sup>. Karen Martins Leão

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde – Área de concentração Zootecnia.

Rio Verde - GO

junho - 2013

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**USO DE SÊMEN FRESCO E REFRIGERADO EM  
PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM  
TEMPO FIXO EM FÊMEAS BOVINAS**

Autora: Natalia do Carmo Silva  
Orientadora. Dr.<sup>a</sup>. Karen Martins Leão

*TITULAÇÃO:* Mestre em Zootecnia – Área de concentração  
Zootecnia – Zootecnia e Recursos Pesqueiros.

APROVADA em 08 de julho de 2013.

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira  
*Avaliador externo*  
Universidade de Brasília

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Kátia Cylene Guimarães  
*Avaliadora interna*  
IF Goiano/RV

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Karen Martins Leão  
*Presidente da banca*  
IF Goiano/RV

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pela força, sabedoria, paciência, dando-me forças para conseguir concluir esse trabalho.

A minha família, que sempre foi meu alicerce, meu apoio, refúgio. E em especial aos meus pais pela compreensão, paciência, amor e carinho.

A minha orientadora Karen, que sempre esteve disponível quando precisei, ao auxílio nos trabalhos e maior conhecimento, e principalmente pelo apoio, atenção e amizade.

A CAPES, pela concessão da bolsa que me auxiliou na execução do projeto.

As propriedades que se disponibilizaram em fornecer os animais, facilitando assim a execução do projeto.

Ao professor Marco Viu, que se disponibilizou a fornecer auxílio, aumentando assim os conhecimentos e melhor desenvolvimento do projeto.

A empresa Hertape,<sup>®</sup> pela disponibilidade dos produtos veterinários.

Aos amigos Nulciene, Rossane, Paulo, Moraima, Thaisa, Felipe e Mariana, pelo apoio, força e auxílio na execução dos projetos.

Ao professor Marco Antônio, pelo auxílio, força e amizade.

Ao Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde por aumentar meus conhecimentos e pela concessão do mestrado.

E aos colegas de mestrado, pelo companheirismo, compreensão e amizade.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

NATALIA DO CARMO SILVA, filha de Natalício dos Santos Silva e Lucilene do Carmo Silva, nasceu em Rio Verde - Goiás, em 18 de março de 1988. Em agosto de 2006, iniciou o Curso de Zootecnia no IFG – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde, graduando-se em agosto de 2010. Em agosto de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na área de Produção Animal.

## ÍNDICE GERAL

|   | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE DE TABELAS.....  | Vi     |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....  | Vii    |
| LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....  | Viii   |
| RESUMO.....   | X      |
| ABSTRACT.....   | Xii    |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL.....  | 1      |
| 1.1. Revisão de literatura.....   | 3      |
| 1.1.1. Espermatozoide.....  | 3      |
| 1.1.2. Características do sêmen.....  | 5      |
| 1.1.3. Técnicas utilizadas para conservação do sêmen.....   | 7      |
| 1.1.4. Inseminação artificial.....  | 10     |
| 1.2. Justificativa e relevância.....  | 12     |
| 1.3. Referências bibliográficas.....  | 12     |
| 2. OBJETIVOS GERAIS.....  | 18     |
| 3. TRABALHO CIENTÍFICO.....   | 19     |
| USO DE SÊMEN FRESCO E REFRIGERADO EM PROGRAMAS DE<br>INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM FÊMEAS BOVINAS.. | 19     |
| RESUMO.....   | 19     |
| ABSTRACT.....   | 20     |
| INTRODUÇÃO.....   | 20     |
| MATERIAL E MÉTODOS.....   | 22     |
| <i>Experimento I</i> .....  | 22     |
| <i>Experimento II</i> .....   | 23     |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| <i>Experimento III</i> .....          | 24 |
| <i>Diagnóstico de gestação</i> .....  | 25 |
| <i>Delineamento estatístico</i> ..... | 26 |
| RESULTADO E DISCUSSÃO.....            | 26 |
| CONCLUSÃO.....                        | 32 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....       | 32 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|   | Página |
|---|--------|
| Tabela 1. Valores médios do percentual de motilidade total, percentual de motilidade progressiva, vigor (0 a 5) e percentual de integridade de membrana frente a dois sistemas de refrigeração, sendo geladeira Minitub <sup>®</sup> e caixa Botuflex <sup>®</sup> , após 24 horas de refrigeração..... | 27     |
| Tabela 2. Valores médios do percentual de motilidade total, percentual de motilidade progressiva, vigor (0 a 5) e percentual de integridade de membrana frente a dois sistemas de refrigeração, sendo geladeira Minitub <sup>®</sup> e caixa Botuflex <sup>®</sup> , após 48 horas de refrigeração..... | 27     |
| Tabela 3. Valores médios do percentual de motilidade total, percentual de motilidade progressiva, vigor (0 a 5) e percentual de integridade de membrana frente a dois sistemas de refrigeração, sendo geladeira Minitub <sup>®</sup> e caixa Botuflex <sup>®</sup> , após 72 horas de refrigeração..... | 28     |
| Tabela 4. Taxa de concepção de vacas pluríparas da raça Nelore inseminadas por IATF com sêmen congelado e refrigerado em diferentes concentrações.....  | 29     |
| Tabela 5. Taxa de concepção de novilhas da raça Nelore inseminadas por IATF com sêmen congelado e fresco em diferentes concentrações.....   | 31     |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Estrutura de um espermatozóide bovino..... | 4      |

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

|                   |   |
|-------------------|---|
| DIB <sup>®</sup>  | Inplante intravaginal de progesterona       |
| °C                | Graus Celsius                               |
| CASA              | Sistema de análise computadorizada de sêmen |
| CBRA              | Conselho Brasileiro de Reprodução Animal    |
| CV                | Coeficiente de variação                     |
| DNA               | Ácido desoxirribonucléico                   |
| ECP               | Cipionato de estradiol                      |
| eCG               | Gonadotrofina coriônica equina              |
| EROS              | Espécie reativa de oxigênio                 |
| g                 | Gramma                                      |
| IA                | Inseminação artificial                      |
| IATF              | Inseminação artificial em tempo fixo        |
| IM                | Integridade de membrana                     |
| mg                | Miligrama                                   |
| mL                | Mililitro                                   |
| MG5               | <i>Brachiaria Brizantha</i> cv. xaraés      |
| MT                | Motilidade total                            |
| MP                | Motilidade progressiva                      |
| PGF <sub>2α</sub> | Prostaglandina F2 alfa                      |
| T                 | Tempo de refrigeração                       |
| T24               | 24 horas de refrigeração                    |
| T48               | 48 horas de refrigeração                    |

|     |                          |
|-----|--------------------------|
| T72 | 72 horas de refrigeração |
| ®   | Marca registrada         |
| %   | Porcentagem              |
| V   | Vigor espermático        |
| UI  | Unidade Internacional    |

## RESUMO

A refrigeração do sêmen tem como intuito a preservação da viabilidade espermática, garantindo a longevidade necessária para a utilização das amostras seminais em programas de reprodução animal. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade do sêmen refrigerado bovino, bem como avaliar a taxa de concepção de vacas e novilhas da raça Nelore inseminadas com sêmen refrigerado após protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. **Experimento I-** Refrigeração de sêmen. Foram utilizados 30 ejaculados de cinco touros da raça Nelore, previamente selecionados. O ejaculado foi diluído com diluente Bovimix<sup>®</sup> e após diluídas e homogeneizadas as amostras foram colocadas em tubos de centrifuga de 15 mL previamente identificadas com o tratamento utilizado, e submetidas a dois sistemas de refrigeração: Geladeira Minitub<sup>®</sup> e caixa Botuflex<sup>®</sup> à 5°C. Logo após a diluição (T0) foi avaliada motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), vigor (V;0-5) e integridade de membrana (IM). As amostras também foram avaliadas 24 (T24), 48 (T48) e 72 (T72) horas de refrigeração. Nestes momentos foi retirado 1 mL de cada amostra de sêmen os quais foram aquecidas por 10 minutos em banho-maria a 37°C antes de serem avaliadas. O Experimento I foi conduzido em um delineamento inteiramente ao acaso. Sendo os dados analisados por ANOVA pelo teste t a 5% de probabilidade, através do Assistat versão 7.6 beta. **Experimento II-** Uso de sêmen refrigerado na IATF de vacas. Foram utilizadas 53 vacas lactantes da raça Nelore, distribuídas aleatoriamente nos seguintes grupos: Grupo I- (n=19 vacas) controle - IATF com sêmen congelado na propriedade com  $16 \times 10^6$  espermatozoides/móveis; Grupo II- (n=15 vacas)- IATF com sêmen refrigerado em caixa Botuflex<sup>®</sup> com  $32 \times 10^6$  espermatozoides/móveis; Grupo III- (n=19 vacas) - IATF com sêmen refrigerado em caixa Botuflex<sup>®</sup> com  $64 \times 10^6$  espermatozoides móveis. **Experimento III-** Uso de sêmen fresco na IATF de novilhas. Foram utilizadas 77 novilhas da raça nelore distribuídas aleatoriamente de acordo com os seguintes grupos: Grupo I: (n= 39 novilhas) - IATF com sêmen fresco com o total de  $30 \times 10^6$  espermatozoides/móveis, Grupo II: (n=38 novilhas) - IATF com sêmen congelado com um total de  $10 \times 10^6$  espermatozoides/móveis. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 35 dias após a inseminação artificial em tempo fixo através de exame de ultrassom. Os Experimentos II e III foram conduzidos em um delineamento inteiramente ao acaso. As taxas de concepção obtidas durante os experimentos foram analisadas usando o procedimento MIXED do SAS (SAS, 2000). Não foi observada diferença estatística em nenhum dos parâmetros avaliados e entre os sistemas de refrigeração ( $P>0,05$ ). O sêmen refrigerado com alta concentração espermática melhorou a taxa de concepção de vacas nelore inseminadas por IATF. No

entanto, em novilhas o sêmen congelado apresentou melhor taxa de concepção quando comparado com o sêmen fresco.

**Palavras-chaves:** bovinos, qualidade do sêmen, refrigeração, taxa de concepção.

## ABSTRACT

The semen is cooled to preserve sperm quality, ensuring the longevity necessary for using semen samples in animal reproduction programs. The objective of the present study was to assess the quality of cooled cattle semen and assess the conception rate in Nelore breed heifers and cows inseminated with cooled semen after fixed timed artificial insemination protocols. **Experiment I-** Cooled semen. Thirty ejaculates were used from five previously selected Nelore breed bulls. The ejaculate was diluted in Bovimix<sup>®</sup> extender and after homogenization were placed in 15 mL centrifuge tubes previously labeled with the treatment used and submitted to two cooled systems, in a Minitub<sup>®</sup> refrigerator and Botuflex<sup>®</sup> box at 5°C. The following were assessed shortly after diluting (T0): total motility (MT;%), progressive motility (MP;%), vigor (V;0-5) and membrane integrity (IM;%). The samples were also assessed at 24 (T24), 48 (T48) and 72 (T72) hours after cooled, when 1 mL of each semen sample were heated for 10 minutes in a water bath at 37°C before assessment. Experiment I was carried out in a completely randomized design and the data analyzed by ANOVA using t test at 5% of probability using the Assisat software, version 7.6 beta. **Experiment II-** Use of cooled semen in FTAI of cow fifty-three lactating Nelore cows were used placed randomly in the following groups: Group I- (n=19 cows) control – FTAI using frozen semen in the farm with  $16 \times 10^6$  mobile spermatozoa; Group II- (n=15 cows) - FTAI using cooled semen in a Botuflex<sup>®</sup> box with  $32 \times 10^6$  motility spermatozoa; Group III- (n=19 cows) – FTAI using cooled semen in a Botuflex<sup>®</sup> box with  $64 \times 10^6$  motility spermatozoa. **Experiment III-** Use of fresh semen in FTAI, of heifers. There were used 77 Nelore heifers placed randomly according to the following groups: Group I: (n= 39 heifers) – FTAI with fresh semen with a total of  $30 \times 10^6$  motility spermatozoa, Group II: (n=38 heifers) – FTAI frozen semen with a total of  $10 \times 10^6$  motility spermatozoa. Pregnancy was diagnosed 35 days after fixed time artificial insemination by ultrasound examination. Experiments II and III were carried out in a completely randomized design. The conception rates obtained during the experiments were analyzed using the SAS MIXED procedure. No statistical difference was observed among the cooled systems. The cooled semen with high sperm concentration improved the conception rate of Nelore cows inseminated by FTAI while in heifers the frozen semen presented a better conception rate compared with fresh semen.

**Key words:** Conception rate, cattle, refrigeration, semen quality

## 1 - INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o quinto maior país do mundo em território, possui o maior rebanho comercial do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças de gado e é o maior exportador mundial de carne bovina (BRASIL, 2012).

As perspectivas da pecuária de corte no Brasil de acordo com o relatório de projeções do agronegócio 2010 a 2020, entre as carnes com maiores projeções serão a carne de frango e a bovina que deve ter o aumento de 2,2% ao ano, com aumento do consumo de carne bovina em torno de 9,4 milhões de toneladas. Assumindo assim, a carne bovina, o segundo lugar no aumento do consumo (BRASIL, 2011).

Com o passar dos anos houve grandes avanços na pecuária nacional, com o desenvolvimento de novas biotecnologias as quais vem sendo estudadas e implantadas visando aumentar a produtividade das propriedades. Dentre essas biotecnologias a mais comumente utilizada é a inseminação artificial.

A inseminação artificial é uma biotécnica bastante difundida e possui algumas vantagens principalmente quando associada a nutrição e sanidade adequadas podendo trazer vários benefícios ao produtor, como o melhoramento genético, melhor controle e previsão de partos e redução das taxas de contaminação de doenças sexualmente transmissíveis no rebanho (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) permite inseminar um grande número de vacas em dia e hora pré-determinada, sem a necessidade de observação de cio. Além dessa vantagem, também possibilita a inseminação de um grande número de vacas no início da estação de monta, diminui o intervalo entre partos e o descarte de fêmeas que ficariam vazias no final da estação de monta além de facilitar o manejo de inseminação (BARUSELLI et al., 2004a).

No início da utilização de hormônios, para sincronização de cio, utilizava-se

apenas prostaglandina F2 alfa ( $PGF_{2\alpha}$ ). No entanto, quando utilizada em associação a outros hormônios, como os estrógenos e progestágenos possuem maior eficácia. Atualmente, utilizam-se dois ou mais hormônios associados no mesmo protocolo, cada um com uma finalidade específica com o objetivo de se obter o máximo de segurança na sincronização do ciclo estral e ovulação (MILISTETD, 2006).

Apesar de serem utilizados há algum tempo, em vacas de corte lactantes, os protocolos de IATF apresentam resultados variados, entre 25% (MARTINEZ et al., 2005) e 70 % (SIQUEIRA et al., 2008), sendo esta variação dependente da interação entre o meio ambiente e características individuais de cada rebanho.

Um dos principais obstáculos encontrado pelo produtor é a baixa taxa de concepção obtida com o uso da IATF, principalmente em novilhas e estes resultados são reflexos de vários fatores, incluindo a qualidade do sêmen utilizado (PAPA et al., 2008).

A avaliação é de grande importância para determinar a qualidade do sêmen dos animais. Na análise do sêmen é necessário que os espermatozoides apresentem características físicas e morfológicas adequadas para que ocorra a fertilização. A correta manipulação do sêmen também constitui fator fundamental num programa de inseminação artificial eficiente (SEVERO, 2009).

Em protocolos de IATF podem ser utilizadas várias partidas de sêmen e a não avaliação ou mesmo a falta de critérios na avaliação destas partidas, bem como a manipulação inadequada do sêmen poderá afetar sobre maneira a fertilidade de todo o lote de fêmeas, trazendo prejuízos econômicos, visto os gastos com fármacos para a sincronização dos estros, bem como para a indução da ovulação destas fêmeas, além do dispêndio em material, sêmen e mão de obra. (ARRUDA et al., 2006).

A refrigeração do sêmen tem como princípio a preservação da viabilidade espermática, garantindo maior longevidade. A redução da temperatura de manutenção para valores próximos a  $5^{\circ}\text{C}$  resulta na diminuição do metabolismo espermático e aumento da longevidade dos espermatozoides (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

A refrigeração do sêmen mantém um número de espermatozoides viáveis por período de tempo maior, quando comparado com o sêmen fresco, reduzindo o crescimento microbiano e mantém a viabilidade do sêmen diluído por mais tempo. A viabilidade espermática começa a diminuir em 72 horas de armazenamento, independente do diluente de refrigeração utilizado, sendo que o sêmen refrigerado é mais comumente utilizado em equinos e suínos, pela baixa congelabilidade do sêmen (SEVERO, 2009).



O sêmen refrigerado, desde a temperatura corpórea até a temperatura ambiental, parece não apresentar danos ao espermatozoide quando este se encontra diluído em diluente adequado (MORAN, 1992).

O sêmen congelado apresenta fertilidade significativamente reduzida quando comparado ao fresco, por causa do processo de criopreservação, que compreende diluição, resfriamento, adição e penetração do crioprotetor, envase, congelação, armazenamento e descongelação (WATSON, 2000). A célula espermática também passa por uma série de estresses térmico, osmótico e tóxico, além de rápidas alterações de volume celular que causam danos a membrana plasmática (GIRAUD et al., 2000).

Com o desenvolvimento dos processos de congelação/dcongelação dos espermatozoides e avanços na produção de meios diluidores no intuito de manter a viabilidade da célula espermática, a utilização do sêmen bovino fresco ou refrigerado foi abandonada em virtude dos evidentes benefícios relacionados com a criopreservação (VERBERCKMOES et al., 2005).

Contudo, a congelação não resolveu todos os problemas relativos à conservação do sêmen, já que o processamento reduz drasticamente a fertilidade dos espermatozoides (WATSON, 2000), tendo parcela expressiva de reprodutores intolerantes ao processo de criopreservação apresentando significativa queda na fertilidade espermática após o processamento, com especial destaque para a espécie equina (BATELLIER et al., 2001) e suína (GIL et al., 2008).

Segundo VISHWANATH et al. (2003), a utilização do sêmen refrigerado de bovinos apresenta como principais vantagens a otimização de touros geneticamente superiores que possuem baixa resistência ao congelamento do sêmen, ausência de custos relacionados a estocagem e simplicidade na manipulação/utilização na IA quando comparado ao sêmen congelado.

## 1.1. Revisão de Literatura

### 1.1.1. Espermatozoide

O espermatozoide é uma célula altamente polarizada e especializada que perde a habilidade de biossíntese, reparo, crescimento e divisão celular durante a fase final da espermatogênese (YOSHIDA, 2000).

Os espermatozoides podem ser divididos em duas estruturas distintas: cabeça e cauda. A cabeça, cuja forma, tamanho e estrutura variam entre as espécies e possui duas regiões: acrossomal e pós-acrossomal (SIQUEIRA, 2004).

A característica principal da cabeça do espermatozoide é o núcleo achatado de forma oval, contendo a cromatina altamente compacta. A extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossoma, uma fina cobertura com dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo. (HAFEZ, 2004).

A cauda do gameta masculino é composta pelo colo, peça intermediária principal e terminal. A região da cauda entre o colo e o annulus é a peça intermediária. A parte central da peça intermediária junto com o comprimento total da cauda forma o axonema, ocorrendo a transformação de energia química em mecânica. Contudo, esse conjunto é recoberto externamente por varias mitocôndrias dispostas em forma de hélice, que geram a energia necessária para a motilidade espermática (BEDFORD & HOSKINS, 1990).

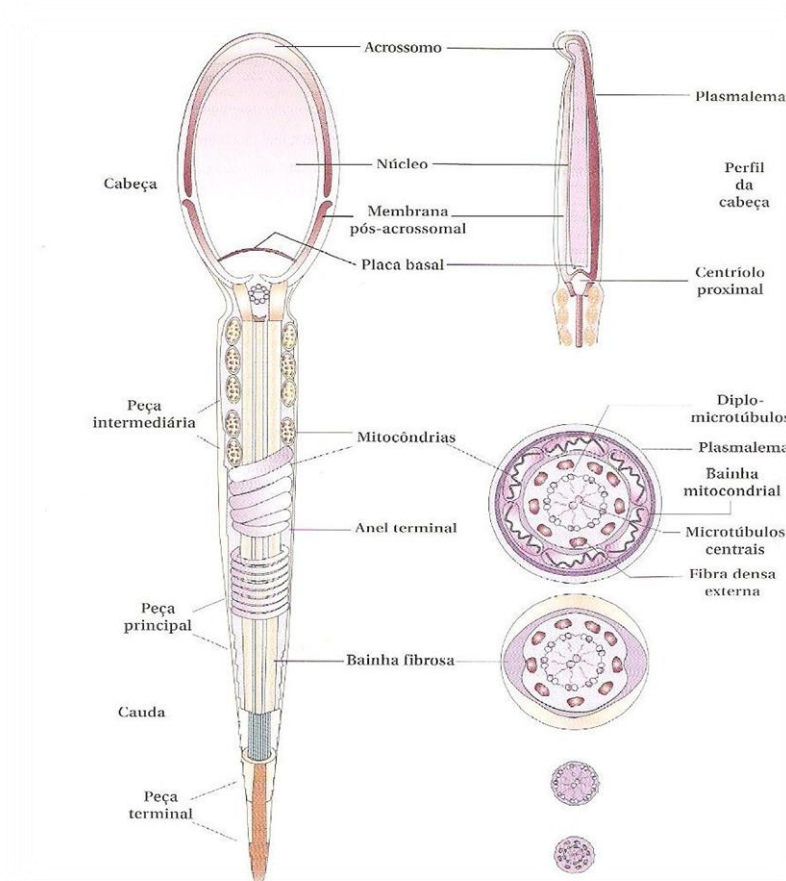


FIGURA 1. Estrutura de um espermatozoide de bovino  
Fonte: Hoste et al., 2008.

A membrana plasmática é responsável por envolver todo o espermatozoide e é composta por camadas lipídicas e de proteínas as quais contêm fosfolipídeos, colesterol, glicolipídeos, e diferentes tipos de proteínas (ALBERTS et al., 1997).

As membranas exercem papel fundamental na manutenção da capacidade fertilizante do espermatozoide. A membrana plasmática é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, atuando como barreira entre o meio intra e extracelular, e lesões nessa estrutura podem levar a perda da homeostase, levando a morte celular (FLESH & GADELLA, 2000).

Três lipídeos fazem parte das membranas: fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol, sendo que dentre estes, os fosfolipídios são os mais abundantes (ALBERTS et al., 1997). O colesterol é o principal esteroide presente nos espermatozoides e nas membranas celulares dos mamíferos, possuindo importante papel de modular a fluidez e a estabilidade da bicamada lipídica através da sua interação estérica com os fosfolipídios de membrana (PARKS, 1997). O conteúdo de colesterol da membrana plasmática é o fator mais variável e está diretamente relacionado com a taxa de capacitação, por causa da necessidade de remoção durante esse processo (FLESH & GADELLA, 2000).

Em geral, quanto maior a quantidade de colesterol presente, menos flexível, e/ou menos fluida é a porção da membrana (AMANN & PICKETT, 1987). A resistência ao choque pelo frio é maior nas espécies em que a proporção colesterol: fosfolipídios da membrana plasmática são altos (VALLE & SILVA FILHO, 2001).

A membrana plasmática apresenta cerca de 50% de sua massa constituída por proteínas. Portanto, a parte exterior da célula consiste em grande parte de carboidratos, que formam uma cobertura celular, exercendo função primordial na interação com o ovócito (ALBERTS et al., 1997).

### 1.1.2 Características do sêmen

O sêmen é uma suspensão celular líquida contendo espermatozoides e secreções de órgãos acessórios do trato masculino. Sua concentração e volume podem variar entre as diversas espécies e dentro da mesma espécie. Dessa forma o sêmen é constituído por

componentes químicos e bioquímicos que potencializam sua fertilização (HAFEZ, 2004).

A avaliação do sêmen é de grande importância para determinar a qualidade e é necessário que os espermatozoides apresentem características físicas e morfológicas adequadas para que ocorra a fertilização (SEVERO, 2009).

FONSECA (1999) relata que dentre os aspectos físicos do sêmen, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático são as características mais avaliadas para prever a qualidade do sêmen. Segundo o autor, estes parâmetros são de grande importância e podem revelar, por si só, a existência de distúrbios bioquímicos no sêmen, associados ou não com alterações da espermiogênese. Entretanto, STALHAMMAR et al. (1994), ressaltam as limitações da análise isolada da motilidade espermática progressiva como critério único de avaliação de sêmen bovino.

Os aspectos físicos do sêmen, rotineiramente examinados para avaliação da capacidade reprodutiva do touro, são a motilidade total, progressiva e o vigor espermático, que são medidas usadas para prever a qualidade seminal em condições a campo (MARQUES, 2006).

A motilidade progressiva é considerada um dos mais importantes aspectos físicos do sêmen em todas as espécies. O vigor representa a intensidade de movimentação dos espermatozoides e é classificado numa escala de 0 a 5. O vigor está diretamente correlacionado com a motilidade. Normalmente, quando se tem uma motilidade baixa, o vigor está baixo também (ANCHIETA et al., 2005).

Outras técnicas são desenvolvidas no intuito de melhor desenvolver as avaliações do sêmen e diminuir a subjetividade das análises, dentre essas técnicas podem ser citados os sistemas computadorizados de análise de sêmen (CASA), o uso de sondas fluorescentes para avaliação das estruturas espermáticas e sistemas de citometria de fluxo (ARRUDA et al., 2006).

A integridade da membrana plasmática do espermatozoide é um requisito fundamental para sua viabilidade e sua predição do potencial de fecundação (PAPA et al., 2000).

Com o intuito de garantir a manutenção da homeostase celular, a membrana plasmática atua como barreira entre o meio externo e interno. Em condições de estresse provocado pela criopreservação, as membranas sofrem rearranjos, com isso induzindo a excessiva permeabilidade ou mesmo rompimento das membranas (AMANN & GRAHAM, 1993).

A integridade da membrana plasmática é uma condição essencial para o metabolismo e a função espermática, podendo ser observada com a coloração eosina-nigrosina ou com o uso de corantes fluorescentes (BERNARDI, 2008). E sua avaliação se baseia na capacidade das membranas impedirem ou não a entrada de determinados corantes nos compartimentos internos dos espermatozoides, permitindo separar as células com membrana íntegra (COSTA, 2007).

Vários testes são empregados para determinar a integridade da membrana plasmática, como as colorações supravitais, incluindo Tripan-Blue-Giensa, eosina-nigrosina, testes hiposmóticos e, mais recentemente, o uso das sondas fluorescentes que atuam através de reações com enzimas citoplasmáticas ou de ligação com o DNA espermático (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

De acordo com GADEA (2005) a integridade de membrana plasmática avalia a viabilidade espermática, mas não a funcionalidade, possibilitando a separação de ejaculados de menor e maior fertilidade, mas não identifica os ejaculados de fertilidade sub-ótima.

A avaliação das membranas espermáticas aponta o sucesso da criopreservação, uma vez que são extremamente sensíveis às crioinjúrias. As inúmeras funções da membrana estão relacionadas ao metabolismo celular e manutenção da motilidade, capacitação, reação acrossomal, interações entre o espermatozoide e epitélio do trato genital da fêmea e a interação com oócito (PEÑA et al., 2005).

ZÚCCARI et al. (2009) observaram maiores proporções de células com membrana plasmática íntegra submetidas a coloração com eosina-nigrosina, do que pela fluorescência e teste hiposmótico.

### 1.1.3 Técnicas utilizadas para conservação de sêmen

A refrigeração de sêmen é utilizada com o intuito de manter seu potencial fertilizante por longos períodos, em consequência da redução do metabolismo dos espermatozoides (BATELLIER et al., 2001).

A viabilidade do sêmen depende da qualidade espermática inicial, do tipo de diluente utilizado e das temperaturas de conservação. A temperatura mais comumente utilizada para refrigeração do sêmen é de 4 a 5°C (SILVA et al., 2002).

Quando o sêmen é refrigerado a 5°C reduz-se o metabolismo espermático resultando em aumento da longevidade dos espermatozoides permitindo mais flexibilidade no uso do sêmen refrigerado quando comparado ao fresco (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

O sêmen refrigerado é bastante utilizado na IATF com o intuito de aumentar as taxas de concepção em virtude de sua maior viabilidade espermática, quando comparado com sêmen congelado DELL'AQUA et al. (2013).

A utilização do sêmen refrigerado de bovino apresenta como principais vantagens a otimização de touros geneticamente superiores que possuem baixa resistência ao congelamento do sêmen, ausência de custos relacionados a estocagem e simplicidade na sua manipulação/utilização na IA quando comparado ao sêmen congelado (VISHWANATH et al., 2003).

CARNEIRO et al. (2007) observaram que partidas de sêmen ovino congeladas apresentam taxas de concepção inferiores, quando comparados aos obtidos utilizando-se sêmen fresco e refrigerado.

SOUSA & BICUDO (2003) observaram índices de prenhez para a espécie ovina similares após inseminação artificial (IA) realizada com sêmen *in natura* e/ou refrigerado.

PAULENZ et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes ao compararem as temperaturas de 5°C e 20°C para manutenção da viabilidade do sêmen ovino em diferentes diluentes contendo gema de ovo em sua constituição. Observou-se que a temperatura interagiu com o diluente apenas na motilidade espermática, não apresentando diferença quanto à integridade de membrana e de acrossoma, assim como no teste hiposmótico e na capacitação.

Quando o espermatozoide for submetido ao resfriamento de maneira inadequada, o mesmo sofre o choque-frio, induzindo danos irreversíveis ao espermatozoide que se caracterizam por alterações nos padrões de motilidade, queda do metabolismo e danos na membrana plasmática e no acrossoma. (GRAHAM, 1996).

No mercado é mais comumente utilizado o sêmen congelado devido ao uso de sêmen de touros de outros locais, facilitando o transporte do mesmo, porém o processo de criopreservação em que o sêmen é submetido reduz a viabilidade espermática pelos processos que compreendem diluição, resfriamento, adição e penetração do crioprotetor, envase e congelamento (WATSON, 2000).

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia de grande impacto na reprodução animal. Pois, visa à suspensão do metabolismo espermático e a manutenção de suas características por tempo prolongado, quando mantido em nitrogênio líquido (PESCH & HOFMAN, 2007).

A reprodução animal obteve inúmeros benefícios com a criopreservação, permitindo o maior aproveitamento de animais com alto potencial genético e produtivo, o transporte do sêmen a longas distâncias e formação de bancos de germoplasma, tanto de animais em risco de extinção, como daqueles que não podem ser utilizados na reprodução por razões temporárias ou permanentes (BERTOZOO & ZÚCCARI, 2008).

O processo de criopreservação das células espermáticas resulta na diminuição da fertilidade quando comparada ao sêmen fresco. Esse prejuízo surge da combinação de alguns aspectos, como perda da viabilidade espermática ou danos na capacidade funcional dos espermatozoides, uma vez que a motilidade e a estrutura dos espermatozoides são afetadas de diferentes formas, podendo ocorrer injúrias nas diferentes etapas de congelação e descongelação (WATSON, 2000).

Mesmo com as melhores técnicas de criopreservação, obtém-se ainda, em média, a manutenção de apenas 50% de viabilidade da população espermática, dependendo de fatores como, qualidade do ejaculado, métodos de congelamento, tipo de diluidor, tipo de envasamento (mini-palhetas, palheta média, ampola, pellets) e métodos de congelação (OHASHI, 2001).

Durante a criopreservação e descongelação, ocorrem danos como a formação de cristais de gelo intracelular, aumento da concentração intracelular de soluto, e modificações, resultantes da desidratação celular durante a congelação. As lesões celulares podem ser causadas diretamente, ao afetar as estruturas celulares (ruptura de membranas), ou indiretamente, com alteração nas funções celulares através do processo metabólico (HOLT, 2000).

A criopreservação também causa estresse físico e químico alterando a membrana dos espermatozoides, diminui irreversivelmente a motilidade espermática, provoca aumento da degeneração do DNA e liberação intracelular de enzimas, lipídeos e proteínas (BRANDÃO et al., 2006).

As principais injúrias do choque frio ocorrem entre 15 a 5°C, temperatura a qual o sêmen bovino é mais sensível (STORNELLI et al., 2005).

SANTOS (2003) destaca que os espermatozoides são altamente sensíveis a efeitos tóxicos dos crioprotetores e estes efeitos dependem principalmente da concentração utilizada e do período de exposição das células a esse agente.

Existem diferenças na composição lipídica da membrana plasmática entre as espécies, raças e ainda indivíduos da mesma espécie, explicando o maior ou menor efeito protetor do diluente ao espermatozoide de um determinado indivíduo (HOLT, 2000). Aqueles espermatozoides que toleram os efeitos da criopreservação são denominados de bons congeladores (WATSON, 2000).

No processo de congelamento os espermatozoides também são submetidos à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que induzem a mudanças na estrutura e nas funções espermáticas (BALL et al., 2001), e afetam o sistema de defesa dos antioxidantes, devido ao aumentando das reações de oxidação das células (BILODEAU et al., 2000).

#### 1.1.4. Inseminação Artificial

Os primeiros trabalhos envolvendo a utilização prática da inseminação surgiu a partir do século XVIII nas diversas espécies de animais de produção. E corresponde a primeira grande biotecnologia aplicada no intuito de melhorar a reprodução, produtividade e o melhoramento genético dos animais de produção (FOOTE, 2002).

As principais vantagens na utilização da IA são o ganho genético através da utilização de touros com potencial genético comprovado, prevenção de doenças sexualmente transmissíveis transmitidas pela monta natural e a utilização de sêmen de touros de outras regiões e impossibilitados de realizarem a monta (SUGULLE et al., 2006).

A inseminação artificial possui alguns entraves como dificuldade no manejo de detecção de estro, reduzido número de vacas ciclando no período pós-parto, anestro, balanço energético negativo e mão de obra qualificada. Com o intuito de melhorar a eficiência reprodutiva foram estudadas e desenvolvidas novas biotecnologias como a inseminação artificial em tempo fixo visando à utilização de protocolos hormonais capazes de regular o ciclo estral e sincronizar a ovulação das fêmeas (CRESPILHO et al., 2010).

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) permite inseminar um grande número de vacas em dia e hora pré-determinada, sem a necessidade de observação de



cio. Além dessa vantagem, também possibilita a inseminação de um grande número de vacas no início da estação de monta, diminui o intervalo entre partos e o descarte de fêmeas que ficariam vazias no final da estação de monta, além de facilitar o manejo de inseminação das vacas (BARUSELLI et al., 2004b).

Entretanto, os resultados da utilização da IATF são muito variáveis pelas baixas taxas de concepção dos programas, oscilando entre 40 a 50% tornando esta biotécnica menos utilizada principalmente pelos investimentos com a compra de sêmen e hormônios os quais são indispensáveis a sincronização (SÁ-FILHO et al., 2010).

BARUSELLI et al. (2002) realizaram IATF em vacas Brangus lactantes nos primeiros 45 dias de estação de monta e após os 45 dias foram colocados touros com todos os animais e observaram que houve aumento significativo na taxa de prenhez desses animais inseminados em tempo fixo, quando comparados com animais submetidos à detecção de estro e a IA convencional. Entretanto, puderam observar que mesmo sem a detecção de estro a IATF reduziu em 39,3 dias o período de serviço dos animais em relação à inseminação convencional, demonstrando várias vantagens, bem como a antecipação dos partos e a estação de monta do próximo ano.

PENTEADO et al. (2005) avaliou o efeito de diferentes tipos de manejo durante a estação de monta (EM) sobre a performance reprodutiva de vacas Nelore. E observaram que o uso estratégico da IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes como ferramenta de manejo reprodutivo promove antecipação da concepção e incremento ao redor de 8% na taxa de prenhez ao final da estação de monta, além de aumentar o número de vacas prenhes por IA.

Segundo CRESPILO et al. (2010) o sêmen refrigerado por 24 horas representa uma estratégia eficiente para o aumento da taxa de concepção de vacas inseminadas em tempo fixo, apresentando uma alternativa altamente viável do ponto de vista econômico e biológico.

BUCHER et al. (2009) obtiveram melhores resultados de taxa de concepção comparando o sêmen fresco de bovino por 24 horas com a concentração de  $3 \times 10^6$  espermatozoides totais e sêmen congelado com  $20 \times 10^6$  espermatozoides/palheta, demonstrando que mesmo com a redução de 85% na dose inseminante a IA foi eficiente devido a maior qualidade dos espermatozoides. Nesse sentido, pode-se presumir que a utilização do sêmen bovino refrigerado desempenha papel semelhante ao aumento da concentração de espermatozoides no sêmen congelado, levando ao efeito compensatório que garante maior número de células viáveis ao processo de fertilização.

## 1.2 Justificativa e Relevância

A inseminação artificial trouxe vários benefícios aos produtores, como melhoramento genético, a utilização de sêmen de touros geneticamente melhorados e de touros impossibilitados de realizarem a monta evitando a transmissão de doenças pela monta natural. Entretanto, a inseminação possui alguns entraves, como o aumento dos custos com mão de obra qualificada e principalmente falhas na detecção de estro (CRESPILHO et al., 2010).

Por meio da necessidade de aumentar a produção e melhorar os índices reprodutivos foi implantada a inseminação artificial em tempo fixo que permite inseminar um maior número de vacas no início da estação de monta sem a detecção de estro, reduz intervalo entre partos, permite a inseminação em dia e hora pré-determinada, além da facilidade no manejo de inseminação das vacas.

Porém, os resultados da IATF ainda são muito variáveis e acreditando que seja possível a obtenção de melhores taxas de concepção em vacas e novilhas, utilizando sêmen refrigerado na IATF, uma vez que o sêmen refrigerado mantém sua viabilidade espermática por mais tempo dentro do trato reprodutivo feminino do que o sêmen congelado.

## 1.3 Referências Bibliográficas

ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da célula**. 3<sup>o</sup> ed. Editora artes médicas, 1997, 1294p.

AMANN, R. P; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

AMANN, R. P; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 1<sup>a</sup>. ed. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993, Cap. 80, p.715- 746.

ANCHIETA, M. C; VALE FILHO, V. R; COLOSIMO, E; SAMPAIO, I. B. M; ANDRADE, V. J. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p.196-204, 2005.

ARRUDA, R. P; CELEGHINI, E. C. C; ANDRADE, A. F. C; RAPHAEL, C. F; PERES, K. R; NEVES, L. C. **Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF.** In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2006, Londrina, PR. p.157-164.

BALL, B. A; VO, A. T; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n. 4, p.508-515, 2001.

BARUSELLI, P. S; REIS, E. L; MARQUES, M. O; NASSER, L. F; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**. v. 82-3, p.479-86, 2004a.

BARUSELLI, P. S; REIS, E. L; CARVALHO, N. A. T; CARVALHO, J. B. P. **eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device.** In: International Congress on Animal Reproduction-Icar. Porto Seguro. Proceedings. 2004b.

BARUSELLI, P. S; MARQUES, M. O; CARVALHO, N. A. T; MADUREIRA, E. H; CAMPOS FILHO, E. P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.218–221, 2002.

BATELLIER, F; VIDAMENT, M; FAUQUANT, J; DUCHAMP, G; ARNAUD, G; YVON, J. M; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p. 181-190, 2001.

BEDFORD, J. M. & HOSKINS, D. D. **The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology.** In: Lamming, G. E. Marshall's Physiology of Reproduction. V.2. London, Churchill Livingstone, 1990. pp. 379-568.

BERNARDI, M. L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.5-16, 2008.

BERTOZZO, B. R, ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da adição do colesterol ao meio de incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal.** 10, 2008. Disponível em: <http://www.propp.ufms.br>. Acesso em 05 de Maio, 2013.

BILODEAU, J. F; CHATTERJEE, S; SIRARD, M. A; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 282-288, 2000.

BRANDÃO, A. C; ARRUDA, R. P; MADUREIRA, E. H; MARTINS, J. F. P; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D; VISINTIN, J. A. Influência do glicerol e etilenoglicol e da criopreservação sobre o complexo DNA-Proteína de espermatozóides em garanhões. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Supl, São Paulo, v. 43, p. 68-73, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Bovinos e Bubalinos, 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 17 abr. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil Projeções do Agronegócio 2010/2011 a 2020/2021. Brasília: MAPA/AGE, 2011. 58 p. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJEC\\_OES%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%200.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJEC_OES%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%200.pdf)>. Acesso em: 17 abril. 2013.

BUCHER, A; KASIMANICKAM, R; HALL, J. B; DEJARNETTE, J. M; WHITTIER, W. D; KÄHN, W; 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, p.1180–1185, 2009.

CARNEIRO, G. F; SILVA, S. V; MEDEIROS, L. R. D; GOMES, N. O; PROCÓPIO, O. C. S. **Utilização prática de sêmen congelado**. In: ASSIST (Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos), 1, 2007. Anais..., Gravatá, PE: ASSIST, 2007. CD-ROM.

COSTA, F. Q. **Degeneração térmica testicular – ocorrência, análise e solução para garantir eficiência reprodutiva de touros**. 2007. 63 f. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução em Bovinos) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2007.

CRESPILHO, M. A; PAPA, O. F. **Uso do sêmen bovino refrigerado como estratégia para o aumento da taxa de concepção dos programas de inseminação artificial em tempo-fixo**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 97 f. 2010.

DELL'AQUA, C. P. F; MONTEIRO, G. A; DELL'AQUA Jr, J. A; PAPA, F. O. The effects of refrigeration temperature and storage time on apoptotic markers in equine semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.27-30, 2013.

FLESCH, F. M; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysic**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FONSECA, V. O. **Fisiologia da Reprodução**. In: Curso de Pós-Graduação “*Latu Sensu*” Tutoria a Distância Julgamento de Raças Zebuínas-FAZU/ABCZ, 1, Uberaba, MG, Módulo V. Uberaba, p.128, 1999.

FOOTE, R. H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1-10, 2002.

GADEA, J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. **Theriogenology**, v.63, p.431-444, 2005.

GIL, M. A; ALMIÑANA, C; ROCA, J; VÁZQUEZ, J. M; MARTÍNEZ, E. A. Boar semen variability and its effects on IVF efficiency. **Theriogenology**, v.70, p .1260-1268. 2008.

GIRAUD, M. N; MOTTA, C; BOUCHER, D; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, p. 2160-2164, 2000.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, n.1, p.131-147, 1996.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. Capítulo 04. Ciclos reprodutivos. **Reprodução Animal**. 7ª edição. 499 páginas. Barueri: Manole LTDA, 499 páginas. p: 55-68. 2004.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 03-22, 2000.

MARTÍNEZ, M. F; KASTELIC, J. P; BÓ, G. A; CACCIA, M; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR- treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v 86. p. 37-52. 2005.

MARQUES, D. C. **Criação de bovinos**. 7. Ed. ver, atual e ampliada. Belo Horizonte: CVP- Consultoria Veterinária e Publicações, 2006. Cap. 4, p. 269-271.

MEDEIROS, C. M; FORELL, F; OLIVEIRA, A. T; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, n.1, p.327-344, 2002.

MILISTETD, F. **Sincronização de estro em fêmeas bovinas de corte**. 2006, 34 f. Monografia (Especialista) - Curso de pós-graduação "Lato Sensu" em Produção e Reprodução de Bovinos. Universidade Castelo Branco, Piracicaba, 2006.

MORAN, D. M. **Effects of cooling rate and storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa**. 1992, 178 f. Dissertação (Mestrado) – Colorado State University. 1992.

MORAES, E. A; GRAHAM, J. K; TORRES, C. A. A; MEYERS, M; SPIZZIRI, B. Delivering cholesterol of cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.148–154, 2010.

OHASHI, O. M. Inseminação Artificial de Bubalinos. In: GONSALVES, P. B., FIQUEIREDO, J. R, FREITAS, V. J. F., **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. Livraria Varela, p. 97-110, 2001.

PAPA, F. O; CRESPILO, A. M; FREITAS DELL AQUA, C. P., DELL AQUA JR, J. A. **Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação**. Biotecnologia da reprodução em bovinos, In: 3º Simpósio internacional de reprodução aplicada. 2008.

PAPA, F. O; GABALDI, S. H; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.24, p.39-44, 2000.

PARKS, J. E. **Hypothermia and Mammalian gametes**, In: KAROW, A. M; CRITSER, J. K. (Eds.) *Reproduction Tissue Banking: scientific principles*. San Diego: Academic Press, 1997. p. 229-261.

PAULENZ, H; SODERQUIST, L; PÉREZ-PÉ, R; BERG, K. A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology**, v.57, p.823-836, 2002.

PENTEADO, L; SÁ FILHO, M. F; REIS, E. L; TORRES-JÚNIOR, J. R; MADUREIRA, E. H; BARUSELLI, P. S. **Eficiência reprodutiva em vacas Nelore (Bos indicus) lactantes submetidas a diferentes manejos durante a estação de monta**. Anais XVI Reunião do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005.

PEÑA, F. J; SARAVIA, F; JOHANNISSON, A; WALGREN, M; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**. v.28, p.107-114, 2005.

PESCH, S; HOFMANN, B. Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. **Journal fur Reproductionsmedizin Endokrinologie**, V2, p. 101-105. 2007.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. **Methods for semen evaluation and their relationship to fertility**. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. *Anais: Palestra...* Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005. 8 f. CD-ROM. 2005.

SÁ FILHO, M. F; AIRES, H; FERREIRA, R. M; MARQUES, M. O; REIS, E. L; SILVA, R. C. P; RODRIGUES, C. A; MADUREIRA, E. H; BÓ, G. A; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v.73, p.651-658, 2010.

SANTOS, O. E. C. **Viabilidade in vitro do sêmen de cão submetido a congelação com diferentes diluidores e crioprotetors**. Belo Horizonte, MG: UFMG. 60 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária**. ano 28. Jan-Fev. 2009.

SILVA, L. D. M; SILVA, A. R; CARDOSO, R. C. S; GONSALVES, P. B. D; FIGUEIREDO, J. R; FREITAS, V. J. F. (Eds). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002.

SIQUEIRA, L. C; OLIVEIRA, J. F. C; LOGUÉRCIO, R. S; LOF, H. K; GONÇALVEZ, P. B. D. Sistema de inseminação artificial de em dois dias com

observação de estro ou em tempo fixo para vacas de corte amamentando. **Ciência Rural**, v.38, n.2, mar-abril, 2008.

SIQUEIRA, J. B. **Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com teste de avaliação espermática in vitro**. 2004. 91 f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

SOUSA, D. B; BICUDO, S. D. Inseminação artificial com sêmen ovino refrigerado por 24 horas e transportado no sistema Equitainer®. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.330-332, 2003.

STALHAMMAR, E. M; JANSON, L; PHILIPSSON, J. The impact of sperm motility on nonreturn rate in pre-selected dairy bulls. **Reproduction Nutrition Development**, v. 34, p. 37-45, 1994.

STORNELLI, M. C; TITTARELLI, C. M; SAVIGNONE, C. A; STORNELLI, M. A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinária**, v.25, n.2, p.28-35, 2005.

SUGULLE, A. H; BHUIYAN, M. M. U; SHAMSUDDIN, M. Breeding soundness of bulls and the quality of their frozen semen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. **Livestock Research for Rural Development**, v.18, n.54, 2006.

VALLE, G. R; SILVA FILHO, J. M. Membrana plasmática do espermatozóide. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 36, p. 45-53, 2001.

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

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

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

ZÚCCARI, C. E. N; LEITE, P. A; PASSOS, T. S; CARRIJO, P. R; KIEFER, C. Correlação entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide bovino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.3, p 678-684, 2009.

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

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

## 2 – OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a qualidade do sêmen refrigerado de bovinos, bem como a taxa de concepção de novilhas e vacas lactantes da raça Nelore inseminadas com sêmen refrigerado e congelado após protocolo de inseminação artificial em tempo fixo.

Os objetivos específicos são:

1. Avaliar a qualidade do sêmen refrigerado de bovinos em diferentes métodos de refrigeração, sendo geladeira Minitub<sup>®</sup> a 5°C (Minitub, Porto Alegre- RS) e caixa Botuflex<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu- SP) por até 72 horas de refrigeração.
2. Avaliar a taxa de concepção de vacas pluríparas lactantes da raça Nelore inseminadas com sêmen congelado e refrigerado após protocolo de IATF.
3. Avaliar a taxa de concepção de novilhas da raça Nelore inseminadas com sêmen congelado e fresco após protocolo de IATF.



### 3 - TRABALHO CIENTÍFICO

#### **USO DE SÊMEN FRESCO E REFRIGERADO EM PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM FÊMEAS BOVINAS**

##### *USE OF FRESH AND COOLED SEMEN IN FIXED TIME ARTIFICIAL INSEMINATION PROGRAMS IN BOVINE FEMALES*

SILVA, Natalia do Carmo<sup>1</sup>; LEÃO, Karen Martins<sup>1</sup>; SILVA, Rossane Pereira da<sup>1</sup>;  
RODRIGUES, Moraima Castro<sup>1</sup>; MARQUES, Thaisa Campos<sup>1</sup>; SILVA, Felipe  
Gustavo Santana da<sup>1</sup>; DIAS, Mariana Borges de Castro<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano - Câmpus Rio Verde, Programa de pós-graduação em Zootecnia, Rio Verde, Goiás, Brasil.

\*Endereço para correspondência: nataliazootec@hotmail.com

**RESUMO:** Experimento I: Refrigeração de sêmen. O ejaculado foi diluído com diluente Bovimix<sup>®</sup> e submetido a dois sistemas de refrigeração, sendo caixa Botuflex<sup>®</sup> e geladeira Minitub<sup>®</sup> à 5°C, as amostras foram avaliadas quanto ao percentual de motilidade total, motilidade progressiva, vigor e integridade de membrana. O Experimento I foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, sendo os dados analisados por ANOVA pelo teste t a 5%, através do Assisat versão 7.6 beta. Experimento II: Foram utilizadas 53 vacas, divididas em três grupos: Grupo I (n=19) IATF com sêmen congelado com concentração de  $16 \times 10^6$  espermatozoides, Grupo II (n=15) IATF com sêmen refrigerado com concentração de  $32 \times 10^6$  espermatozoides e Grupo III (n=19) IATF com sêmen refrigerado com concentração de  $64 \times 10^6$  espermatozoides, Experimento III: Foram utilizadas 77 novilhas, divididas em dois grupos: Grupo I (n=38) IATF com sêmen congelado com concentração de  $10 \times 10^6$  espermatozoides e Grupo II (n=39) IATF com sêmen fresco com concentração de  $30 \times 10^6$  espermatozoides. Foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso, as taxas de concepção foram analisadas através do procedimento MIXED do SAS. Nenhum dos parâmetros avaliados do sêmen bovino refrigerado diferiram entre os tratamentos em nenhum dos momentos avaliados. As taxas de concepção dos experimentos II e III diferiram entre si. Conclui-se que os sistemas de refrigeração foram semelhantes para

manutenção da viabilidade espermática. O sêmen refrigerado com alta concentração espermática melhorou a taxa de concepção de vacas nelore inseminadas por IATF. No entanto, em novilhas o sêmen congelado apresentou melhor taxa de concepção quando comparado com o sêmen fresco.

**Palavras-chaves:** Bovinos. Qualidade do sêmen. Refrigeração. Taxa de concepção

**ABSTRACT:** Experiment I: Cooled semen. The ejaculate was diluted in Bovimix<sup>®</sup> dilutant and submitted to two cooled systems, in a Botuflex<sup>®</sup> box and Minitub<sup>®</sup> refrigerator at 5°C, sample evaluated as to percentage of total motility, progressive motility, vigor and membrane integrity. Experiment I was carried out in a completely randomized design and the data analyzed by ANOVA using t test at 5%, using the Assistat software, version 7.6 beta. Experiment II: We used fifty-three lactating Nelore cows, randomly divided in the following groups: Group I (n=19 cows) FTAI using semen frozen on the farm with  $16 \times 10^6$  spermatozoids; Group II (n=15 cows) IATF using cooled semen with  $32 \times 10^6$  spermatozoa; Group III (n=19 cows) FTAI using cooled semen with  $64 \times 10^6$  spermatozoa. Experiment III: We used 77 Nelore heifers, randomly divided in the following groups: Group I (n= 39 heifers) FTAI using fresh semen with  $30 \times 10^6$  spermatozoa, Group II (n=38 heifers) FTAI using frozen semen with  $10 \times 10^6$  spermatozoa. Were carried out in a completely randomized design and conception rates were analyzed using the MIXED of SAS. None of the evaluated parameters of bovine cooled semen differ between treatments in any of the time points evaluated. The conception rates of the experiment II and III were different. It was concluded that the cooled system were similar for maintaining sperm viability. The cooled semen with high sperm concentration improved the conception rate of Nelore cows inseminated by FTAI while in heifers the frozen semen presented a better conception rate compared with fresh semen.

**Keywords:** Conception rate. Cattle. Refrigeration. Semen quality.

## INTRODUÇÃO

O impacto genético na indústria de inseminação artificial (IA) é limitado pelo processo de criopreservação que danifica as organelas e membranas dos espermatozoides, induzindo também mudanças na capacitação espermática e reação acrossomal interferindo na capacidade de fertilização do touro (GARNER et al., 2001).

Devido ao processo de criopreservação que compreende diluição, armazenamento, envase, refrigeração, congelamento e descongelamento, o sêmen congelado apresenta fertilidade reduzida quando comparado ao sêmen fresco e refrigerado (WATSON, 2000).

Durante a criopreservação a célula espermática passa por uma série de estresse térmico, osmótico e tóxico, além de rápidas alterações de volume celular que causam danos à membrana plasmática resultando em queda de fertilidade (GIRAUD et al., 2000).

O tempo de viabilidade do sêmen depende da qualidade espermática inicial, da temperatura de conservação e do diluente utilizado. A temperatura utilizada para refrigeração do sêmen varia de 4° a 5°C. Podendo ser armazenado por período de quatro a nove dias, permitindo um pouco mais de flexibilidade de uso quando comparado ao sêmen fresco (SILVA et al., 2002).

Pesquisas indicam que a utilização do sêmen refrigerado de bovino apresenta como principais vantagens a otimização de touros geneticamente superiores que possuem baixa resistência ao congelamento do sêmen, ausência de custos relacionados à estocagem e simplicidade na sua manipulação/utilização na IA quando comparado ao sêmen congelado (VISHWANATH et al., 2003).

Segundo CRESPILO et al. (2010) o sêmen refrigerado por 24 horas representa uma estratégia eficiente para o aumento da taxa de concepção de vacas inseminadas em tempo fixo, apresentando uma alternativa altamente viável do ponto de vista econômico e biológico.

BUCHER et al. (2009) obtiveram melhores resultados de taxa de concepção comparando o sêmen fresco de bovino por 24 horas com uma concentração de  $3 \times 10^6$  espermatozoides totais e sêmen congelado com  $20 \times 10^6$  espermatozoides/palheta, demonstrando que mesmo com uma redução de 85% na dose inseminante a IA foi compensada pela maior qualidade dos espermatozoides.

Objetivou-se avaliar diferentes sistemas de refrigeração de sêmen bovino, bem como a taxa de concepção de novilhas e vacas lactantes da raça Nelore inseminadas com sêmen refrigerado e congelado após protocolo de inseminação artificial em tempo fixo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Experimento I:*

Para avaliar diferentes sistemas de refrigeração de sêmen bovino por um período de 72 horas foi desenvolvido o Experimento I. Foram realizadas seis colheitas de sêmen de cinco touros da raça Nelore de 4 a 8 anos, mantidos a pasto e com suplementação mineral *ad libitum*. Os touros foram previamente selecionados por exame andrológico e apresentavam qualidade de sêmen dentro dos padrões determinados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), com motilidade total acima de 70%.

As colheitas foram realizadas através de eletroejaculador (Eletrovet<sup>®</sup>-SP) em tronco de contenção. Antes da colheita o prepúcio era higienizado para evitar contaminação das amostras.

O ejaculado foi diluído com diluente Bovimix<sup>®</sup> (Nutricell, Campinas-SP) para a concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides móveis por mL e após diluídas e homogeneizadas as amostras foram divididas em dois tubos de centrifuga de 15 mL previamente identificadas com o touro. As amostras foram submetidas a dois sistemas de refrigeração, sendo geladeira Minitub<sup>®</sup> (Minitub, Porto Alegre-RS) a 5°C e em caixa Botuflex<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu-SP) a 5°C com duas fontes de gelo, as quais foram trocadas a cada 24 horas de refrigeração.

Imediatamente após a colheita o sêmen foi avaliado pelos aspectos físicos, sendo percentual de motilidade total (MT), percentual de motilidade progressiva (MP), vigor espermático (V; 0 a 5), e percentual de espermatozoides vivos e mortos (IM).

A motilidade total, progressiva e o vigor foram avaliados através de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas avaliadas em microscópio óptico com aumento de 200 vezes (CBRA, 1998).

A avaliação da integridade da membrana plasmática foi realizada através de esfregaço de sêmen corado com eosina/nigrosina sendo avaliadas 100 células. A eosina penetra no espermatozoide quando a membrana plasmática está rompida, e a nigrosina torna o fundo da lâmina escuro, permitindo a detecção do espermatozoide vivo, não corado (BRITO, 2007).

As amostras foram avaliadas nos seguintes momentos, logo após a diluição (T0), 24 horas após o início da refrigeração (T24), 48 horas após o início da refrigeração (T48) e 72 horas após o início da refrigeração (T72). Para as avaliações nos momentos T24, T48 e T72 horas foi retirados uma alíquota de sêmen e depositado em eppendorf e aquecidas a 37°C por 10 segundos em banho-maria.

### *Experimento II:*

Para avaliar a taxa de concepção de vacas pluríparas lactantes da raça Nelore inseminadas com sêmen congelado e refrigerado em diferentes concentrações após protocolo de IATF foi desenvolvido o Experimento II.

O estudo foi realizado em uma propriedade localizada no município de Rio Verde, Goiás, Brasil. Foram utilizadas 53 vacas lactantes da raça Nelore que foram mantidas em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, com bebedouro de água e cocho para fornecimento de sal mineral *ad libitum*. Foram utilizadas somente as vacas lactantes que estavam com escore de condição corporal médio de 3,5 (escala 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 muito gorda, segundo FERGUSON et al. (1994).

As vacas foram divididas e distribuídas aleatoriamente em três grupos, sendo Grupo I (n=19) as vacas foram inseminadas por IATF com sêmen congelado na propriedade com uma concentração total de  $16 \times 10^6$  espermatozoides móveis, no Grupo II (n=15) as vacas foram inseminadas por IATF com sêmen refrigerado em caixa Botuflex<sup>®</sup> por 8 horas, com uma concentração total de  $32 \times 10^6$  espermatozoides móveis e no Grupo III (n=19) as vacas foram inseminadas por IATF com sêmen refrigerado em caixa Botuflex<sup>®</sup> por 8 horas, com uma concentração total de  $64 \times 10^6$  espermatozoides móveis.

Neste experimento foi utilizado um touro nelore de fertilidade comprovada. A colheita de sêmen foi realizada com eletroejaculador em tronco de contenção. Antes da colheita o prepúcio foi higienizado evitando a contaminação das amostras.

Para a refrigeração, o ejaculado foi diluído com diluente Bovimix<sup>®</sup> (Nutricell, Campinas-SP). Após diluídas e homogeneizadas as amostras foram colocadas em tubos de centrifuga de 15 mL em caixa Botuflex<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu-SP) com duas fontes de gelo por 8 horas, identificadas com a concentração utilizada. No momento da IA o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL.

Para a congelação do sêmen, o ejaculado foi diluído com diluente Bovimix<sup>®</sup>. Após diluídas e homogeneizadas as amostras, foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, previamente identificadas com o nome do touro e concentração utilizada. Em seguida foram colocadas em uma bandeja de aço telada mantida em geladeira a 5°C por três horas. Após a refrigeração as bandejas foram colocadas em caixa de isopor por 15 minutos no vapor de nitrogênio. Posteriormente as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio e raqueadas para armazenagem em botijão de nitrogênio. No momento da inseminação o sêmen foi descongelado a 37°C por 30 segundos.

Foi avaliada a qualidade do sêmen pós-descongelação, sendo descongelada uma palheta de sêmen por 30 segundos em banho-maria a 37°C. A avaliação procedeu em microscópio óptico com uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas, e foi observado 60% de motilidade total pós-descongelação, totalizando  $16 \times 10^6$  espermatozoides móveis por palheta.

As vacas apresentavam em média 47 dias pós-parto no dia do início do protocolo. Para a sincronização da ovulação as vacas receberam no dia zero (D0) um dispositivo intravaginal contendo um grama de progesterona (DIB<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, Cotia, São Paulo, Brasil) e aplicação de 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (Bioestrogen<sup>®</sup>, Biogénesis-Bagó, Garin, província de Buenos Aires, Argentina). Aos nove dias (D9) foi retirado o implante e aplicados 10 mg de Dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup>, Pfizer, São Paulo, Brasil) 0,6 mg de Cipionato de Estradiol (ECP<sup>®</sup>, Pfizer, Pharmacia and Upjohn Company, NY, USA), e 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (Sincro eCG<sup>®</sup>, Ouro Fino, Uberaba, Minas Gerais, Brasil). Decorridos 48 horas (D11) os animais foram inseminados e aplicados 0,004 mg de acetato de buserelina (SincroForte<sup>®</sup>, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil).

### *Experimento III:*

Para avaliar a taxa de concepção de novilhas da raça Nelore inseminadas com sêmen congelado e fresco após protocolo de IATF foi desenvolvido o Experimento III. O estudo foi realizado em uma propriedade localizada no município de Rio Verde, Goiás, Brasil. Foram utilizadas 77 novilhas da raça Nelore, submetidas ao exame ultrassonográfico e somente as novilhas que apresentavam útero e ovários aptos e escore de condição corporal médio de 3 (escala 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 muito gorda, segundo FERGUSON et al., 1994) participaram do experimento.

As novilhas foram mantidas em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, com bebedouro de água e cocho com fornecimento de sal mineral *ad libitum*.

As novilhas foram divididas e distribuídas aleatoriamente em dois grupos, sendo que no Grupo I (n=39) as novilhas foram inseminadas por IATF com sêmen fresco com um total de  $30 \times 10^6$  espermatozoides móveis, e no Grupo II (n=38) as novilhas foram inseminadas por IATF com sêmen congelado comercial da Lagoa da Serra<sup>®</sup>, do mesmo touro utilizado no grupo I, com concentração total de  $10 \times 10^6$  espermatozoides móveis.

A colheita de sêmen foi realizada com eletroejaculador em tronco de contenção. Antes da colheita o prepúcio foi higienizado evitando a contaminação da amostra. Após a colheita foi realizada a análise dos percentuais de motilidade total, progressiva e vigor através de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula em microscópio óptico, observando o percentual de 85% de motilidade total, 75% de motilidade progressiva e 4 de vigor.

O ejaculado foi diluído com diluente Bovimix<sup>®</sup>, e após diluídas e homogeneizadas as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e mantidas em caixa Botuflex<sup>®</sup> até o momento da IATF.

Para sincronização da ovulação as novilhas receberam no dia zero (D0) um dispositivo intravaginal contendo 0,75 grama de progesterona (Prociclar, Hertape Calier Saude Animal S/A, Juatuba, MG, Brasil) e aplicação de 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (Benzoato HC, Hertape Calier Saude Animal S/A, Juatuba, MG, Brasil). Aos sete dias (D7) foi aplicado 0,15 mg de D-Cloprostenol (Veteglan Luteolítico<sup>®</sup>, Hertape Calier Saude Animal S/A, Juatuba, MG, Brasil). No dia seguinte (D8) foi retirado o implante e aplicados 1 mg de Cipionato de Estradiol (Cipionato HC, Hertape Calier Saude Animal S/A, Juatuba, MG, Brasil) e 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (Folligon<sup>®</sup>, Intervet International B.V., Boxmeer, Holland). Decorridos 48 horas (D10) os animais foram inseminados.

#### *Diagnóstico de gestação:*

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 35 dias após a IATF por meio de exame de ultrassonografia utilizando o equipamento Ultrasson Veterinária KX 2600<sup>®</sup>. Foi considerada prenha a fêmea que ao ser examinada apresentou vesícula embrionária

com líquido, não ecogênico e presença de um embrião com batimentos cardíacos (NEVES et al., 2008).

*Delineamento estatístico:*

O Experimento I foi conduzido em um delineamento inteiramente ao acaso. As informações foram colhidas e sistematizadas em planilhas eletrônicas. Os bancos de dados gerados foram analisados por ANOVA pelo teste t a 5% de probabilidade, através do Assistat versão 7.6 beta (ASSISTAT, 2013), cujo modelo matemático proposto é:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Em que:

$Y_{ij}$  = variáveis dependentes;

$\mu$  = média geral de todas as observações;

$T_i$  = efeito do i-ésimo tratamento (i=1 e 2);

$e_{ij}$  = erro aleatório residual, NID (0,  $\sigma^2$ ).

Os Experimentos II e III foram conduzidos em um delineamento inteiramente ao acaso. As taxas de concepção obtidas durante os experimentos foram analisadas usando o procedimento MIXED do SAS (SAS, 2000).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Logo após a colheita e diluição o sêmen foi avaliado e foi observado um percentual de 92,67% de motilidade total, 87,67% de motilidade progressiva, 3,9% de vigor e 90,70% de integridade de membrana.

Para facilitar o transporte e refrigeração do sêmen são bastante utilizados caixas isotérmicas comerciais que visam manter a temperatura de refrigeração adequada reduzindo as perdas de viabilidade do sêmen. São utilizadas várias temperaturas de armazenamento do sêmen refrigerado, entretanto as temperaturas de 5°C e 15°C são mais comumente utilizadas (LIMA, 2010).

Quando a refrigeração é realizada de forma lenta até 5°C, torna-se possível o armazenamento do sêmen por longos períodos mantendo assim a viabilidade



espermática. Esses sistemas de resfriamento passivo levam a redução da temperatura do sêmen, reduz o metabolismo espermático além da diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio (SQUIRES, 1999).

O presente estudo avaliou diferentes sistemas de refrigeração de sêmen bovino por até 72 horas, no intuito de avaliar a manutenção da viabilidade dos espermatozoides e observou que após 24 horas de refrigeração a 5°C não foi observada diferença estatística em nenhum dos parâmetros entre os tratamentos avaliados, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios do percentual de motilidade total, percentual de motilidade progressiva, vigor (0 a 5) e percentual de integridade de membrana frente a dois sistemas de refrigeração, sendo geladeira Minitub<sup>®</sup> e caixa Botuflex<sup>®</sup>, após 24 horas de refrigeração

|                                | <b>Geladeira</b> | <b>Caixa</b> | <b>CV %</b> |
|--------------------------------|------------------|--------------|-------------|
| <b>Motilidade Total</b>        | 90,00 a          | 87,00 a      | 9,04        |
| <b>Motilidade Progressiva</b>  | 85,00 a          | 82,00 a      | 9,58        |
| <b>Vigor (0 a 5)</b>           | 3,96 a           | 3,86 a       | 7,06        |
| <b>Integridade de Membrana</b> | 89,13 a          | 90,93 a      | 8,60        |

\*Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente a um nível de significância de 5% (P >0,05).

Após 48 horas de refrigeração a 5°C não foi observada diferença estatística em nenhum dos parâmetros entre os tratamentos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios do percentual de motilidade total, percentual de motilidade progressiva, vigor (0 a 5) e percentual de integridade de membrana frente a dois sistemas de refrigeração, sendo geladeira Minitub<sup>®</sup> e caixa Botuflex<sup>®</sup>, após 48 horas de refrigeração

|                                | <b>Geladeira</b> | <b>Caixa</b> | <b>CV %</b> |
|--------------------------------|------------------|--------------|-------------|
| <b>Motilidade Total</b>        | 85,21 a          | 84,37 a      | 14,22       |
| <b>Motilidade Progressiva</b>  | 80,21 a          | 79,37 a      | 15,11       |
| <b>Vigor (0 a 5)</b>           | 3,75 a           | 3,62 a       | 15,03       |
| <b>Integridade de Membrana</b> | 92,65 a          | 91,58 a      | 6,76        |

\*Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente a um nível de significância de 5% (P >0,05).

Após 72 horas de refrigeração a 5°C não foi observada diferença estatística em nenhum dos parâmetros entre os tratamentos avaliados, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios de percentual de motilidade total, percentual de motilidade progressiva, vigor (0 a 5) e percentual de integridade de membrana frente a dois sistemas de refrigeração, sendo geladeira Minitub<sup>®</sup> e caixa Botuflex<sup>®</sup>, após 72 horas de refrigeração

|                                | <b>Geladeira</b> | <b>Caixa</b> | <b>CV %</b> |
|--------------------------------|------------------|--------------|-------------|
| <b>Motilidade Total</b>        | 86,16 a          | 80,70 a      | 14,87       |
| <b>Motilidade Progressiva</b>  | 77,21 a          | 75,75 a      | 15,87       |
| <b>Vigor (0 a 5)</b>           | 3,75 a           | 3,62 a       | 15,03       |
| <b>Integridade de Membrana</b> | 90,70 a          | 91,51 a      | 7,11        |

\*Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente a um nível de significância de 5% ( $P > 0,05$ ).

Semelhantes aos resultados obtidos neste trabalho, FARRAS et al. (2008) não observaram diferença estatística entre os parâmetros de motilidade e integridade de membrana ao avaliarem o sêmen equino submetido a dois sistemas de refrigeração, com temperaturas de 5°C e 15°C, por 24 horas.

DELL'AQUA et al. (2013) ao avaliarem o sêmen equino submetido a refrigeração de 5°C e 15°C por até 72 horas, observaram que a refrigeração manteve uma boa qualidade do sêmen por até 24 horas de refrigeração. Porém, após 48 horas foi observada queda significativa na viabilidade espermática em ambos os sistemas avaliados.

O'HARA et al. (2010) avaliaram a viabilidade espermática do sêmen de carneiros nas temperaturas de 5°C e 15°C por um período de 72 horas, e observaram que o sêmen refrigerado a 5°C manteve a viabilidade relativamente constante entre 24 e 72 horas, no entanto a 15°C houve o decréscimo linear na viabilidade.

AVANZI et al. (2006) avaliaram a eficiência dos diferentes sistemas de refrigeração sobre a viabilidade do sêmen equino em ambiente com temperaturas elevadas e observaram que a temperatura externa não alterou a temperatura de armazenamento dos diferentes sistemas de refrigeração, demonstrando que os mesmos possuem boa capacidade isotérmica mantendo a viabilidade espermática.

VITA et al. (2011) testando dois sistemas de refrigeração sendo Equitainer<sup>®</sup> e Botutainer<sup>®</sup> em comparação com o refrigerador Minitub<sup>®</sup>, para avaliar os parâmetros de motilidade total, progressiva, vigor e integridade de membrana, observaram que tanto os sistemas de transporte refrigerado quanto os refrigeradores foram eficientes na manutenção da viabilidade espermática do sêmen equino.

A integridade de membrana é um importante parâmetro de qualidade seminal, e em nenhum dos momentos avaliados foi observada diferença estatística na integridade de membrana entre os sistemas de refrigeração. AURICH (2005) observou que a membrana dos espermatozoides bovinos sofre menos alterações quando submetida variações de temperatura, por causa da proporção colesterol/fosfolipídios da membrana, diferente das espécies de equinos e suínos que possuem menor proporção colesterol/fosfolipídios.

COCCHIA et al. (2011) verificaram no sêmen equino uma redução significativa no percentual de espermatozoides com membrana íntegra após 24 horas de refrigeração a 5°C e segundo WALTERS et al. (2004) somente os espermatozoides com membrana íntegra são capazes de interagir com o ovócito e iniciar o processo de fertilização.

A inseminação artificial com sêmen refrigerado é uma alternativa viável, pois a refrigeração atua na manutenção da viabilidade do mesmo por longos períodos aumentando assim as taxas de concepção na IATF e principalmente pelo alto número de touros que apresentam baixa congelabilidade, sendo esta uma das principais causas do aumento do uso do sêmen refrigerado (SEVERO, 2009).

Neste trabalho avaliou-se a taxa de concepção de vacas pluríparas da raça Nelore inseminadas por IATF com sêmen congelado e refrigerado em diferentes concentrações e foi observada diferença estatística na taxa de concepção das vacas inseminadas por IATF com sêmen congelado e refrigerado em diferentes concentrações, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Taxa de concepção de vacas múltiparas da raça Nelore inseminadas por IATF com sêmen congelado e refrigerado em diferentes concentrações

| <b>Grupos</b>                        | <b>Taxa de Concepção (%)</b> |
|--------------------------------------|------------------------------|
| Sêmen Congelado 16x10 <sup>6</sup>   | 42,11 b                      |
| Sêmen Refrigerado 32x10 <sup>6</sup> | 40,00 c                      |
| Sêmen Refrigerado 64x10 <sup>6</sup> | 57,89 a                      |

\*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a um nível de significância de 5% de probabilidade (P<0,05).

O sêmen refrigerado com alta concentração espermática (64x10<sup>6</sup>) apresentou melhor taxa de concepção sendo esta de 57,89%, e resultou na redução do intervalo

entre partos de 15,78% das vacas inseminadas quando comparado com o sêmen congelado. Esses resultados podem ser atribuídos ao processo de congelação do sêmen, que ocasionam danos físicos, bioquímicos ou funcionais aos espermatozoides (CELEGHINI, 2005).

Semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, CRESPILO et al. (2012) observaram diferença estatística na taxa de concepção de vacas nelore inseminadas com sêmen refrigerado e congelado. Com taxas de concepção de 45,71% com sêmen congelado e 61,49% com sêmen refrigerado.

Diversos estudos têm demonstrado que o uso do sêmen refrigerado vem se destacando no cenário nacional e internacional, sendo as principais vantagens a necessidade de menor concentração espermática por dose inseminante, menor custo de estocagem, utilização de touros geneticamente superiores e maior viabilidade espermática quando comparado com o sêmen congelado que apresenta menor vida útil dentro do trato reprodutivo feminino (CURRY, 2000).

BUCHER et al. (2009) ao avaliarem a taxa de concepção de vacas *Angus* inseminadas por IATF com sêmen fresco e congelado, não observaram diferença estatística entre os grupos avaliados.

Segundo VISHWANATH et al. (2003) o uso do sêmen refrigerado apresenta como principais vantagens a otimização de touros geneticamente superiores que possuem baixa resistência ao congelamento do sêmen, ausência de custos relacionados a estocagem e simplicidade na sua manipulação/utilização na IA quando comparado ao sêmen congelado.

JANETT et al. (2003) observaram que células criopreservadas apresentam menor viabilidade e menor quantidade de espermatozoides com membrana íntegra quando comparado com o sêmen fresco. Bem como CRESPILO (2010) ressalta que o sêmen bovino refrigerado possui maior número de espermatozoides com membrana íntegra resultando em maior capacidade de fertilização, justificando sua superioridade em relação ao sêmen congelado.

O processo de criopreservação é responsável pelo decréscimo de 50% a 60% na viabilidade dos espermatozoides, observando diversas alterações bioquímicas e estruturais abrangendo os diversos compartimentos anatômicos da célula espermática (CHAVEIRO et al., 2006).

Segundo MARQUES et al. (2008) inseminações com sêmen refrigerado geralmente têm demonstrado taxas de concepção superiores a 70%. De acordo com

YOSHIDA (2000) o uso do sêmen refrigerado permite a redução da dose inseminante para a maioria dos reprodutores em função da maior qualidade dos espermatozoides. Entretanto, neste experimento quando a dose inseminante do sêmen refrigerado foi reduzida de  $64 \times 10^6$  para  $32 \times 10^6$  de espermatozoides móveis houve redução na taxa de concepção quando comparado com o sêmen congelado.

ANDERSSON et al. (2004) ressalta que inseminações com reduzida concentração espermática ( $2 \times 10^6$ ), sem sincronização de estro resulta em baixas taxas de concepção quando comparadas com doses contendo maior concentração ( $15 \times 10^6$ ).

NEHRING & ROTHE (2003) observaram que a redução da dose inseminante de 15 para cinco milhões de células totais resultou em queda significativa de 3 a 5% nos índices de fertilidade, independente do meio diluidor utilizado para a criopreservação espermática.

Ao avaliar a taxa de concepção de novilhas da raça Nelore inseminadas por IATF com sêmen congelado e fresco, observou-se que a taxa de concepção das novilhas inseminadas com sêmen congelado (55,26%) foi maior do que nas novilhas inseminadas com sêmen fresco (48,72%), como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Taxa de concepção de novilhas da raça Nelore inseminadas por IATF com sêmen congelado e fresco em diferentes concentrações

| <b>Grupos</b>                    | <b>Taxa de Concepção (%)</b> |
|----------------------------------|------------------------------|
| Sêmen Congelado $10 \times 10^6$ | 55,26 a                      |
| Sêmen Fresco $30 \times 10^6$    | 48,72 b                      |

\*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a um nível de significância de 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

Diferente dos resultados obtidos neste estudo, FUJITA et al. (2011) não observaram diferença estatística das novilhas inseminadas por IATF com sêmen refrigerado e congelado. Com taxa de concepção de 48,94% com sêmen refrigerado e 46,94% com sêmen congelado.

AVILÉS (2006) avaliaram novilhas inseminadas com sêmen refrigerado e congelado com diferentes concentrações, sendo  $30 \times 10^6$  e  $60 \times 10^6$  respectivamente, e observaram taxas de concepção semelhantes entre os grupos avaliados.

Cerca de 30%, dos espermatozoides bovinos congelados, apresentam alterações compatíveis com capacitação, observando correlação positiva entre porcentagem de espermatozoides não capacitados e taxa de não retorno ao estro após inseminação artificial (VERSTEGEN et al., 2002).

Durante as etapas de congelamento ocorrem modificações nas membranas espermáticas que se assemelham as ocorridas nas células capacitadas, levando a hipótese que a criopreservação promove a capacitação dos espermatozoides, resultando em menor longevidade do espermatozoide criopreservado no trato reprodutivo feminino (SCHEMBRI et al., 2002), sendo necessário que a inseminação artificial com sêmen congelado seja realizada mais próximo da ovulação.

A redução na taxa de concepção das novilhas inseminadas com sêmen fresco pode ser consequência do período entre a inseminação e a ovulação ser curto, insuficiente para completar a capacitação do sêmen fresco. Diante disso, acredita-se que a antecipação da inseminação com sêmen fresco resultaria em melhor taxa de concepção.

## CONCLUSÃO

Os sistemas de refrigeração avaliados foram semelhantes para manutenção da viabilidade espermática por até 72 horas de refrigeração.

O sêmen refrigerado com alta concentração espermática melhorou a taxa de concepção de vacas nelore inseminadas por IATF. No entanto, em novilhas o sêmen congelado apresentou melhor taxa de concepção quando comparado com o sêmen fresco.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, M; TAPONEN, J; KOSKINEN, E; DAHLBOM, M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, p.1583–1588, 2004.

ASSISTAT Software 7.0 Assistência Estatística. Versão 7.6 beta. 2013.

AVANZI, B. R; PAPA, F. O; FARRÁS, M. C; MELO, C. M; ALVARENGA, M. A; ELL'AQUA JR., J. A; MEDEIROS, A. S. L; ARAÚJO, G. H. M. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 152-154, 2006.

AVILÉS, M. **Semen refrigerado o congelado em programas de sincronización de la ovulación para inseminación artificial a tiempo fijo**. In: Jornada de Actualización em Biotecnologías de la Reproducción Bovina – IRAC, Anais, 2006.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Scienc**, v.69, p.65-75, 2005.

BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.249-264, 2007.

BUCHER, A; KASIMANICKAM, R; HALL, J. B; DEJARNETTE, J. M; WHITTIER, W. D; KÄHN, W; 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, p.1180–1185, 2009.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. Ed. – Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre a membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHAVEIRO, A; MACHADO, L; FRIJTERS, A; ENGEL, B; WOELDERS, H. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic Supports. **Theriogenology**, v.65, n.9, p.1875-1890, 2006.

COCCHIA, N; PASOLINI, M. P; MANCINI, R; PETRAZZUOLO, O; CRISTOFARO, I; ROSAPANE, I; SICA, A; TORTORA, G; LORIZIO, R; PARAGGIO, G; MANCINI, A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, p.1201-1210, 2011.

CRESPILHO, M. A; PAPA, F. O; SANTOS, M. P; SA FILHO, M . F. use of cooled bull semen as a strategy to increase the pregnancy rate in fixed-time artificial insemination programs-case report. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v.7, p.175-179, 2012.

CRESPILHO, M. A. **Uso do sêmen bovino refrigerado como estratégia para o aumento da taxa de concepção dos programas de inseminação artificial em tempo-**

**fixo**. 2010. 97 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010.

CURRY, M. R. Cryopreservation of domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.46-52, 2000.

DELL'AQUA, C. P. F; MONTEIRO, G. A; DELL'AQUA Jr, J. A; PAPA, F. O. The effects of refrigeration temperature and storage time on apoptotic markers in equine semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.27-30, 2013.

FARRÁS, M. C; AVANZI, B. R; MELO, C. M; DELL'AQUA JR., J. A; PAPA, F. O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 693-699, 2008.

FERGUSON, J. D; GALLIGAN, D. T; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in holstein cows, **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2695-2703. 1994.

FUJITA, A. S. **Avaliação comparativa do índice de gestação em novilhas da raça nelore sincronizadas para IATF e inseminadas com sêmen resfriado e congelado**. 2011. 50 f. Dissertação – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

GARNER, D. L; THOMAS, C. A; GRAVANCE, C. G; MARSHALL, C. E; DEJARNETTE, M. J; ALLEN, C. H. Seminal Plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, v. 56, p. 31-40, 2001.

GIRAUD, M. N; MOTTA, C; BOUCHER, D; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, p. 2160-2164, 2000.

JANETT, F; THUN, R; NIEDERER, K; BURGER, D; HASSIG, M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. **Theriogenology**, v.60, 453-461. 2003.

LIMA, L. F; MOURA, P; PASSOS, P. I. B; LEAL, D. R; RUMPF, R; NEVES, J. P. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 835-844, 2010.

MARQUES, M. O; BARREIROS, T. R. R; MAX, M. C; SILVA, K. C. F; GOMES, R. G.; SENEDA, M. M. IATF: desafios e soluções para maximizar a eficiência da técnica. **Acta Scientia e Veterinariae** 36(Supl. 2): p.155-160, 2008.

NEHRING, H; ROTHE, L. **Insemination of cryopreserved Bull semen portions with reduced sperm numbers after dilution with two egg yolk-free extenders**. In: EUROPEAN A.I. VETS MEETING, 15., 2003, Budapeste. Anais Palestra... Budapeste, 2003. p.14-23.

NEVES, J. P; DE OLIVEIRA, J. F. C; FREITAS, V. J. F; SIMPLÍCIO, A. A; TEIXEIRA, D. Í. A; ALMEIDA, J. L. **Diagnóstico de prenhez em ruminantes**. In



GONÇALVES, P. B. D; DE FIGUEIREDO, J. R; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal*. Segunda Edição. Editora ROCA LTDA. 2008.

O'HARA, L; HANRAHAN, J. P; RICHARDSON, L; DONOVAN, A; FAIR, S; EVANS, A. C. O; LONERGAN, P. Effects of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 541-549, 2010.

SAS - Statistical Analysis System, 6.03 Cary: NC, USA. SAS Institute INC, p.1028, 2000.

SCHEMBRI, M. A; MAJOR, D. A; SUTTIE, J. J; MAXWELL, W. M. C; EVANS, G. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. **Reproduction, Fertility and Development**, v.14, p.225-233, 2002.

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária**. ano 28. Jan-Fev. 2009.

SILVA, L. D. M; SILVA, A. R; CARDOSO, R. C. S; GONSALVES, P. B. D; FIGUEIREDO, J. R; FREITAS, V. J. F. (Eds). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002.

SQUIRES E. L; PICKET, B. W; GRAHAM, D. K; VANDERWALL, P. M; BRUEMMER, J. E. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n.9 p.3-36,

VERSTEGEN, J; IGUER-OUADA, M; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VITA, B; FELÍCIO, G. B; MELO, C. M; DELL'AGUA Jr, J. A; PAPA, F. O. Utilização de sistemas de refrigeração de sêmen equino na estabilização das amostras seminais previamente à congelação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 120-125, 2011.

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

WALTERS, A. H; EYESTONE, W. E; SAAKE, R. G, PEARSON, R. E, GWAZDAUKAS, F. C. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **Journal of Andrology**, v.25, p.554-563, 2004.

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

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