OCTAVIO FABIÁN BAO TARRAGÓ

**Sêmen refrigerado bovino reduz os danos espermáticos e aumenta a taxa de
prenhez na IATF?**

São Paulo

2017

OCTAVIO FABIÁN BAO TARRAGÓ

**Sêmen refrigerado bovino reduz os danos espermáticos e aumenta a taxa de
prenhez na IATF?**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3442
FMVZ

Tarragó, Octavio Fabián Bao
Sêmen refrigerado bovino reduz os danos espermáticos e aumenta a taxa de prenhez na IATF? / Octavio Fabián Bao Tarragó. -- 2017.
73 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

1. Refrigeração. 2. Criopreservação. 3. Inseminação artificial em tempo fixo. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso do sêmen refrigerado bovino na Inseminação Artificial em Tempo Fixo", protocolada sob o CEUA nº 2786270115, sob a responsabilidade de **Eneiva Carla Carvalho Celeghini e equipe; Octavio Fabián Bao Tarragó** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2016.

We certify that the proposal "Use of bovine semen cooled in Fixed Time Artificial Insemination", utilizing 6 Bovines (6 males), protocol number CEUA 2786270115, under the responsibility of **Eneiva Carla Carvalho Celeghini and team; Octavio Fabián Bao Tarragó** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/06/1** a **04/07/1**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

idade: **23 a 26 meses**

N: **6**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **420 a 450 kg**

Resumo: Os objetivos de este trabalho são verificar que o uso de sêmen refrigerado por 48 horas promove um aumento na taxa de prenhes de vacas submetidas a inseminação artificial a tempo fixo (IATF), quando comparado com o uso de sêmen criopreservado oriundo da mesma amostra seminal. Para o efeito serão realizados 2 experimentos. O experimento 1 será realizado com a seguinte metodologia: serão colhidas amostras seminais de 10 touros da raça Nelore e divididas em quatro frações, fração A, B, C e D, todas com o mesmo volume e concentração espermática. A fração A será submetida ao processo de criopreservação, assim a fração B, C e D serão submetidas a processos de refrigeração durante 24, 48 e 72 horas respectivamente a temperatura de 5°C. A avaliação da qualidade espermática do sêmen refrigerado durante o período de 24, 48 e 72 horas serão, motilidade espermática pelo sistema computadorizado de análises espermáticas (CASA), associação de sondas fluorescentes para determinar simultaneamente integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e função mitocondrial, avaliação das anormalidades espermáticas por contraste de interferência diferencial (DIC). Para a amostra de sêmen submetida a criopreservação, os métodos de avaliação serão os mesmos que para o sêmen refrigerado. No experimento 2, 1.000 fêmeas bovinas serão inseminadas, cada grupo o lote estará conformadas por 100 animais (total 10 grupos). Em cada lote de 100 vacas, 50% de elas serão inseminadas com sêmen criopreservado e outras 50% das vacas com sêmen refrigerado por 48 horas a 5°C. Será realizado diagnóstico de gestação 30 dias após a inseminação artificial através do uso de ultrassonografia retal (Mindray DP10 / 7.5Mhz). Os dados dos experimentos 1 e 2 serão analisados pelo teste de X2 e regressão linear.

Local do experimento: Fazenda do Campus de Pirassununga FMVZ/USP

São Paulo, 26 de dezembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BAO TARRAGÓ, Octavio Fabián.

Título: Sêmen refrigerado bovino reduz os danos espermáticos e aumenta a taxa de prenhez na IATF?

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

Dedico esta Tese,

A meu filho Esteban,

A meus Pais, Osvaldo e Stella,

A meus Irmãos, Oscar, Cesar e Diego.

AGRADECIMENTOS

A Deus nosso Pai... Por me dar saúde e forças, com mais intensidade quando as minhas não me suportavam mais...

A meus pais Osvaldo e Stella por ter me apoiado incondicionalmente sempre, sempre em cada decisão da minha vida... Pelo amor e carinho, pela exigência que me formou como pessoa, pelos cuidados durante 35 anos! Ao meu pai por sempre ter acompanhado desde lá no início mesmo, na escola, de me fornecer os melhores materiais escolares para estudar mais a vontade, a minha mãe por me mostrar com o seu exemplo, como dar a vida pelas pessoas que você ama e por manter vivo os valores que são importantes na vida, principalmente pelos cuidados da tua família, obrigado por dar tudo de ti, mais do que você fez mami é totalmente impossível, teria que ser muito bom (e não sou) para escrever plenamente e te agradecer como você se merece. Pais, A vocês minha gratidão é e será por toda minha vida...

A meus irmãos, Oscar, Cesar e Diego, por estarem sempre atentos as minhas necessidades desse vai e vem, dessas horas de estrada longas e cansativas, pela ajuda que precisei quando estive no Brasil ou Paraguai...Cesar, com aquela prontidão de deixar de lado as atividades próprias para mi ajudar, teu coração não cabe no teu peito irmão.

Professora Carla, me permitistes cumprir meu sonho, e quando foi preciso, me pegastes da mão para indicar o caminho correto, recebi as palavras certas, na hora justa. Com a responsabilidade de levar os conhecimentos e vivências do doutorado para meu país, para meus alunos futuros se der tudo certo, não será em vão a oportunidade que me ofereceu. Pelas horas (vaaaarias....muitas) de conversação, conselho, paciência, e carinho de me atender.... Mais importante que tudo por realmente me sentir GUIADO, orientado por você e me aceitar mesmo com tantas fraquezas e na situação e da forma que me permitiu levar para a frente o doutorado.

Ao Prof. Rubens Paes de Arruda, o exemplo de valores que continuarei a tentar imitar, tentarei levar essa alegria ao aluno de ficar mais feliz porque sabe e pensa melhor, tentar imitar que fazer o máximo de esforço para que o aluno aprenda é o mínimo que o educador (diferente de apenas professor) deve fazer. De exigir de cada um o “seu máximo” eu agradeço isso o resto da minha vida. O mais grande educador do Brasil, talvez do mundo o Prof. Paulo Freire, dizia que “Professor é aquele que ama o aluno”, professor não é apenas aquele que cumpre protocolos, aquele que tem cada dia mais títulos, ou aquele que tem mais publicações científicas nas melhores revistas, porque mesmo cumprindo todos os protocolos, títulos e publicações, mesmo assim o professor pode não ser um educador, que é o que define a você melhor: educador que ama e cuida o seu aluno. Quero lhe agradecer também, mais uma vez por ter me aceitado no mestrado, e ORIENTADO nesses três anos que fiquei aprendendo o que me serviria para o futuro profissional e pessoal. Não queria deixar passar também, por ter me acompanhado nos momentos difíceis, quando o caminho ficou empinado (muito) que me tocou passar assim logo que cheguei ao Brasil, por se tornar

(porque você mesmo me chamou por vontade própria) para conversar e ir lidando com as mais diversas situações que se apresentaram, Professor é aquele que sente amor pelo seu aluno, neste caso é fato.

A equipe que fez parte principal de este trabalho: Shirley, Maíra, Felipe, Vitor, Gabriel, Thalles: vocês foram os pilares, os guerreiros que de madrugada a noite ficaram na luta de fazer dar tudo certo, com a mais alta qualidade e empenho e fazer e cumprir o delineamento (delineamento mais cansativo que já vi na vida) ser realizado com a mais alta eficiência. Mais tem algo mais importante do que tudo o anterior: a amizade de cada um de vocês. Maira e Shirley: por ter essa competência incansável do trabalho no laboratório, Felipe, Vitor e Gabriel por não reparar em tirar horas de sono e começar o trabalho ainda de madrugada, ao parceiro Thalles, por prolongar seu estágio para nos ajudar mais tempo, por cuidar com que cada um de nós esteja bem, ainda por voltar de casa em uma segunda ocasião para volver a nos ajudar...obrigado a todos vocês principalmente pela amizade.

Ao Professor André, por disponibilizar o laboratório para a realização das análises do projeto no LATES, mesmo que muito ocupado o laboratório, nos deu a oportunidade de realizar as análises na época que precisávamos...

Ao Prof. Ed Hoffman Madureira pelos ensinamentos do dia a dia e nas aulas e durante as conversas nos vários cafés compartilhados

A Prof. Annelise de Souza Traldi, pela convivência e pelos conhecimentos adquiridos na área de reprodução de pequenos ruminantes, principalmente pela amizade e por ter aparecido justo na hora preciosa de indicar o caminho a seguir para começar o mestrado....

Ao Departamento de Reprodução Animal, pela oportunidade de fazer parte desta grande família...

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Prof. Dr. José Antônio Visintin, Profa. Dra. Camila Infantsi Vanucchi, Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, Prof. Marcilio Nichi...muito Obrigadíssimo!

A Universidade de São Paulo e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, por formar parte das escolhas que acolhem alunos de convênio de pós-graduação e contribuem com a formação e construção de países em via de desenvolvimento...

Ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação – PEC-PG, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) junto ao Ministério das Relações Exteriores do Governo da República Federal do Brasil, que permite e dá a possibilidade a inúmeras pessoas de vários países de se formar nas melhores escolas do Brasil, a alunos estrangeiros possibilitando o desenvolvimento dos países em via de desenvolvimento.

A família Rodrigues, (Mariana, Sra. Elisabeth e Seu Manuel), pelo enorme carinho de vocês, por me acolher na sua família e me ajudar em tudo que estava nas suas mãos, ao ponto de oferecer um “meu carro” justo o mais novo da família para poder ir e voltar com

conforto a USP, por me tratar como mais um da família, eternamente serei grato por TUDO isso.

Á cubana Patrícia Fernandes, obrigado mesmo, por ter me acolhido e escutado sempre que precisei, e esses conselhos, e se tornar um exemplo de vida que me ensina todos os dias...é um exemplo de pessoa e disso não há dúvidas....QUE GRANDE AMIGA!!!!

A Harumi Doi Shiraishi, pela presteza e amabilidade de sempre para resolver questões relacionadas à pós-graduação...

Ao Secretário do CBRA em Pirassununga, Clayton D. Costa, pela amizade e por sempre estar pronto para atender nas necessidades de vaga no alojamento....

Aos funcionários do CBRA, Marcio de Carli, João Carlos Pinto e José Maria Bernardi, pela amizade de vocês, por todas as mãos que me deram até em dias de sábados e domingos para a realização deste trabalho, mas principalmente pela grande amizade de todos vocês...

Daniel, outra peça mais que importante, para me oferecer sincera amizade e sabias palavras, muchas gracias Chileno!!

A todos meus amigos colegas da pós-graduação, Milena, Gato Seco, Arroz, Milton, Moana, Renata, Beatriz, por compartilhar seu tempo, juntarmos para jantar, e como é repetido tantas vezes em este agradecimento, porque não tem outra palavra que substitua ela, obrigado pela AMIZADE de cada um de vocês.

Ao Agustín, bostero, você chegou em um momento de dificuldade quando já a fortaleza para continuar ficava cada vez menor, consegui me tirar da rotina para carregar as pilhas indo a nadar no açude, obrigado amigo.

Por questões de prazo e outras particularidades tocou fazer a última parte escrevê-la em época do ano muito especial, época de compartilhar com a família, época de natal e ano novo. Mais encontrei em Júlio (Venezuela) e os amigos do Peru e Equador a família para passar a noite de natal a família e assim foi que me senti. Te agradecer Laís, por me chamar a passar o reveion (me tirar de Pira!) agradecer a tua mãe, tua irmã e o Kauê, pelo convite a noite da virada de 2016 a 2017, foi sem dúvidas umas das festas mais lindas que participei, mesmo sem conhecê-los há muito tempo, passei me sentindo em família, minha eterna gratidão.

Este trabalho teve como base principal, como pilar central, a AMIZADE, obrigado a cada um/a e todos dos meus amigos/as.

RESUMO

BAO, Tarragó O. F. **Sêmen refrigerado bovino reduz os danos espermáticos e aumenta a taxa de prenhez na IATF? (Does the bovine cooled semen reduces sperm damage and increases the pregnancy rate in the FTAI?).** 2017. 85f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade da refrigeração do sêmen bovino comparada com a criopreservação. Este estudo foi realizado em dois experimentos. No primeiro experimento foram comparados os efeitos *in vitro* do sêmen refrigerado em três meios diluidores comerciais a 5°C por até 48 horas, e criopreservado em dois meios. Para este experimento foram utilizados ejaculados de 10 touros da raça Nelore. Cada ejaculado foi dividido em três alíquotas, sendo diluídas nos meios Botubov®, Steridyl® e Bovidyl®. Após a diluição o sêmen foi envasado em palhetas e refrigerado nos três diluidores e criopreservado utilizando somente os meios Botubov® e Steridyl®. A refrigeração do sêmen foi realizada a 5°C por até 48 horas em sistema passivo de refrigeração BotuFlex® e a criopreservação realizada em sistema automatizado TK 3.000®. O sêmen foi avaliado nos tempos 0, 24, 36 e 48 horas após a refrigeração e após a descongelação, para cada diluidor. Foram realizadas análises dos padrões de cinética espermática pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA, programa SCA - Sperm Class Analyser), integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo por sondas fluorescentes, sob microscopia de epifluorescência e morfologia espermática por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). Notou-se efeito de tempo de refrigeração para os três diluidores de 0 para 24h, se mantendo semelhante até 48 h. Os diluidores Botubov® e Steridyl® preservaram as características espermáticas de forma semelhante até 48 horas de refrigeração diferindo apenas na variável de velocidade curvilínea; no entanto, ambos foram superiores ao diluidor Bovidyl®, para as variáveis, motilidade total, motilidade progressiva, células rápidas, velocidade curvilínea, velocidade progressiva, velocidade do trajeto, retilinearidade, integridade da membrana plasmática, alto potencial de mitocondrial e espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial. O segundo experimento foi realizado, baseado nos resultados do primeiro experimento, para avaliar os efeitos da refrigeração e da criopreservação do sêmen sobre a fertilidade *in vivo*. Foram utilizados ejaculados de três touros das raças Brangus, Braford e Angus, com idade entre 5 e 7 anos. O sêmen foi colhido por meio de vagina artificial, o ejaculado foi dividido em três alíquotas, sendo duas alíquotas para refrigeração e uma para criopreservação. Para a refrigeração o sêmen foi diluído nas concentrações de 15x10⁶ (R15) e 30x10⁶ (R30) espermatozoides/palheta e para a criopreservação diluído na concentração de 30x10⁶ espermatozoides/palheta (CRIO). Para todas as diluições foi utilizado o meio Botubov® e o sêmen armazenado em palhetas de 0,5 mL. A refrigeração foi realizada a temperatura de 5°C por 48 horas em sistema passivo de refrigeração BotuFlex® e a criopreservação em sistema automatizado TK®. Foram sincronizadas 552 vacas da raça Brangus em programas de inseminação artificial em tempo fixo. Os resultados da taxa de prenhez para os grupos de vacas inseminadas foram de 49,4% para R15, 43,38% para R30 e 47,59% para o sêmen criopreservado. Pode-se concluir que a refrigeração do sêmen a 5°C por 48 horas resulta em taxa de prenhez semelhante às obtidas com o sêmen criopreservado, sendo que esses resultados indicam que a refrigeração por até 48 horas pode ser uma opção de uso para IATF.

Palavras-chave: Refrigeração. Criopreservação. Inseminação artificial em tempo fixo.

ABSTRACT

BAO, Tarragó O. F. **Does the bovine cooled semen reduces sperm damage and increases the pregnancy rate in the FTAI?** (Sêmen refrigerado bovino reduz os danos espermáticos e aumenta a taxa de prenhez na IATF?). 2017. 85f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The objective of the present study was to evaluate the viability of cooling bovine semen compared to cryopreservation. This study was carried out in two experiments. In the first experiment, the *in vitro* effects of cooled semen were compared in three commercial extenders at 5°C for up to 48 hours, and cryopreserved in two extender. For this experiment were used ejaculates of 10 Nellore bulls. Each ejaculate was divided into three aliquots, being diluted in the Botubov®, Steridyl® and Bovidyl® extenders. After dilution, the semen was cooled into three extenders and cryopreserved using the Botubov® and Steridyl®. Semen refrigeration was performed at 5°C for up to 48 hours in BotuFlex® passive refrigeration system and cryopreservation performed in TK 3.000® automated system. Semen was evaluated at 0, 24, 36 and 48 hours after refrigeration and after thawing, for each diluent. The sperm kinetics of the spermatid kinetics (CASA, SCA - Sperm Class Analyzer), plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential and oxidative stress by fluorescent probes were analyzed under epifluorescence microscopy and sperm morphology By Differential Interference Contrast Microscopy (DIC). The Botubov® and Steridyl® diluents were very similar after 48 hours of cooling differing significantly only in the Curvilinear Velocity (VCL) 106.04 µm/s and 124.56 µm/s. The Bovidyl® diluent yielded results significantly lower than the 48 hours of refrigeration for the variables: total motility (MT), progressive motility (MPRO), fast cells (RAP), curvilinear velocity (VCL), progressive velocity (AP), plasma membrane integrity (PI), high mitochondrial potential (AP), and spermatozoa with intact plasma and acrosomal membranes and high mitochondrial potential (PIAIA). The second experiment was carried out, based on the results of the first experiment I, to evaluate the effects of cooled and cryopreservation of semen on *in vivo* fertility. We used ejaculates of three bulls of the Brangus, Braford and Angus breeds of a IA center, aged between 5 and 7 years. The semen was collected by artificial vagina, the ejaculate was divided into three aliquots, two aliquots for refrigeration and one for cryopreservation. For cooling, the semen was diluted in the concentrations of 15x10⁶ (R15) and 30x10⁶ (R30) spermatozoa/straw, for cryopreservation diluted in the concentration of 30x10⁶ spermatozoa / vane (CRIO). For all dilutions, the Botubov® medium and the semen stored in 0.5 mL vial were used. Refrigeration was carried out at a temperature of 5 ° C for 48 hours in BotuFlex® passive refrigeration system and cryopreservation in an automated TK® system. 552 Brangus cows were synchronized in fixed-time artificial insemination programs. The results of the pregnancy rate for the groups of inseminated cows were 49.4% for R15, 43.38% for R30 and 47.59% for cryopreserved semen. It can be concluded that the cooling of the semen at 5° C for 48 hours results in pregnancy rate similar to those obtained with cryopreserved semen, and these results indicate that refrigeration for up to 48 hours may be an option of use for FTAI.

Key words: Cooled Semen. Cryopreservation. Fixed time artificial insemination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Materiais utilizados para a colheita do sêmen.....	36
Figura 2 – Colheita de sêmen com uso de eletroejaculador para processamento do sêmen e análises do <i>in vitro</i>	36
Figura 3 – Diluidores utilizados para o Experimento I.....	38
Figura 4 – Máquina de Criopreservação de sêmen, modelo TK 3000®	38
Figura 5 – Disposição das palhetas de sêmen nas caixas isotérmicas BotuFlex® para refrigeração a 5° C.....	39
Figura 6 – Identificação das palhetas de sêmen dos tratamentos criopreservado (amarelo), refrigerado na concentração de 30×10^6 espermatozoides/palheta (vermelho) e 15×10^6 espermatozoides/palheta (verde) para uso na IATF.....	45
Figura 7 – Máquina para embase das amostras seminais e diluídas no meio Botubov® com os tratamentos R15, R30 e Crio – Experimento II	45
Figura 8 – Disposição das palhetas de sêmen para a refrigeração a 5° C nas caixas isotérmicas BotuFlex® para uso na IATF	46
Figura 9 – Coleta do Sêmen dos touros para o processamento antes da IATF.....	46
Figura 10 – Protocolo de tratamento hormonal utilizado para a sincronização das vacas para a IATF.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de sêmen bovino diluído em meio Botubov® e refrigerado a 5° C nos tempos 0, 24, 36 e 48 horas	52
Tabela 2 – Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de sêmen bovino diluído em meio Bovidyl® e refrigerado a 5° C nos tempos 0, 24, 36 e 48 horas	53
Tabela 3 – Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de sêmen bovino diluído em meio Steridyl® e refrigerado a 5° C nos tempos 0, 24, 36 e 48 horas	54
Tabela 4 – Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de sêmen bovino diluído nos meios Botubov® (BB), Bovidyl® (BV) e Steridyl® (ST) e refrigerado por 48 horas a 5 °C ..	55
Tabela 5 – Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de sêmen bovino criopreservado nos meios Botubov® e Steridyl®	56
Tabela 6 – Média $\pm$ erro padrão características espermáticas de sêmen bovino refrigerado a 5° C por 48 horas e criopreservado utilizando o diluidor Botubov®.....	57

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1 – Taxa de prenhez do sêmen bovino refrigerado nas concentrações de 15×10^6 sptz/palheta (R15) ou 30×10^6 sptz/palheta (R30) e sêmen criopreservado (CRIO) de vacas submetidas à IATF58

Gráfico 2 – Taxa de prenhez do sêmen bovino de diferentes touros e refrigerado nas concentrações de 15×10^6 sptz/palheta (R15) ou 30×10^6 sptz/palheta (R30) e sêmen criopreservado (CRIO) de vacas submetidas à IATF59

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
AI	Membrana acrossomal íntegra
ALH	Amplitude lateral de cabeça
AP	Alto potencial de membrana mitocondrial
BCF	Frequência de batimento
CASA	Computer assisted sperm analysis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FITC-PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada ao isotiocianato de fluoresceína
h	Hora
H33342	Hoescht 33342
Hz	Hertz
IATF	Inseminação artificial em tempo-fixo
JC-1	5,5',6,6'- tetracoloro-1,1',3,3' iodeto de tetraetilbenzimidazol carbocianina
Kg	Quilogramas
LIN	Linearidade
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Min	Minuto
mL	Mililitro
MPROG	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
Na	Sódio
P	Probabilidade
PI	Membrana plasmática íntegra
PIAIA	Membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial
PIAIB	Membranas plasmática e acrossomal íntegras e baixo potencial de membrana mitocondrial

PIALA	Membranas plasmática, membrana acrosomal lesada e alto potencial de membrana mitocondrial
PIALB	Membranas plasmática íntegra, membrana acrosomal lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial
PLAIA	Membranas plasmática e acrossomal lesada, com alto potencial de membrana mitocondrial
PLAIB	Membrana plasmática lesada, membrana acrosomal íntegra e baixo potencial de membrana mitocondrial
PLALA	Membranas plasmática e acrossomal lesadas, e alto potencial de membrana mitocondrial
PLALB	Membranas plasmática e acrossomal lesadas com baixo potencial de membrana mitocondrial
PROC	Procedimento
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAS	Statistical analysis system
STR	Retilinearidade
μL	Micro litro
μm	Micromolar
VAP	Velocidade média do trajeto
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

° C	Graus Celsius
=	Igual
>	Maior
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
<	Menor
≤	Menor ou igual
%	Porcento

SUMÁRIO

C:\Users\Agustin\Downloads\Tese 18.04.docx - _Toc480273104

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1.	Biotecnologia: Inseminação Artificial em Tempo Fixo – IATF.....	22
2.2.	Impacto da qualidade do sêmen na IATF	23
2.3.	Uso do sêmen refrigerado e criopreservado na IATF.....	25
2.4.	Meios diluidores do sêmen bovino para refrigeração	27
3.	HIPÓTESES	31
3.1.	Experimento I.....	31
3.2.	Experimento II	31
5.	OBJETIVOS.....	33
5.1.	Experimento I.....	33
5.2.	Experimento II	33
6.	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
6.1.	EXPERIMENTO I: Efeitos do tempo de refrigeração a 5°C por 48 horas em três meios diluidores sobre a qualidade espermática comparados ao sêmen criopreservado em dois meios diluidores	35
6.1.1.	Animais, Manejo Experimental e Zootécnico	35
6.1.2.	Colheita do Sêmen.....	35
6.1.3.	Processamento do sêmen e tratamentos	37
6.1.4.	Avaliação computadorizada das características da cinética espermática	39
6.1.5.	Avaliação da morfologia espermática.....	40
6.1.6.	Integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial	40
6.1.7.	Preparo do sêmen para a avaliação do estresse oxidativo	41
6.1.8.	Delineamento experimental resumido do experimento I.....	42

6.2.	EXPERIMENTO II: Efeitos da refrigeração do sêmen a 5°C por 48 horas em relação ao sêmen criopreservado sobre a fertilidade	43
6.2.1.	Seleção dos animais	43
6.2.2.	Colheita e processamento do sêmen	44
6.2.3.	Protocolo de sincronização para a IATF	47
6.2.4.	Delineamento – Experimento II	48
6.2.5.	Exames ultrassonográficos	49
6.3.	Análise Estatística	49
7.	RESULTADOS	51
7.1.	EXPERIMENTO I: Efeitos do tempo de refrigeração a 5°C por 48 horas em três meios diluidores sobre a qualidade espermática e comparados ao sêmen criopreservado em dois meios diluidores	51
7.2.	EXPERIMENTO II: Efeitos da refrigeração do sêmen a 5°C por 48 horas em relação ao sêmen criopreservado sobre a fertilidade	58
8.	DISCUSSÃO	61
8.1.	Experimento I	61
8.2.	Experimento II	64
9.	CONCLUSÕES	68
9.1.	Experimento I	68
9.2.	Experimento II	68
	REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

O Mercosul é o maior produtor de carne bovina do mundo, sendo a pecuária uma atividade de extrema importância para a economia do Brasil, visto que o país possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo com 215 milhões de cabeças (IBGE, 2015) e se destaca pelo elevado potencial efetivo e as perspectivas de crescimento. Todas as biotécnicas reprodutivas que possam contribuir para aumentar e melhorar a produção de bovinos são de extrema importância. Diante da necessidade de aumento da produtividade, o agronegócio vem apresentando oportunidades para profissionais e empresas que atuam no setor. Entretanto, a produção pecuária precisa lidar com diversos desafios para obter lucratividade e se manter competitiva no mercado, pois a concorrência pela terra e pelo capital estão cada vez mais acirradas (RABELO, 2012). A cadeia produtiva brasileira da carne bovina movimenta cerca de R\$ 167,5 bilhões, por ano, e gera aproximadamente 7 milhões de empregos. O setor produz 9,5 milhões de toneladas, sendo 7,6 milhões destinadas ao mercado interno e 1,8 milhão exportadas para mais de 140 países, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento apontam que o Brasil será responsável por cerca de 45% do mercado mundial de carnes até 2020. No entanto, devido aos efeitos multiplicadores na economia, o agronegócio ganhará importância na geração de empregos no Brasil, sobretudo aqueles gerados pelo aumento do consumo decorrente da expansão da renda no país (MAPA, 2015). No caso do número de empregos, a expansão desses setores promoverá um aumento de 5,9 milhões de pessoas (um aumento estimado de 34,3%), contribuindo com 22% de todo o crescimento do número de empregos esperado para o Brasil de 2010 a 2022 (27,1 milhões de novos empregos de 2010 a 2022 para atender ao crescimento da população economicamente ativa) (RABELO, 2012).

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é hoje uma biotécnica inserida nas fazendas do Brasil como importante ferramenta de eficiência produtiva e de melhoramento genético, porém tem sido relatada grande variação das taxas de prenhez quando utilizado o sêmen criopreservado, como relatado por Nogueira e colaboradores em 2011, que notaram variação na taxa de prenhez de 40,9 a 61,9% após IATF. A possibilidade de utilização de sêmen refrigerado torna-se uma possibilidade interessante que vem sendo estudada novamente no Brasil e no Mundo, sendo que o primeiro trabalho reportado na literatura, com o uso de sêmen refrigerado bovino para IATF realizado por Garcia et al., (1999). Outra

vantagem do uso do sêmen refrigerado refere-se à possibilidade de utilizar esta biotécnica para o sêmen de reprodutores de alto valor genético e zootécnico que não toleram a criopreservação.

Desta forma, são necessárias mais pesquisas no que refere ao uso de sêmen refrigerado na IATF, devendo ser avaliados diferentes tipos de diluidores, a doses inseminante ideal, bem como o tempo de refrigeração, para que os resultados proporcionem maiores taxas de prenhez e assim podendo demonstrar que esta técnica pode ser uma excelente opção, eficiente e prática, levando sempre em consideração as individualidades à tolerância aos processos de refrigeração e/ou criopreservação do sêmen de touros, com o objetivo principal na produção mais econômica de bezerros.

Aproximadamente 50% de todos os espermatozoides são danificados pela congelção, limitando a total eficiência e eficácia da preservação do sêmen (WATSON, 1995; CELEGHINI et al., 2008). A reduzida fertilidade do sêmen congelado é amplamente atribuída a alterações da estrutura e função da membrana durante a refrigeração, criopreservação e descongelção (PARKS; GRAHAM, 1992).

O aumento da taxa de prenhez na IATF é um dos desafios para tornar ainda mais eficiente este processo de relevância nos índices zootécnicos de uma propriedade. O uso de sêmen refrigerado por 48 horas poderia aumentar a taxa de prenhez na IATF quando comparado ao uso de sêmen criopreservado. Desta forma, destaca-se a importância de se avaliar o sêmen bovino refrigerado até 48 horas utilizando diferentes diluidores para buscar o que melhor preserva as características espermáticas *in vitro*, comparando ao sêmen criopreservado, bem como avaliar os efeitos dos processos da refrigeração e da criopreservação sobre os índices de fertilidade *in vivo* em programas de IATF.

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biotecnologia: Inseminação Artificial em Tempo Fixo – IATF

O melhoramento genético é o melhor aliado da eficiência reprodutiva que possibilita selecionar indivíduos com características de interesse comercial. A inseminação artificial além de ser a primeira biotécnica da reprodução utilizada com o fim de melhorar os índices reprodutivos (CREPALDI et al., 2009) é o método de escolha para a disseminação da melhoria genética, assim em contraste ao que acontece no acasalamento natural, onde são ejaculados aproximadamente 10×10^9 espermatozoides no momento da cobertura natural, durante a inseminação artificial são depositados apenas 20×10^6 espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea, ou seja 0,2% da concentração de uma cobertura natural (VISHWANATH; SHANNON, 1997; VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Do ponto de vista da produtividade e eficiência nas propriedades rurais, a inseminação artificial está ligada fortemente a tornar este processo uma atividade mais eficiente. Uma das biotécnicas mais utilizadas atualmente e que merece destaque é a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que elimina a necessidade de observação de cio, aumenta a eficiência reprodutiva e genética, tem o potencial de diminuir a estação de monta, produzir bezerros mais homogêneos e ainda simplificar o uso da inseminação artificial (BARUSELI, 2016). Sem dúvida o emprego da IATF, é uma ferramenta de alto impacto econômico nas fazendas no Brasil e na região que mais produz carne bovina para o mundo: América do Sul.

Outro fator de forte impacto sócio-econômico gira em torno dos dados que apontam que a IATF emprega 3.500 veterinários e gera um mercado que movimenta mais de dez milhões de inseminações, representado por 178 milhões de reais de venda de fármacos e aproximadamente em torno do mesmo valor para os serviços veterinários no ano de 2015. Mercadologicamente a IATF se apresenta como um produto excelente, já que está inserida no mercado e cresceu do ano 2015 para 2016 em 11,2% sendo a tendência a de ir em aumento ano a ano, isto torna a IATF um excelente produto e serviço de projeções ideais. A inseminação artificial em tempo fixo é uma ferramenta que utiliza alta tecnologia e que trouxe e trará grandes benefícios econômicos e sociais à pecuária (BARUSELI, 2016).

Porém, ainda que os protocolos de sincronização de estro e ovulação quando realizados mesmo cumprindo os horários de aplicação e as recomendações, apresentam taxas de prenhez variáveis, de 36 a 64,7% (OLIVEIRA et al., 2014).

A relevância do tempo de dispersão da ovulação nos protocolos de IATF e sua relação com o tipo de sêmen a utilizar nas inseminações (*in natura*, refrigerado ou criopreservado), situa-se numa limitada vida média dos espermatozoides no trato reprodutivo, segundo a literatura em torno de 20 a 48 horas em ejaculados de monta natural ou *in natura* (HAFEZ; HAFEZ, 2004);. Vishwanath e Shannon (2000) mostram que o sêmen armazenado refrigerado por 48 horas foi eficiente quando empregado na inseminação com taxas de não retorno ao cio de 68,1%, trabalho que concorda com Crespilho et al. (2008), onde após 48 horas de refrigeração a taxa de prenhez foi de 60,24% com uso de sêmen refrigerado versus o criopreservado que resultou em 39,06% de prenhez, ou seja 20% maior quando o sêmen utilizado foi na forma líquida (refrigerada), indicando que os danos da criopreservação são menores e a população espermática refrigerada ao estar mais conservada ou com menos danos estruturais e funcionais, possuem um maior potencial de permanência e fertilização no trato reprodutivo da fêmea.

2.2. Impacto da qualidade do sêmen na IATF

Para cumprir a função principal, a fertilização, os espermatozoides devem possuir morfologia normal, atividade metabólica (motilidade), e integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial, como pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, capacitação, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema possam ocorrer (YANAGIMACHI, 1994; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997, citado por ARRUDA et al., 2004).

Embora sejam diversas as análises laboratoriais empregadas para avaliar a qualidade ou potencial de fertilização de uma partida de semen criopreservada, a correlação dos parâmetros espermáticos com os índices de fertilidade *in vivo* ainda continua variável. Os principais testes utilizados são a da motilidade subjetiva, análises espermáticas computadorizadas, análises de morfologia espermática, testes de funcionalidade com o emprego de sondas fluorescentes, utilizadas na microscopia de epifluorescência e na citometria de fluxo, mas nenhuma delas isoladamente tem capacidade de prever com

acurácia sensibilidade suficiente para definir o potencial de fertilização de uma amostra seminal avaliada (ARRUDA et al., 2004; ARRUDA et al., 2006; PAPA et al., 2008).

Uma técnica que proporciona dados de maior repetibilidade para a avaliação da motilidade é a avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA), assim programas computadorizados para avaliação espermática podem ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade nas avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermática, além de possibilitar a identificação de subpopulações espermáticas (ARRUDA et al., 2004). Farrel et al. (1998) demonstraram que a associação de múltiplas variáveis pela técnica do CASA apresenta uma importante correlação com a fertilidade *in vivo*, quando comparado apenas parâmetros individuais de cinética espermática.

A microscopia de epifluorescência associada a sondas fluorescentes permite avaliar a capacidade funcional de compartimentos da célula espermática. Assim a funcionalidade das organelas espermáticas ou de seus compartimentos tem sido monitorados pela capacidade de que possuem as sondas a se ligarem a pontos específicos das células permitindo um diagnóstico mais direto (CELEGHINI et al., 2004). A membrana plasmática espermática cumpre um papel fundamental, visto que sua integridade garante a homeostase celular (PARK; GRAHAN, 1992). A integridade desta organela pode ser determinada pelo uso das seguintes sondas, iodeto de propídio (PI), SYBR-14, Hoechst 33528 (H258) e 33342 (H342), diacetato de carboxifluoresceína (CDFA) e a Concanavalina A (ConA) associada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC). Sondas fluorescentes utilizadas para outra estrutura essencial do espermatozoide, as mitocôndrias, dispostas de forma helicoidal na peça intermediária produzem o ATP que serve como suplemento para os batimentos flagelares para haver motilidade espermática. As sondas fluorescentes utilizadas para marcar função mitocondrial são Rodamina 123 (R123), MitoTracker Green FM (MITO) e MitoTracker Red ou CMXRos, fluorocromos capazes de corar mitocôndrias e promover imagens de alta fluorescência de mitocôndrias em células vivas (BENEL et al., 1896). O JC-1 (Iodeto de 5,5',6,6' - tetracloro - 1,1,3,1' - tetraetilbenzimidazolilcarbonylacina), que identifica populações mitocôndrias com diferentes potenciais de membrana através de códigos de cor (REERS et al., 1991; GRAVANCE et al., 2000). Para a avaliação da integridade do acrossomo tem-se utilizado aglutininas, tais como aglutinina de *Ricinus communis* (RCA), aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), aglutinina de *Arachis hypogea* (PNA) (CROSS; MEIZEL, 1989; CHENG et al., 1996) que possuem especificidade a glicoproteínas da membrana acrossomal, para serem visualizadas em microscopia de epifluorescência estas

aglutininas devem ser conjugadas a fluoresceínas, tais como o isiocionato de fluoresceína (FITC) (FARLIN et al., 1992). Em trabalho realizado por Oliveira et al. (2014) a associação de sondas fluorescentes mostrou-se uma ferramenta que permitiu diferenciar amostras seminais que resultaram com diferentes taxas de gestação empregado na IATF. Assim, foram achadas de acordo com a qualidade do sêmen utilizado diferenças de 28,5% entre os grupos de vacas que receberam na IATF sêmen com bom potencial, ou seja, as amostras seminais com 44,5% de membranas plasmáticas e acrossomais íntegras e alto potencial de mitocôndrias (64,7% de prenhez) e as vacas inseminadas com sêmen de baixo potencial, aquelas que possuíam 8,5% de membranas plasmáticas e acrossomais íntegras e alto potencial de mitocôndrias (36,2% de taxa de prenhez), concluindo os autores que esta metodologia de avaliação do sêmen utilizando sondas fluorescentes pode ser utilizada com um bom preditor da capacidade de fertilização de amostras criopreservadas.

Uma combinação de várias análises e métodos de avaliação seminal oferecerá maior acurácia para definir uma complexa funcionalidade e não deve se esperar que um teste simples do sêmen possa prever a fertilidade de um reprodutor ou uma partida de sêmen (ARRUDA et al., 2004).

No que refere ao número de espermatozoides necessários, que garanta boas taxas de prenhez na IATF e que acompanhe bom valor de custo e benefício é ainda um entrave a ser determinado, porém as diferenças individuais entre touros mostrasse bastante grande, assim Crespilho et al. (2007) trabalhando em função de dose inseminante comprovaram que o aumento do número de espermatozoides na dose inseminante, aumentou as taxas de prenhez, sendo o primeiro tratamento 12×10^6 espermatozoides/mL com taxa de prenhez de 51,7%; porém, quando a dose inseminante aumentou para 100×10^6 espermatozoides/mL a taxa de prenhez foi para 66,2%. Porém, os mesmos autores quando trabalharam apenas com o diluidor Botubov[®], com doses inseminantes de 12×10^6 , 25×10^6 , 50×10^6 e 100×10^6 espermatozoides/mL não observaram taxas de prenhez com diferença estatística, não havendo diferenças nas taxas de prenhez de vacas inseminadas em tempo fixo.

2.3. Uso do sêmen refrigerado e criopreservado na IATF

O emprego de sêmen refrigerado na inseminação artificial em tempo fixo em bovinos no mundo é de data relativamente recente, começa no ano 1999 com a primeira publicação de

Garcia et al. (1999). A partir daí inúmeros trabalhos, vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de melhorar a eficiência da IATF, que depende de múltiplos fatores para seu sucesso (SÁ FILHO et al., 2012), assim vários pesquisadores vem a procura de colaborar nesse objetivo visando e sendo como um ponto pilar, a qualidade do sêmen, um fator de grande impacto nos resultados das taxas de prenhez.

A procura de mensurar ou predizer de maneira acurada por meios de ensaios laboratoriais o potencial de fertilidade de uma amostra seminal, seja *in natura*, refrigerada ou criopreservada é um objetivo que desde muitos anos atrás vem sendo estudado (ARRUDA et al., 2010; CELEGHINI et al., 2007). Assim, para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica como também a presença de membranas íntegras sendo pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema possam ocorrer (ARRUDA et al., 2006). Nesse sentido, vários estudos mostram que a refrigeração espermática por até 24 horas produz menos danos espermáticos e melhores taxas de prenhez na IATF quando comparados aos danos durante a congelação do sêmen (PAPA et al., 2015; BORGES-SILVA et al., 2015; CRESPILO et al., 2008). Ainda, quando o tempo de refrigeração do sêmen foi de 48 horas (CRESPILO, 2012), observou-se que a taxa de prenhez foi superior utilizando amostras seminais refrigeradas versus o sêmen criopreservado. Porém, os mesmos autores, em trabalho posterior (CRESPILO et al., 2014) utilizando touros mais jovens da mesma raça obteve resultados de prenhez menores para o sêmen diluído nos meios a base de gema de ovo, quando o sêmen foi refrigerado por 48 horas, dados que sugerem que o fator individual (touro) e talvez com mais importância a idade devido a diferente composição lipídica das membranas plasmáticas possam ser fatores determinantes no sucesso ou não do uso de sêmen refrigerado (MURPHY et al., 2016).

Embora seja inquestionável a vantagem de que a biotécnica da criopreservação espermática mantenha o potencial de fertilização e permita a distribuição do sêmen pelo mundo inteiro, este processo demanda mais custos comparativamente ao uso do sêmen na forma líquida, seja refrigerado ou a temperatura ambiente. Países como Nova Zelândia, utilizam a inseminação artificial em uma porcentagem de 95% de sêmen no estado refrigerado ou a temperatura ambiente até por 3 dias com boas taxas de prenhez, diminuindo assim custos com botijões criogênicos, abastecimentos dos mesmos com nitrogênio líquido e realizando de maneira mais prática o procedimento da IA (CRESPILO, 2012). Shannon (2000) e Bucher et al. (2009) mostram nessas pesquisas que mediante a utilização de sêmen

refrigerado e a temperatura ambiente é possível reduzir o número da dose inseminante nas inseminações. Assim no estudo de Wishwanath e Shannon (2000) os resultados de taxas de não retorno ao cio foram desde 67 a 69% utilizando 4×10^6 espermatozoides; 6×10^6 espermatozoides e 8×10^6 espermatozoides por IA. Valor próximo das doses inseminantes dos trabalhos citados anteriormente, foram utilizado por Bucher et al. (2009) inseminando vacas com sêmen estocados a temperatura ambiente por 24 horas de touros da raça Angus, contendo como doses inseminante 3×10^6 espermatozoides na palheta vs sêmen criopreservado com 20×10^6 espermatozoides na palheta, obtendo como resultados taxas de prenhez sem diferenças estatística, mesmo utilizado uma concentração 15 vezes menor no sêmen refrigerado. Diversos estudos (CRESPILHO, et al., 2008; BORGES-SILVA, et al., 2016; PAPA, et al., 2015) mostram que o emprego de sêmen refrigerado é uma técnica válida que impacta positivamente os índices zootécnicos (taxa de prenhez) e aumenta o potencial de uso de reprodutores quando utilizando touros que toleram o processo de refrigeração.

2.4. Meios diluidores do sêmen bovino para refrigeração

Antes da utilização e a otimização do sêmen criopreservado para seu uso na inseminação artificial, o sêmen era utilizado na forma *in natura* ou refrigerado (PHILIPS, 1939). Assim o sêmen *in natura* antes do seu uso era diluído em substâncias que poderiam ser desde simples soluções salinas aos mais complexos meios tamponantes, formulados para manter por um período de tempo determinado os espermatozoides com potencial de fertilização. Um dos primeiros componentes (até hoje em dia utilizado) é a gema de ovo adicionada de outras soluções como os fosfatos e citratos, catalase e até nitrogênio na forma de gás de modo a reduzir o metabolismo espermático (PHILIPS, 1939; VERBERCKMOES et al., 2005).

Um dos países que mais utiliza até o dia de hoje o sêmen bovino refrigerado ou *in natura* é a Nova Zelândia, com emprego de 95% das inseminações com uso de sêmen na forma refrigerada ou a temperatura ambiente (em torno de 17°C a 27°C) com diluidores específicos desenvolvidos para este uso, utilizando na composição dos meios a gema de ovo, Tris, antibióticos, antioxidantes, nitrogênio na forma de gás no meio diluidor para diminuição do metabolismo espermático e catalase para reduzir os níveis de peróxidos no meio (VERBERCKMOES et al., 2005).

Outros estudos tem mostrado que diferentes diluidores, mostram diferentes capacidades de manter viável ou íntegros os compartimentos espermáticos, com dependência do tempo de refrigeração e com forte impacto nos resultados quanto a idade e raças dos touros, mostrando que as injúrias do tempo de refrigeração não apenas dependem da composição do diluidor e sim com bastante importância da tolerância do reprodutor e sua idade a este processo (VERBERCKMOES et al., 2005; PAPA et al., 2015; MURPHY et al., 2016; CRESPILO et al., 2012). Assim, o diluidor Caprogen[®] mostrou-se eficiente na conservação das amostras seminais, por ter na sua composição a catalase, protegendo a membrana plasmática da ação das espécies reativas de oxigênio e mantendo sua integridade mediante a redução dos níveis de peróxidos gerados pelo metabolismo espermático. As composições dos meios diluidores podem exercer um efeito protetor e regular as injúrias que podem ser causadas pelas espécies reativas ao oxigênio (ROS) sobre a integridade das membranas plasmáticas, acrossomais e potencial mitocondrial. Estas injúrias ocorrem por efeito principal do ataque das ROS aos lipídios de membrana. Em trabalho onde foi comparado dois diluidores o Triladyl e o CEP-2 mostraram que ambos diluidores conseguiram manter sem diferenças significativas as membranas plasmática, acrossomal e potencial de mitocôndria durante seis dias de armazenamento, mas com diferenças significativas para os padrões de cinética espermática, sendo que o diluidor CEP-2, contendo catalase mostrava maior velocidade espermática (VSL/BCF) e maior retilinearidade (STR) quando comparado ao diluidor Triladyl (VERBECKMOES, et al., 2005).

Os meios diluidores para seu uso na forma refrigerada, tem como princípio a diminuição do metabolismo espermático e a conservação de uma maior população espermática com potencial de fertilizar; porém, por um período curto de tempo segundo a maioria dos trabalhos entre 24 e 72 horas (BORGES-SILVA et al., 2015; CRESPILO et al., 2012; PAPA et al., 2015; VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Os componentes utilizados no preparo dos meios para a diluição do sêmen na forma refrigerada são principalmente: gema de ovo, fosfatos e citratos (PHILLIPS, 1939). Posteriormente o uso do leite desnatado e leite de coco foi utilizado com eficiência para preservar a fertilidade (MERLOROSE, 1962; NORMAN et al. 1962) citado por Vishwanath e Shannon (2000). Referente ao uso do glicerol no semen refrigerado, recente estudo mostrou efeito benéfico do uso do glicerol no meio diluidor a base de gema de ovo quando empregado o sêmen refrigerado, com taxas de prenhez maiores para o meio diluidor adicionado de glicerol, refrigerado a 5°C por 24 horas (PAPA et al., 2015). Os componentes e as qualidades dos meios diluidores cumprem um papel fundamental para manter viáveis e assim obter altas

taxas de fertilização nos programas de inseminação artificial, no que diz respeito ao uso do sêmen na forma líquida (refrigerado) (PAPA et al., 2008).

3. HIPÓTESES

Com base na literatura foram delineados dois experimentos com as seguintes hipóteses:

3.1. Experimento I

1. Diferentes diluidores podem apresentar variações na capacidade de preservar a integridade dos espermatozoides bovinos com o decorrer do tempo (0, 24, 36 e 48 horas) de refrigeração a 5° C.
2. A refrigeração do sêmen a 5° C até 48 horas é melhor preservado com o diluidor Bovidyl®, diluidor comercial recentemente lançado ao mercado para seu uso exclusivo com sêmen refrigerado.
3. A refrigeração do sêmen a 5° C por 48 horas, causa menos injúrias ao espermatozoide bovino quando comparado à criopreservação do sêmen.

3.2. Experimento II

1. A utilização de sêmen refrigerado a 5° C por 48 horas proporciona melhor taxa de concepção do que a utilização de sêmen criopreservado após IATF em bovinos.
2. A refrigeração do sêmen bovino durante 48 horas a 5°C em palhetas contendo menor concentração espermática ($15 \cdot 10^6$ vs $30 \cdot 10^6$ espermatozoides/palheta) melhora a taxa de prenhez na IATF.

5. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram avaliar *in vitro* e *in vivo* os efeitos da refrigeração e da criopreservação do sêmen bovino utilizando diferentes diluidores, sendo os objetivos específicos:

5.1. Experimento I

Avaliar *in vitro* os efeitos da refrigeração do sêmen bovino a 5° C por até 48 horas utilizando três diluidores comerciais (BotuBov[®], Steridyl[®] e Bovidyl[®]) e da criopreservação do sêmen em dois diluidores comerciais (BotuBov[®] e Steridyl[®]).

5.2. Experimento II

Avaliar a fertilidade *in vivo* de sêmen refrigerado com diferentes concentrações espermáticas na palheta e compará-las ao criopreservado por IATF em vacas de corte.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. EXPERIMENTO I: Efeitos do tempo de refrigeração a 5°C por 48 horas em três meios diluidores sobre a qualidade espermática comparados ao sêmen criopreservado em dois meios diluidores

O experimento foi conduzido no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal (CBRA), local onde os touros foram alojados e no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões de Suínos (LATES), onde as amostras seminais foram processadas e avaliadas, ambos locais pertencentes à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), localizados no Campus da USP “Fernando Costa”, na cidade de Pirassununga, SP. Este experimento foi realizado de fevereiro a junho 2015.

6.1.1. Animais, Manejo Experimental e Zootécnico

Foram utilizados 10 touros da raça Nelore, PO, com idade em torno de 22 ± 1 meses e com o peso médio de 430 ± 25 kg. Os animais permaneceram em piquetes de dois hectares contendo predominantemente capim *Brachiaria brizantha*. A alimentação foi constituída por forragem verde (pastejo), suplementação mineral e água *ad libitum*. Cada touro passou por avaliação visual da condição corporal (escore de 1 a 9) sendo que todos apresentavam condição corporal entre 6 e 7. Previamente ao início do experimento, os touros foram submetidos a duas colheitas de sêmen para nivelamento biológico, sendo escolhidos para participar do experimento os touros que apresentavam ejaculados contendo motilidade espermática visual $\geq 60\%$ e anormalidades espermáticas $\leq 30\%$.

6.1.2. Colheita do Sêmen

Foram colhidas amostras seminais, por eletroejaculação (Eletroejaculador Profissional Automático e Manual AUTOJAC V3 – NEOVET) sendo estabelecido como critérios mínimos de qualidade para inclusão no trabalho a motilidade total do sêmen *in natura* $\geq 60\%$, vigor ≥ 3 e porcentagem de defeitos maiores $\leq 10\%$, menores $\leq 20\%$

considerando como critério os padrões mínimos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Figura 1 e 2.

Figura 1– Materiais utilizados para a colheita do sêmen

Fonte: (Bao Tarragó. O. F., 2017)

Figura 2 – Colheita de sêmen com uso de eletroejaculador para processamento do sêmen e análises do *in vitro*

Fonte: (Bao Tarragó. O. F., 2017)

6.1.3. Processamento do sêmen e tratamentos

Após a colheita do sêmen cada ejaculado foi fracionado em três alíquotas iguais em tubos cônicos de 50 mL, pré-diluídas em meio Botubov[®] (BB, Botupharma), Steridyl[®] (ST, Minitube) e Bovidyl[®] (BVD, Minitube), de forma a atender a concentração necessária para 80×10^6 espermatozoides/mL. O sêmen diluído foi envasado em palhetas francesas de 0,5 mL (IMV[®] Technologies, L'Aigle Cedex, France).

A refrigeração do sêmen foi realizada utilizando-se os diluidores BB, ST e BVD (Figura 3), enquanto a criopreservação do sêmen foi realizada com os diluidores BB e ST. Foram colocadas 10 palhetas de sêmen de cada tratamento BB, ST e BVD em caixas de refrigeração Botuflex[®] por períodos de 24 horas (T1), 36 horas (T2) e 48 horas (T3). Outras 10 palhetas dos tratamentos BB e ST foram submetidas ao processo de criopreservação em sistema automatizado de congelação, (TK 3000, TK[®] Equipamentos para Reprodução – Uberaba/Brasil) figura 4, utilizando curva padrão para o sêmen bovino P1S2: taxa de refrigeração de 0,5° C por minuto até 5° C, o tempo de equilíbrio foi de 2 horas para todos os processos de criopreservação, finalizado o tempo de equilíbrio a curva negativa de congelamento obedeceu a uma queda de 20° C/minuto até -80° C e 15° C/minuto até -120° C para imediatamente serem as palhetas imersas no nitrogênio líquido (-196° C) e armazenadas.

O efeito de cada meio de refrigeração foi avaliado laboratorialmente em duplicata através da análise computadorizada do movimento espermático (Programa SCA - Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha), anormalidades espermáticas pela técnica da câmara úmida por contraste de interferência diferencial (DIC), avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e avaliação do estresse oxidativo espermático foram avaliados utilizando sondas fluorescentes sob microscopia de epifluorescência.

Figura 3 – Diluidores utilizados para o Experimento I

Fonte: (Bao Tarragó. O. F., 2017)

Figura 4 – Máquina de Criopreservação de sêmen, modelo TK 3000®

Fonte: (Bao Tarragó. O. F., 2017)

Foram usadas caixas devidamente identificadas para cada tratamento e tempo de avaliação (24, 36 e 48 horas) e permaneceram a temperatura ambiente, sendo um total 9 caixas utilizadas por ejaculado (Figura 5).

Figura 5 – Disposição das palhetas de sêmen nas caixas isotérmicas BotuFlex® para refrigeração a 5° C

Fonte: (Bao Tarragó O. F., 2017)

6.1.4. Avaliação computadorizada das características da cinética espermática

As amostras de sêmen foram avaliadas nos tempos 24 horas (T1), 36 horas (T2) e 48 horas (T3) do processo de refrigeração. Para cada avaliação foram homogeneizadas duas palhetas de cada tratamento, depositadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, pré-aquecidas em banho-Maria a 37°C por 5 minutos.

A cinética espermática foi avaliada pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA, programa SCA - Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha). O *setup* foi ajustado previamente para análise de espermatozoides bovinos. Para a avaliação, a amostra seminal foi diluída em meio TALP sperm (BAVISTER; LORRAINE, 1983), pré-aquecido a 37° C, para uma concentração final de $12,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. A câmara de Makler® (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel) foi utilizada na avaliação. As variáveis consideradas foram motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MPROG, %), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade

curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

6.1.5. Avaliação da morfologia espermática

Para a avaliação da morfologia espermática foram colhidas amostras espermáticas fixada em solução de formol salino tamponado 4% previamente aquecido a 37° C. Foram avaliadas 200 células pela técnica da câmara úmida por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC, modelo 80i, Nikon, Tokio, Japão) com aumento de 1.000 x e classificadas de acordo com Barth e Oko (1989) em defeitos maiores e menores e totais.

6.1.6. Integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, foi realizado um pré-experimento para validação do protocolo da tripla coloração, sendo testados nove tratamentos para avaliar qual resultava em melhor avaliação para os três diluidores utilizados. Estes testes apontaram os melhores resultados quando o sêmen foi diluído em meio TALP *sperm* acrescido de BSA e na concentração espermática de 10×10^6 spz/mL.

Assim uma amostra de 150 μL de sêmen diluído em TALP a 10×10^6 espermatozoides/mL foi adicionada às sondas fluorescentes: 2 μL de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL, Molecular Probes), 3 μL de iodeto de propídio (0,5 mg/mL, Sigma-Andrich), 20 μL de lectina obtida de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionado de fluoresceína (FITC-PSA, 100 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Andrich) e 6 μL de iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1, 153 μM , Sigma-Andrich) preparadas conforme descrito por Celeghini et al. (2007) e com as modificações realizadas e validadas no pré-experimento. Após a adição das sondas fluorescentes, a amostra foi incubada por 8 minutos a 37° C. A leitura foi feita sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon Tóquio, Japão) em aumento de 1.000 x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm).

Foram avaliadas 200 células por amostra, sendo classificadas nas seguintes categorias: membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial (PIAIB), membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial (PIALA), membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial (PIALB), membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial (PLAIA), membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial (PLAIB), membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial (PLALA) e membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial (PLALB). Foram considerados nos resultados os percentuais de células PIAIA, de membrana plasmática íntegra (PI), de acrossoma íntegro (AI) e de alto potencial de membrana mitocondrial (AP).

6.1.7. Preparo do sêmen para a avaliação do estresse oxidativo

Após a colheita e determinação da concentração, o sêmen foi diluído em meio TALP *sperm* (BAVISTER; LORRAINE, 1983) (25×10^6 espermatozoides/mL) e adicionados 0,5 μ L de CellROX (1 mM, em DMSO) e 2 μ L de Hoescht 33342 (2,5 mg/mL) e incubados por 30 minutos a 37° C. O Hoescht 33342 foi adicionado com o objetivo de tornar possível a visualização das células que não tiveram a peça intermediária corada com o CellROX. Procedido ao tempo de incubação, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 2.000 g. Ao fim da centrifugação, foi retirado o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em 200 μ L de TALP. Em seguida, uma gota de 5 μ L da solução foi colocada entre lâmina e lamínula. A leitura foi feita sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) em aumento de 1.000x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 e emissão 605-655).

Foram avaliadas 200 células e estas foram classificadas em: espermatozoides sem ou sob leve estresse oxidativo (peça intermediária não corada), espermatozoides sob moderado estresse oxidativo (peça intermediária fracamente corada em vermelho) e

espermatozoides sob intenso estresse oxidativo (peça intermediária fortemente corada em vermelho).

6.1.8. Delineamento experimental resumido do experimento I.

6.2. EXPERIMENTO II: Efeitos da refrigeração do sêmen a 5°C por 48 horas em relação ao sêmen criopreservado sobre a fertilidade

Para este experimento foram inseminadas um total de 552 vacas, pluríparas e lactantes (45 - 60 dias pós-parto) mantidas exclusivamente em pastagem predominantemente de *Brachiaria brizantha*, sendo oferecido sal mineral e acesso à água *ad libitum*. Os programas de sincronização do estro e da ovulação e IATF foram realizados durante o verão do Hemisfério Sul (dezembro de 2015 a fevereiro de 2016) em duas fazendas localizadas no Departamento de San Pedro e Departamento de Presidente Hayes, na República do Paraguai.

6.2.1. Seleção dos animais

6.2.1.1. Touros

Previamente ao início do experimento II, os touros, disponibilizados por uma central de congelamento de sêmen bovino, foram submetidos a uma colheita de sêmen, para escolher os que estavam dentro das características exigidas para ingressar no experimento seguindo como padrão mínimo do Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013 (motilidade espermática visual $\geq 60\%$ e anormalidades espermáticas $\leq 30\%$).

6.2.1.2. Vacas

Foi utilizado como método de seleção o escore de condição corporal e classificado de 1 a 5 (AYRES et al., 2009), sendo 1 corresponde a uma vaca extremamente magra (caquética) e 5 a uma vaca obesa. Nenhum dos animais utilizados no experimento apresentou escore de condição corporal <3 . Além da seleção por escore corporal, todas as vacas passaram por um tratamento sanitário de vacinação contra doenças de relevância contra agentes infecciosos que afetam a reprodução bovina, utilizando-se especificamente a vacina Bovisan Total-SE, 30 e 10 dias antes de iniciar o protocolo de IATF. Na ocasião da primeira

vacinação foi feita também aplicação na linha dorsal do animal produto a base de cipermetrina, clorpirifos e citronelal (Colosso Pour On[®] – Ouro Fino) contra ectoparasitas.

6.2.2. Colheita e processamento do sêmen

Para este estudo foram utilizados três reprodutores, um da raça Brangus, outro da raça Braford e um da raça Angus, mantidos em regime de colheita em centrais de congelação de sêmen, com histórico de fertilidade conhecido. As amostras de sêmen foram obtidas por meio de vagina artificial e colhidas segundo as datas programadas para a IATF, 48 horas antes dos horários da inseminação para realizar o processamento do sêmen para criopreservação e refrigeração. Todos os ejaculados foram avaliados subjetivamente logo após a colheita quanto à motilidade espermática total e vigor sob microscopia de contraste de fase. Após as avaliações cada amostra de sêmen foi fracionada em 3 alíquotas iguais e diluídas no meio de criopreservação BotuBov[®] tanto para criopreservação na concentração de 30×10^6 espermatozoides/palheta (Grupo CRIO), como para refrigeração nas concentrações de 30 a 10^6 espermatozoides/palheta (Grupo R30) e 15×10^6 espermatozoides/palheta (Grupo R15). Após o envase em palhetas de 0,5 mL (IMV[®] Technologies, L'Aigle Cedex, France), as amostras criopreservadas e refrigeradas foram submetidas a dois tipos de processamento. A criopreservação do sêmen foi realizada em máquina de criopreservação TK 4000, utilizando-se a curva padrão P1S2, similar a utilizada no experimento 1. A refrigeração do sêmen, dos grupos R30 e R15 foi realizada em sistema passivo até a temperatura de 5°C em caixas isotérmicas BotuFlex[®] (Botufarma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil), permanecendo no sistema até a utilização nas inseminações com 48 horas de estocagem (Figuras 6, 7, 8 e 9). Todas as amostras refrigeradas e criopreservadas foram avaliadas subjetivamente no dia da utilização na inseminação artificial em tempo fixo, sendo que a motilidade total foi $\geq 50\%$ para sêmen criopreservado e $\geq 60\%$ para o sêmen refrigerado.

Figura 6 – Identificação das palhetas de sêmen dos tratamentos criopreservado (amarelo), refrigerado na concentração de 30×10^6 espermatozoides/palheta (vermelho) e 15×10^6 espermatozoides/palheta (verde) para uso na IATF

Fonte: (Bao Tarragó. O. F., 2017)

Figura 7 – Máquina para embase das amostras seminais e diluídas no meio Botubov® com os tratamentos R15, R30 e Crio – Experimento II

Fonte: (Bao Tarragó. O. F., 2017)

Figura 8 - Disposição das palhetas de sêmen para a refrigeração a 5° C nas caixas isotérmicas BotuFlex® para uso na IATF

Fonte: (Bao Tarragó. O. F., 2017)

Figura 9 – Coleta do Sêmen dos touros para o processamento antes da IATF

Fonte: (Bao Tarragó. O. F., 2017)

6.2.3. Protocolo de sincronização para a IATF

Em dia aleatório do ciclo estral (D0: 07:00) todos os animais receberam 2,0 mg de Benzoato de Estradiol Sintex® (Benzoato de estradiol, Sintex/Argentina) associado ao dispositivo intravaginal de progesterona monodose contendo 500 mg de progesterona (Syntex/Argentina). No D8 (07:00) os implantes foram retirados procedendo-se a administração de 400 UI de eCG (Novormon®, Syntex, Argentina), 500 µg cloprostenol sódico (Ciclase DL®, Sintex, Argentina) e 1 mg de Cipionato de Estradiol (Cipiosyn®, Sintex, Argentina). A IATF foi realizada entre 48-52 horas após a retirada da fonte de progesterona (D10).

Figura 10 – Protocolo de tratamento hormonal utilizado para a sincronização das vacas para a IATF

Fonte: (Bao Tarragó. O. F., 2017)

6.2.4. Delineamento – Experimento II

6.2.5. Exames ultrassonográficos

Todas as vacas foram submetidas a dois exames ultrassonográficos dos órgãos reprodutivos (Aloka-SSD 500, probe de 5 MHz, Tokyo, Japan), um realizado no momento da implantação do dispositivo intravaginal de progesterona (início do protocolo de IATF) e o segundo, após 30 dias da IATF para determinar a taxa de prenhez, sendo considerado como positivo quando visualizada a vesícula embrionária e confirmado os batimentos cardíacos embrionário.

6.3. Análise Estatística

No experimento 1 foram avaliados os efeitos fixos dos tratamentos do sêmen refrigerado (Botubov, Steridyl e Bovidyl) e dos tempos (tempo 0, 24 horas, 36 horas e 48 horas), assim como sua interação, além dos efeitos dos tratamentos do sêmen criopreservado (Botubov X Steridyl) e comparados os efeitos do sêmen refrigerado X criopreservado foram avaliados empregando PROC GLIMMIX do SAS.

No experimento 2, os efeitos fixos do tratamento (R15, R30 e Crio) e dos touros (Angus, Brangus e Bradford), assim como a interação Tratamento * Touro, foram avaliadas empregando o PROC GLIMMIX do SAS. Ainda foram considerados os efeitos aleatórios da vaca também. Devido a tendência de interação touro * tratamento ($p=0,06$) os resultados de touros e tratamentos são apresentados separados.

Foi considerada diferença estatística quando o valor de p foi $\leq 0,05$ e tendência estatística quando o valor de p foi entre 0,06 e 0,10.

7. RESULTADOS

7.1. EXPERIMENTO I: Efeitos do tempo de refrigeração a 5°C por 48 horas em três meios diluidores sobre a qualidade espermática e comparados ao sêmen criopreservado em dois meios diluidores

Os efeitos do tempo de refrigeração a 5° C para o sêmen diluído nos meios Botubov®, Steridyl® e Bovidyl® sobre as características espermáticas: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MPRO, %), células rápidas (RAP, %), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, $\mu\text{m/s}$), índice de oscilação WOB (VAP/VCL, %), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), defeitos maiores (MAI, %), defeitos menores (MEN, %), defeitos totais (TOT, %), membranas plasmáticas íntegras (PI, %), membranas acrossomais íntegras (AI, %), alto potencial mitocondrial (AP, %), células espermáticas com as membranas plasmáticas e acrossomais íntegras e alto potencial mitocondrial (PIAIA, %) e detecção de espécies reativas de oxigênio (CRSEM, %) encontram-se respectivamente nas Tabelas 1, 2 e 3.

Como constatado na Tabela 1 para o diluidor Botubov® notou-se redução dos valores médios de MT, MPRO, RAP, ALH, PI, AI, AP, PIAIA a partir de 24 horas de refrigeração, mantendo-se sem alteração até 48 horas de refrigeração, ainda foram notados algum efeito de tempo para as características VSL, VAP e WOB; no entanto, não foram observados efeitos para as demais características (MAI, MEI, TOT, VCL, LIN, STR, BCF e CRSEM).

Para o diluidor Bovidyl® (Tabela 2) foi observada redução dos valores médios de MT, MPRO, RAP, VCL, VSL, VAP, BCF, PI, AP e PIAIA a partir de 24 horas de refrigeração, sendo mantidos até 48 horas sem alterações, também foram notados alguns efeitos de tempo para as características WOB, ALH, AI e CRSEM não sendo observados efeitos para as outras características espermáticas (MAI, MEN, TOT, LIN e STR).

Quando foi utilizado o diluidor Steridyl®, foram observadas quedas nos valores médios de MT, RAP, VAP, STR, WOB, ALH, BCF, PI, AI, AP e PIAIA, além de aumento nas células CRSEM de 0 para 24 horas de refrigeração, não notando efeitos para as variáveis MPRO, MAI, MEN, TOT, VCL, VSL e LIN (Tabela 3).

Tabela 1 – Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de sêmen bovino diluído em meio Botubov® e refrigerado a 5° C nos tempos 0, 24, 36 e 48 horas

Características espermáticas	<i>In natura</i> *	Tempo após diluição e refrigeração				Valor P
		Tempo 0 h	Tempo 24 h	Tempo 36 h	Tempo 48 h	
MT (%)	90,87 $\pm$ 2,00	83,83 $\pm$ 3,09 A	59,04 $\pm$ 6,08 B	59,44 $\pm$ 5,63 B	55,31 $\pm$ 6,47 B	0,0003
MPRO (%)	64,29 $\pm$ 1,37	69,59 $\pm$ 2,70 A	50,36 $\pm$ 4,92 B	51,92 $\pm$ 4,57 B	47,28 $\pm$ 5,65 B	0,0009
RAP (%)	79,55 $\pm$ 2,39	77,96 $\pm$ 2,90 A	54,37 $\pm$ 5,77 B	55,28 $\pm$ 5,40 B	51,15 $\pm$ 6,11 B	0,0002
VCL (μ m/s)	112,07 $\pm$ 4,99	114,4 $\pm$ 3,55	109,16 $\pm$ 3,56	115,79 $\pm$ 3,69	106,04 $\pm$ 6,86	0,3221
VSL (μ m/s)	75,19 $\pm$ 3,15	88,08 $\pm$ 3,15 A	80,05 $\pm$ 2,03 AB	87,78 $\pm$ 1,90 AC	77,74 $\pm$ 5,29 B	0,0495
VAP (μ m/s)	90,37 $\pm$ 6,20	104,21 $\pm$ 3,52 A	91,59 $\pm$ 2,56 BC	97,74 $\pm$ 1,84 AC	88,88 $\pm$ 5,65 BC	0,0122
LIN (%)	67,43 $\pm$ 1,20	76,93 $\pm$ 0,98	73,76 $\pm$ 1,06	76,48 $\pm$ 1,32	69,29 $\pm$ 4,39	0,1037
STR (%)	74,61 $\pm$ 4,01	84,48 $\pm$ 0,72	87,64 $\pm$ 1,11	89,83 $\pm$ 0,95	82,38 $\pm$ 5,02	0,235
WOB (%)	81,39 $\pm$ 4,33	91,02 $\pm$ 0,50 A	84,28 $\pm$ 1,18 AB	85,21 $\pm$ 1,40 AB	79,42 $\pm$ 4,84 B	0,0224
ALH (μ m)	2,67 $\pm$ 0,09	2,35 $\pm$ 0,06 A	2,87 $\pm$ 0,14 B	2,98 $\pm$ 0,17 B	2,85 $\pm$ 0,22 B	0,0124
BCF (Hz)	8,25 $\pm$ 0,14	8,27 $\pm$ 0,14	9,54 $\pm$ 0,21	10,01 $\pm$ 0,37	13,46 $\pm$ 4,42	0,4147
MAI (%)	9,63 $\pm$ 1,45	13,64 $\pm$ 2,60	13,82 $\pm$ 3,47	14,29 $\pm$ 2,58	11,63 $\pm$ 1,85	0,6196
MEN (%)	1,17 $\pm$ 0,27	1,89 $\pm$ 0,43	1,82 $\pm$ 0,81	1,92 $\pm$ 1,08	1,5 $\pm$ 0,51	0,9678
TOT (%)	12,96 $\pm$ 2,45	15,54 $\pm$ 2,50	15,64 $\pm$ 3,32	16,21 $\pm$ 2,38	13,13 $\pm$ 1,63	0,5379
PI (%)	67,88 $\pm$ 3,70	55,93 $\pm$ 4,95 A	37,18 $\pm$ 5,52 B	35,59 $\pm$ 5,03 B	33,89 $\pm$ 5,12 B	0,0002
AI (%)	72,33 $\pm$ 3,31	67,56 $\pm$ 4,23 A	51,32 $\pm$ 5,12 B	53,29 $\pm$ 5,20 B	51,75 $\pm$ 4,99 B	0,009
AP (%)	68,8 $\pm$ 4,22	56,59 $\pm$ 5,16 A	35,45 $\pm$ 5,20 B	36,06 $\pm$ 5,55 B	35,03 $\pm$ 5,59 B	0,0001
PIAIA (%)	64,19 $\pm$ 4,18	55,77 $\pm$ 5,10 A	33,72 $\pm$ 5,04 B	34,21 $\pm$ 5,25 B	32,17 $\pm$ 5,16 B	<.0001
CRSEM (%)	27,08 $\pm$ 6,68	88,5 $\pm$ 4,41	86,33 $\pm$ 3,70	94,19 $\pm$ 2,06	88,75 $\pm$ 4,22	0,3932

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

*Dados de referência (não incluído nas avaliações estatísticas)

Legenda: MT: Motilidade Total; MPROG: Motilidade Progressiva; RAP: Porcentagem de espermatozoides rápidos; VCL: Velocidade curvilinear; VSL: Velocidade progressiva; VAP: Velocidade de trajeto; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Oscilação do movimento; BFC: Frequência de batimento; MAI: Defeitos espermáticos maiores, MEN: Defeitos espermáticos menores, TOT: Total de defeitos, PI: Espermatozoides com membrana plasmática intacta; AI: Espermatozoides com acrossoma Intacto; AP: Espermatozoides com alto potencial mitocondrial; PIAIA: Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial; CRSEM: espermatozoides sem produção de espécies reativas ao oxigênio

Fonte (Bao Tarragó O. F, 2016)

Tabela 2– Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de sêmen bovino diluído em meio Bovidyl® e refrigerado a 5° C nos tempos 0, 24, 36 e 48 horas

Características espermáticas	<i>In natura</i> *	Tempo após diluição e refrigeração				Valor P
		Tempo 0 h	Tempo 24 h	Tempo 36 h	Tempo 48 h	
MT (%)	90,87 $\pm$ 2,00	83,96 $\pm$ 3,59 A	30,77 $\pm$ 6,80 B	25,27 $\pm$ 7,37 B	28,19 $\pm$ 6,82 B	<.0001
MPRO (%)	64,29 $\pm$ 1,37	54,02 $\pm$ 3,81 A	20,48 $\pm$ 4,28 B	17,11 $\pm$ 4,65 B	21,19 $\pm$ 5,25 B	<.0001
RAP (%)	79,55 $\pm$ 2,39	73,25 $\pm$ 4,51 A	24,34 $\pm$ 5,95 B	20,19 $\pm$ 6,28 B	22,08 $\pm$ 5,47 B	<.0001
VCL (μ m/s)	112,07 $\pm$ 4,99	121,29 $\pm$ 5,42 A	102,29 $\pm$ 6,04 B	100,02 $\pm$ 5,22 B	86,28 $\pm$ 11,12 B	0,0095
VSL (μ m/s)	75,19 $\pm$ 3,15	74,68 $\pm$ 4,44 A	59,47 $\pm$ 3,33 B	59,92 $\pm$ 4,01 B	53,85 $\pm$ 7,69 B	0,0162
VAP (μ m/s)	90,37 $\pm$ 6,20	103,24 $\pm$ 5,73 A	76,01 $\pm$ 4,54 B	73,91 $\pm$ 4,05 B	69,39 $\pm$ 9,56 B	0,0008
LIN (%)	67,43 $\pm$ 1,20	61,16 $\pm$ 2,52	58,96 $\pm$ 2,40	60,04 $\pm$ 2,86	53,31 $\pm$ 6,72	0,4411
STR (%)	74,61 $\pm$ 4,01	72,07 $\pm$ 1,89	79,17 $\pm$ 2,81	80,96 $\pm$ 2,91	66,71 $\pm$ 8,03	0,0608
WOB (%)	81,39 $\pm$ 4,33	84,36 $\pm$ 1,84 A	74,70 $\pm$ 1,94 AB	74,02 $\pm$ 1,98 AB	68,44 $\pm$ 8,07 B	0,0532
ALH (μ m)	2,67 $\pm$ 0,09	2,84 $\pm$ 0,10 AB	3,39 $\pm$ 0,27 A	3,18 $\pm$ 0,22 A	2,41 $\pm$ 0,33 B	0,0319
BCF (Hz)	8,25 $\pm$ 0,14	7,80 $\pm$ 0,28 A	9,25 $\pm$ 0,47 B	9,39 $\pm$ 0,60 B	6,72 $\pm$ 0,82 A	0,003
MAI (%)	9,63 $\pm$ 1,45	14,27 $\pm$ 2,36	15,68 $\pm$ 3,79	10,08 $\pm$ 2,44	11,50 $\pm$ 1,93	0,8321
MEN (%)	1,17 $\pm$ 0,27	1,23 $\pm$ 0,34	2,27 $\pm$ 1,58	0,83 $\pm$ 0,21	1,00 $\pm$ 0,34	0,6326
TOT (%)	12,96 $\pm$ 2,45	15,50 $\pm$ 2,32	17,95 $\pm$ 3,52	10,92 $\pm$ 2,46	12,50 $\pm$ 1,82	0,4863
PI (%)	67,88 $\pm$ 3,70	57,38 $\pm$ 5,27 A	18,30 $\pm$ 5,74 B	14,92 $\pm$ 6,46 B	19,74 $\pm$ 6,48 B	<.0001
AI (%)	72,33 $\pm$ 3,31	66,22 $\pm$ 4,14 A	40,77 $\pm$ 5,38 BC	36,54 $\pm$ 5,94 B	54,07 $\pm$ 8,06 C	0,0002
AP (%)	68,8 $\pm$ 4,22	59,00 $\pm$ 5,45 A	16,53 $\pm$ 4,47 B	15,33 $\pm$ 7,01 B	19,13 $\pm$ 6,61 B	<.0001
PIAIA (%)	64,19 $\pm$ 4,18	57,77 $\pm$ 4,98 A	15,80 $\pm$ 4,46 B	13,71 $\pm$ 6,22 B	18,01 $\pm$ 6,23 B	<.0001
CRSEM (%)	27,08 $\pm$ 6,68	91,22 $\pm$ 2,63 A	80,78 $\pm$ 4,68 B	91,21 $\pm$ 3,38 A	93,88 $\pm$ 2,44 A	0,0152

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

*Dados de referência (não incluído nas avaliações estatística)

Legenda: MT: Motilidade Total; MPROG: Motilidade Progressiva; RAP: Porcentagem de espermatozoides rápidos; VCL: Velocidade curvilinear; VSL: Velocidade progressiva; VAP: Velocidade de trajeto; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Oscilação do movimento; BFC: Frequência de batimento; MAI: Defeitos espermáticos maiores, MEN: Defeitos espermáticos menores, TOT: Total de defeitos, PI: Espermatozoides com membrana plasmática intacta; AI: Espermatozoides com acrossoma Intacto; AP: Espermatozoides com alto potencial mitocondrial; PIAIA: Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial; CRSEM: espermatozoides sem produção de espécies reativas ao oxigênio

Fonte (Bao Tarragó O. F, 2016)

Tabela 3 – Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de sêmen bovino diluído em meio Steridyl® e refrigerado a 5° C nos tempos 0, 24, 36 e 48 horas

Características espermáticas	<i>In natura</i> *	Tempo após diluição e refrigeração				Valor P
		Tempo 0 h	Tempo 24 h	Tempo 36 h	Tempo 48 h	
MT (%)	90,87 $\pm$ 2,00	80,23 $\pm$ 3,90 A	60,44 $\pm$ 6,11 B	57,72 $\pm$ 5,23 B	58,38 $\pm$ 5,87 B	0,0044
MPRO (%)	64,29 $\pm$ 1,37	56,67 $\pm$ 2,93	47,47 $\pm$ 4,36	45,20 $\pm$ 4,01	47,72 $\pm$ 4,54	0,1756
RAP (%)	79,55 $\pm$ 2,39	75,83 $\pm$ 3,08 A	55,11 $\pm$ 5,69 B	51,84 $\pm$ 4,81 B	52,51 $\pm$ 5,58 B	0,0006
VCL (μ m/s)	112,07 $\pm$ 4,99	120,04 $\pm$ 7,46	124,17 $\pm$ 4,28	125,95 $\pm$ 3,87	124,56 $\pm$ 3,36	0,7398
VSL (μ m/s)	75,19 $\pm$ 3,15	79,27 $\pm$ 2,41	74,46 $\pm$ 2,72	75,13 $\pm$ 3,45	75,81 $\pm$ 1,97	0,4854
VAP (μ m/s)	90,37 $\pm$ 6,20	107,00 $\pm$ 3,48 A	90,34 $\pm$ 2,83 B	90,36 $\pm$ 3,15 B	89,41 $\pm$ 2,11 B	<.0001
LIN (%)	67,43 $\pm$ 1,20	63,54 $\pm$ 1,77	60,34 $\pm$ 1,74	59,63 $\pm$ 1,91	61,11 $\pm$ 1,17	0,3324
STR (%)	74,61 $\pm$ 4,01	74,36 $\pm$ 1,41 A	82,43 $\pm$ 1,48 B	82,81 $\pm$ 1,59 B	84,78 $\pm$ 0,83 B	<.0001
WOB (%)	81,39 $\pm$ 4,33	85,26 $\pm$ 0,91 A	73,13 $\pm$ 1,45 B	68,14 $\pm$ 3,53 B	72,15 $\pm$ 1,44 B	<.0001
ALH (μ m)	2,67 $\pm$ 0,09	2,95 $\pm$ 0,12 A	3,96 $\pm$ 0,20 B	4,17 $\pm$ 0,18 B	4,21 $\pm$ 0,20 B	<.0001
BCF (Hz)	8,25 $\pm$ 0,14	8,14 $\pm$ 0,18 A	9,83 $\pm$ 0,28 B	9,91 $\pm$ 0,27 B	9,83 $\pm$ 0,26 B	<.0001
MAI (%)	9,63 $\pm$ 1,45	11,79 $\pm$ 1,92	14,17 $\pm$ 2,88	12,82 $\pm$ 2,62	9,79 $\pm$ 1,72	0,1228
MEN (%)	1,17 $\pm$ 0,27	1,54 $\pm$ 0,29	1,29 $\pm$ 0,34	2,36 $\pm$ 1,15	1,67 $\pm$ 0,54	0,612
TOT (%)	12,96 $\pm$ 2,45	13,32 $\pm$ 2,00	15,46 $\pm$ 2,96	15,18 $\pm$ 2,51	11,46 $\pm$ 1,66	0,1349
PI (%)	67,88 $\pm$ 3,70	58,99 $\pm$ 5,55 A	39,61 $\pm$ 5,99 B	33,07 $\pm$ 5,31 B	38,23 $\pm$ 5,67 B	0,0006
AI (%)	72,33 $\pm$ 3,31	74,32 $\pm$ 3,57 A	54,36 $\pm$ 5,25 B	52,47 $\pm$ 4,98 B	59,19 $\pm$ 5,67 B	0,0006
AP (%)	68,8 $\pm$ 4,22	59,71 $\pm$ 5,75 A	39,06 $\pm$ 5,60 B	34,51 $\pm$ 5,41 B	38,86 $\pm$ 5,69 B	0,0003
PIAIA (%)	64,19 $\pm$ 4,18	57,46 $\pm$ 5,58 A	36,14 $\pm$ 5,40 B	32,45 $\pm$ 5,24 B	36,66 $\pm$ 5,55 B	0,0003
CRSEM (%)	27,08 $\pm$ 6,68	85,20 $\pm$ 5,28 A	87,57 $\pm$ 3,87 AC	94,83 $\pm$ 1,87 BC	96,92 $\pm$ 1,12 B	0,0511

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

*Dados de referência (não incluído nas avaliações estatísticas)

Legenda: MT: Motilidade Total; MPROG: Motilidade Progressiva; RAP: Porcentagem de espermatozoides rápidos; VCL: Velocidade curvilínea; VSL: Velocidade progressiva; VAP: Velocidade de trajeto; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Oscilação do movimento; BFC: Frequência de batimento; MAI: Defeitos espermáticos maiores, MEN: Defeitos espermáticos menores, TOT: Total de defeitos, PI: Espermatozoides com membrana plasmática intacta; AI: Espermatozoides com acrossoma Intacto; AP: Espermatozoides com alto potencial mitocondrial; PIAIA: Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial; CRSEM: espermatozoides sem produção de espécies reativas ao oxigênio

Fonte (Bao Tarragó O. F, 2016)

Quando foram comparados os diluidores Botubov®, Bovidyl® e Steridyl® em relação a capacidade de preservar as características espermáticas após a refrigeração a 5° C por 48 horas (Tabela 04) notou-se que Botubov® foi semelhante ao Steridyl® e ambos foram superiores ao Bovidyl® para MT, MPRO, RAP, VSL, VAP, STR e PI. Para VCL Steridyl apresentou valor superior ao Botubov® e ambos mostraram resultados superiores para Bovidyl®. As outras características não apresentaram diferenças entre os diluidores.

Tabela 4 – Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de sêmen bovino diluído nos meios Botubov® (BB), Bovidyl® (BV) e Steridyl® (ST) e refrigerado por 48 horas a 5 °C

Características espermáticas	Diluidores								Valor do P				
	Botubov®			Bovidyl®			Steridyl®						
MT (%)	55,31	±	6,46	A	28,18	±	6,81	B	58,37	±	5,87	A	0,0004
MPRO (%)	47,28	±	5,65	A	21,19	±	5,24	B	47,72	±	4,54	A	0,0001
RAP (%)	51,15	±	6,10	A	22,07	±	5,46	B	52,51	±	5,57	A	<.0001
VCL (µm/s)	106,04	±	6,86	A	86,27	±	11,12	B	124,56	±	3,35	C	0,0014
VSL (µm/s)	77,73	±	5,29	A	53,85	±	7,694	B	75,805	±	1,97	A	0,0021
VAP (µm/s)	88,88	±	5,64	A	69,38	±	9,563	B	89,40	±	2,11	A	0,0213
LIN (%)	69,29	±	4,39	A	53,31	±	6,71	B	61,11	±	1,16	AB	0,0321
STR (%)	82,38	±	5,02	A	66,70	±	8,02	B	84,77	±	0,82	A	0,0347
WOB (%)	79,41	±	4,83		68,44	±	8,06		72,15	±	1,44		0,2061
ALH (µm)	2,85	±	0,22	A	2,41	±	0,33	A	4,21	±	0,20	B	<.0001
BCF (Hz)	13,45	±	4,42		6,72	±	0,82		9,82	±	0,25		0,2613
MAI (%)	11,62	±	1,84		11,50	±	1,93		9,79	±	1,71		0,214
MEN (%)	1,50	±	0,50		1,00	±	0,34		1,66	±	0,54		0,6016
TOT (%)	13,12	±	1,62		12,50	±	1,81		11,45	±	1,65		0,3183
PI (%)	33,88	±	5,12	A	19,74	±	6,47	B	38,23	±	5,67	A	0,0044
AI (%)	51,75	±	4,99		54,07	±	8,06		59,18	±	5,66		0,3535
AP (%)	35,02	±	5,58	A	19,12	±	6,61	B	38,86	±	5,69	A	0,0024
PIAIA (%)	32,16	±	5,15	A	18,00	±	6,22	B	36,65	±	5,54	A	0,0034
CRSEM (%)	88,7500	±	4,22		93,88	±	2,43		96,91	±	1,11		0,0686

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Legenda: MT: Motilidade Total; MPROG: Motilidade Progressiva; RAP: Porcentagem de espermatozoides rápidos; VCL: Velocidade curvilínea; VSL: Velocidade progressiva; VAP: Velocidade de trajeto; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Oscilação do movimento; BFC: Frequência de batimento; MAI: Defeitos espermáticos maiores, MEN: Defeitos espermáticos menores, TOT: Total de defeitos, PI: Espermatozoides com membrana plasmática intacta; AI: Espermatozoides com acrossoma Intacto; AP: Espermatozoides com alto potencial mitocondrial; PIAIA: Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial; CRSEM: espermatozoides sem produção de espécies reativas ao oxigênio

Fonte (Bao Tarragó O. F, 2016)

De acordo com os dados apresentados na Tabela 05, quando os dois meios diluidores para criopreservação do sêmen foram comparados, Botubov® apresentou menor LIN, maior WOB, PI e PIAIA do que Steridyl®, sendo as outras características semelhantes.

Tabela 5 – Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de sêmen bovino criopreservado nos meios Botubov® e Steridyl®

Características espermáticas	Sêmen Criopreservado				Valor do P
	Botubov		Steridyl		
MT (%)	47,24	± 5,53	46,27	± 5,65	0,9025
MPRO (%)	37,16	± 4,79	38,52	± 5,32	0,8512
RAP (%)	43,51	± 5,35	43,47	± 5,71	0,9961
VCL (µm/s)	152,56	± 5,36	141,61	± 5,66	0,1720
VSL (µm/s)	76,60	± 3,04	79,50	± 2,77	0,4665
VAP (µm/s)	92,04	± 2,91	94,03	± 2,46	0,5880
LIN (%)	50,41	± 1,41 A	57,34	± 2,59 B	0,0256
STR (%)	82,94	± 1,20	84,32	± 1,52	0,4776
WOB (%)	60,58	± 0,99 A	67,56	± 2,16 B	0,0067
ALH (µm)	3,01	± 0,13	2,66	± 0,13	0,0781
BCF (Hz)	23,62	± 0,48	22,12	± 1,00	0,1905
MAI (%)	11,06	± 2,14	9,03	± 1,68	0,1468
MEN (%)	2,66	± 1,05	1,25	± 0,67	0,1455
TOT (%)	13,72	± 2,26	10,28	± 1,72	0,0765
PI (%)	28,08	± 4,68 A	14,97	± 2,24 B	0,0075
AI (%)	43,52	± 4,51	35,83	± 3,06	0,0875
AP (%)	35,07	± 5,31	33,68	± 4,54	0,7626
PIAIA (%)	26,72	± 4,55 A	13,00	± 2,15 B	0,0044
CRSEM (%)	79,82	± 4,55	80,76	± 4,93	0,8893

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

Legenda: MT: Motilidade Total; MPROG: Motilidade Progressiva; RAP: Porcentagem de espermatozoides rápidos; VCL: Velocidade curvilínea; VSL: Velocidade progressiva; VAP: Velocidade de trajeto; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Oscilação do movimento; BFC: Frequência de batimento; MAI: Defeitos espermáticos maiores, MEN: Defeitos espermáticos menores, TOT: Total de defeitos, PI: Espermatozoides com membrana plasmática intacta; AI: Espermatozoides com acrossoma Intacto; AP: Espermatozoides com alto potencial mitocondrial; PIAIA: Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial; CRSEM: espermatozoides sem produção de espécies reativas ao oxigênio

Fonte (Bao Tarragó O. F, 2016)

Na Tabela 06 são apresentados os valores das amostras de sêmen refrigerado a 5° C por 48 horas e pós-criopreservação utilizando o diluidor Botubov®. Foram encontradas diferenças estatísticas apenas para as variáveis VCL, LIN, WOB e BCF. O sêmen refrigerado apresentou maiores valores para LIN e WOB e menores valores para VCL e BCF do que o sêmen criopreservado.

Tabela 6 – Média $\pm$ erro padrão características espermáticas de sêmen bovino refrigerado a 5° C por 48 horas e criopreservado utilizando o diluidor Botubov®

Características espermáticas	Refrigerado	Criopreservado	Valor do P
MT (%)	55,31 $\pm$ 6,47	47,24 $\pm$ 5,53	0,3184
MPRO (%)	47,28 $\pm$ 5,65	37,16 $\pm$ 4,79	0,1602
RAP (%)	51,15 $\pm$ 6,11	43,51 $\pm$ 5,35	0,3251
VCL ($\mu\text{m/s}$)	106,04 $\pm$ 6,86 A	152,56 $\pm$ 5,36 B	<.0001
VSL ($\mu\text{m/s}$)	77,74 $\pm$ 5,29	76,60 $\pm$ 3,04	0,8511
VAP ($\mu\text{m/s}$)	88,88 $\pm$ 5,65	92,04 $\pm$ 2,91	0,6181
LIN (%)	69,29 $\pm$ 4,39 B	50,41 $\pm$ 1,41 A	0,0004
STR (%)	82,38 $\pm$ 5,02	82,94 $\pm$ 1,20	0,9143
WOB (%)	79,42 $\pm$ 4,84 B	60,58 $\pm$ 0,99 A	0,0008
ALH (μm)	2,85 $\pm$ 0,22	3,01 $\pm$ 0,13	0,5250
BCF (Hz)	13,46 $\pm$ 4,42 B	23,62 $\pm$ 0,48 A	0,0308
MAI (%)	11,63 $\pm$ 1,85	11,06 $\pm$ 2,14	0,9192
MEN (%)	1,50 $\pm$ 0,51	2,66 $\pm$ 1,05	0,3377
TOT (%)	13,13 $\pm$ 1,63	13,72 $\pm$ 2,26	0,8836
PI (%)	33,89 $\pm$ 5,12	28,08 $\pm$ 4,68	0,2306
AI (%)	51,75 $\pm$ 4,99	43,52 $\pm$ 4,51	0,0855
AP (%)	35,03 $\pm$ 5,59	35,07 $\pm$ 5,31	0,9935
PIAIA (%)	32,17 $\pm$ 5,16	26,72 $\pm$ 4,55	0,2523
CRSEM (%)	88,75 $\pm$ 4,22	79,82 $\pm$ 4,55	0,1147

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) dentro da mesma linha denotam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

Legenda: MT: Motilidade Total; MPROG: Motilidade Progressiva; RAP: Porcentagem de espermatozoides rápidos; VCL: Velocidade curvilinear; VSL: Velocidade progressiva; VAP: Velocidade de trajeto; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Oscilação do movimento; BFC: Frequência de batimento; MAI: Defeitos espermáticos maiores, MEN: Defeitos espermáticos menores, TOT: Total de defeitos, PI: Espermatozoides com membrana plasmática intacta; AI: Espermatozoides com acrossoma Intacto; AP: Espermatozoides com alto potencial mitocondrial; PIAIA: Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial; CRSEM: espermatozoides sem produção de espécies reativas ao oxigênio
Fonte: (Bao Tarragó O. F, 2016)

7.2. EXPERIMENTO II: Efeitos da refrigeração do sêmen a 5°C por 48 horas em relação ao sêmen criopreservado sobre a fertilidade

Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos de sêmen criopreservado, R15 e R30 na taxa de gestação. No Gráfico 1 são apresentados os valores para os grupos de vacas prenhes ou vazias.

Gráfico 1 – Taxa de prenhez do sêmen bovino refrigerado nas concentrações de 15×10^6 sptz/palheta (R15) ou 30×10^6 sptz/palheta (R30) e sêmen criopreservado (CRIO) de vacas submetidas à IATF

Fonte (Bao Tarragó O. F, 2016)
($p > 0,05$)

Quando investigado o efeito do touro, foi verificada tendência a efeito significativo do touro Braford no tratamento R15 apresentar os melhores resultados, como visto no Gráfico 02.

Gráfico 2 – Taxa de prenhez do sêmen bovino de diferentes touros e refrigerado nas concentrações de 15×10^6 spz/palheta (R15) ou 30×10^6 spz/palheta (R30) e sêmen criopreservado (CRIO) de vacas submetidas à IATF

Fonte (Bao Tarragó O. F, 2016)

a,b letras diferentes sobre as barras, dentro de cada raça, denotam diferença estatística ($p < 0,05$)

8. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para avaliar se a refrigeração do sêmen bovino poderia ser uma alternativa viável e/ou mais eficiente para o uso em programas de IATF em gado de corte como uma metodologia a mais ao sêmen criopreservado, sendo formulada a hipótese de que o sêmen submetido submentido à refrigeração, sem passar pelo processo de congelação e descongelação poderia resultar em redução aos danos nas células espermáticas e aumento na taxa de fertilidade. Para este estudo, foram delineados dois experimentos, sendo o primeiro para comparar *in vitro* os danos da refrigeração X criopreservação sobre os espermatozoides, além de permitir a escolha do melhor diluidor para este fim e do tempo de refrigeração; enquanto, o segundo experimento para comparar *in vivo* a fertilidade de sêmen submetido à refrigeração X criopreservação, utilizando-se o diluidor e o tempo de refrigeração escolhidos no primeiro experimento.

8.1. Experimento I

Variados e numerosos são os fatores que podem influenciar a taxa de prenhez ou fertilidade dos espermatozoides congelados bovinos, como tipo de diluidor, concentração espermática na palheta, entre outros. Assim, o objetivo deste experimento foi testar *in vitro* uma opção de metodologia para o uso no momento de realizar as inseminações em tempo fixo, na procura de um meio diluidor e tempo máximo de refrigeração ótimo. Entretanto, baseados que os processos que envolvem a fertilidade são multifatoriais, torna-se improvável que a avaliação de um único atributo espermático possa refletir a real capacidade de fertilização de uma amostra seminal (HALLAP, 2005). Parâmetros classicamente utilizados na rotina de análise laboratorial do sêmen congelado, como a avaliação subjetiva da motilidade espermática e da morfologia dos espermatozoides, apresentam um valor limitado para o estudo do efeito de diferentes meios diluidores sobre a viabilidade espermática (GIL et al., 2000, citado por CRESPILO, 2007). Desta forma, para este estudo foram considerados durante a avaliação as características de movimento espermático determinadas por sistema computadorizado (ARRUDA, 2000), morfologia espermática avaliada sob microscopia DIC (CELEGHINI et al., 2008), ainda foram utilizadas sondas fluorescentes específicas

para avaliar as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (CELEGHINI et al., 2007) e a produção de espécies reativas ao oxigênio (ALVES et al., 2015).

Neste experimento foi avaliado o efeito do tempo de refrigeração do sêmen a 5°C até 48 horas em diluidores comerciais (Botubov[®], Bovidyl[®] e Steridyl[®]) em palhetas de 0,5 mL armazenado em containers BOTUFLEX[®] sobre a viabilidade espermática *in vitro*. Notou-se que a motilidade total após 24 horas de refrigeração a 5°C, apresentou uma queda significativa para os três diluidores e se manteve estável até 48 horas de refrigeração. Para o sêmen diluído com os meios Botubov[®] e Steridyl[®] a queda foi de 24,8% e 19,79%, respectivamente; estes valores foram superiores aos observados em pesquisas recentes como as de Crespilho et al. (2014); Papa et al. (2015); Murphy et al. (2016) e Borges et al. (2015); porém, inferiores aos valores obtidos por Mushtaq et al. (2013). Já o diluidor Bovidyl[®] apresentou capacidade inferior em manter a motilidade total, perdendo 53,2% nas primeiras 24 horas.

Segundo Farrel et al. (1998) a motilidade progressiva representa um dos parâmetros de maior repetibilidade quando analisadas amostras espermáticas pelo CASA. Assim neste estudo a motilidade progressiva demonstrou queda nas primeiras 24 horas para todos os diluidores Botubov[®] (19,2%) e Bovidyl[®] (33,5%) e manteve-se semelhante até 48 horas de refrigeração. A motilidade progressiva é um índice altamente desejável de qualidade espermática, associado a integridade de características estruturais do espermatozoide (BARNABÉ et al., 1981). O efeito do tempo para motilidade progressiva observado no presente trabalho também foi observado por outros pesquisadores, sendo maiores aos valores demonstrados nas pesquisas realizadas por Crespilho et al. (2014); Papa et al. (2015); Murphy et al. (2016); Borges et al. (2015), porém menores aos valores obtidos por Mushtaq et al. (2013). Também notou-se estabilidade da motilidade progressiva de 24 até 48 horas de refrigeração em todos os meios testados.

Em relação às variáveis velocidade curvilínea (VCL), velocidade progressiva (VSL) e velocidade de trajeto (VAP), que expressam a velocidade espermática ao longo de sua trajetória, foram observados efeitos do tempo apenas para o VSL e VAP no diluidor Botubov[®], já para as amostras diluídas no meio Bovidyl[®], foram encontrados efeitos de tempo para VCL, VSL e VAP, apresentando queda nestas velocidades somente até 24 horas de refrigeração e se mantendo até 48 horas de refrigeração. O diluidor Steridyl[®] para estas velocidades sofreu apenas queda nas primeiras 24 horas de refrigeração para a variável VAP, mantendo-se sem variações até as 48 horas estudadas.

Estes achados variados poderiam ser atribuídos as diferentes viscosidades particulares de cada diluidor.

Em relação ao percentual de células rápidas verificou-se comportamento semelhante à motilidade total para os três diluidores testados, ou seja, encontrou-se queda com 24 horas de refrigeração e se manteve semelhante até 48 horas de refrigeração, dados que coincidem aos danos espermáticos na ultraestrutura e nas características física, bioquímicas e/ou funcionais do espermatozoides que foram submetidos a refrigeração (WATSON, 2000; CELEGHINI et al., 2008).

A linearidade espermática (LIN) representa uma variável de alta correlação com o potencial de fertilização do sêmen bovino congelado (JANUSKAUSKAS et al., 2001; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, 2005). Januskauskas et al. (2001) observaram uma correlação significativa ($r = 0,82$) entre a linearidade espermática e motilidade total pós-descongelção. No presente trabalho não foram observadas diferenças significativas quando avaliados efeitos dos tempos para cada diluidor, mas interessante valores superiores foram encontrados para o diluidor Botubov® após 48 horas de refrigeração. Este resultado foi levado em consideração para a eleição como melhor meio diluidor para o teste de fertilidade no experimento II.

Em relação à porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta (PI), observou-se danos significativos durante as primeiras 24 horas de refrigeração, resultado similar aos de Garcia et al. (1999) e Crespilho et al. (2014), porém Papa et al. (2015) não observaram diferenças significativas nas primeiras 24 horas de refrigeração quando utilizado o mesmo diluidor do presente trabalho (Botubov®). Perda da integridade das membranas acrossomais e do potencial de membrana mitocondrial ocorreram também do momento imediatamente após a diluição até 24 horas de refrigeração. O meio diluidor Botubov® foi melhor que o Bovidyl®, mas igual ao Steridyl® após 48 horas de refrigeração, a mesma situação aconteceu com o potencial de mitocôndrias, para todas estas variáveis estudadas houve interação significativa entre tempo de refrigeração e o diluidor.

Neste estudo também foram comparados dois diluidores para criopreservação do sêmen, Botubov® e Steridyl®. Notou-se que ambos se comportaram de forma semelhante, uma característica que foi diferente entre eles foi o percentual de células PIAIA que foi superior no Botubov® (26,7%) do que no Steridyl® (13%), o que fortaleceu sua escolha para o experimento II.

Neste experimento o sêmen refrigerado foi comparado ao criopreservado (como grupo controle), já que o sêmen criopreservado é a forma mais utilizada atualmente para a IATF em bovinos no campo.

Contudo, verificou-se que tanto a criopreservação como a refrigeração ocasionam danos sobre as membranas plasmáticas, membranas acrossomais tanto quanto sobre o potencial de membrana mitocondrial. Observou-se que as amostras seminais refrigeradas por 48 horas ou criopreservadas, ambas no diluidor Botubov®, apresentam características muito semelhantes, diferindo estatisticamente apenas para VCL (106,04 vs 152,56 $\mu\text{m/s}$) e linearidade (69,29 vs 50,41%) principalmente. Desta maneira, se justifica a realização do teste de fertilidade para verificar sua eficiência.

8.2. Experimento II

Este experimento foi realizado para verificar se o uso de sêmen refrigerado a 5°C por 48 horas melhora a fertilidade após IATF em relação ao sêmen criopreservado, além de avaliar duas concentrações espermáticas na palheta do sêmen refrigerado. Contudo, não foi observada diferença entre os tratamentos, ou seja, o sêmen refrigerado tanto quanto o sêmen criopreservado apresentaram taxa de prenhez similar, o que reflete o comportamento observado *in vitro* no experimento I, no qual ambos apresentaram características espermáticas semelhantes. Porém, quando se avaliou os touros individualmente constatou-se tendência ($p=0,06$) para o sêmen refrigerado na concentração de 15×10^6 spz/palheta (R15) ser melhor para o touro Brangus utilizado neste trabalho. Resultado interessante, já que isto mostra que mesmo com a metade da dose inseminante, comparado ao R30 (doses inseminante de 30×10^6 spz/palheta) a porcentagem de prenhez foi melhor. No trabalho de Bucher et al. (2009), foi demonstrado que as doses inseminantes podem ser menores, quando se utiliza sêmen mantido a temperatura ambiente em meio diluidor Caprogen por 48 horas utilizando 3×10^6 spz/palheta e sêmen criopreservado com 20×10^6 spz/palheta, obtendo resultados estatisticamente semelhantes para a taxa de prenhez, sendo de 51,5% para sêmen a temperatura ambiente e de 50,4% para sêmen criopreservado.

O objetivo deste trabalho não era buscar a substituição do sêmen criopreservado para a IATF, apenas demonstrar que o sêmen refrigerado também pode ser utilizado como uma ferramenta a mais para este processo, que não precisa de botijões

criogênicos, nem de energia elétrica para descongelar as palhetas, economizando tempo no momento de inseminar grande número de vacas. Ambas as técnicas, tanto a criopreservação como a refrigeração têm suas vantagens e desvantagens muito bem determinadas. Também não foi testado neste estudo o uso de sêmen refrigerado com 24 horas ou até menos, com 12 horas de refrigeração, dado que seria muito interessante continuar pesquisando, já que trabalhos recentes como de Papa et al. (2015) e Borges et al. (2015), mostram maior eficiência quando o sêmen refrigerado é utilizado até 24 horas a temperatura de 5°C.

No decorrer deste trabalho foram observadas situações que devem ser destacadas. Em primeiro a opção de utilizar sêmen refrigerado mostrou-se mais prático, rápido e menos oneroso quando comparado à utilização de sêmen criopreservado. O fato de não ter que descongelar as palhetas (processo que leva tempo quando os lotes de vacas para IATF são grandes) poupa tempo e torna mais ágil o processo da IA. As vacas ficam menos tempo no curral, menos estressadas e retornam ao pasto mais rapidamente. Inseminar com sêmen refrigerado também demonstrou menos oneroso, já que dispensa o custo de botijões criogênicos (valor médio de R\$ 2.500,00 cada) e da manutenção com reabastecimentos de nitrogênio líquido (R\$ 7,00 a R\$ 9,00 por litro de N₂ líquido), e deve ser feito em várias ocasiões, que irá depender da quantidade de lotes e número de vacas, temperatura ambiente, manejo do botijão. Pelo contrário, o dispositivo utilizado para refrigerar o sêmen neste estudo, tem um valor aproximado de R\$ 17,00, assim se um botijão criogênico custa em torno de R\$ 2.500,00, poderia ser comprado com o mesmo valor 147 dispositivos BotuFlex® para uso na IA podendo ainda, o BotuFlex® ser reutilizado. Assim, vemos que o emprego do sêmen refrigerado poderia se tornar uma ocasião de empregar ou de oferecer mais um serviço eficiente aos pecuaristas aumentando as possibilidades de emprego de médicos veterinários independentes. Neste trabalho, não foi observado aumento de eficiência do sêmen refrigerado sobre a taxa de prenhez, mas em trabalhos anteriores (PAPA et al., 2015; CRESPILO et al., 2012; BORGES-SILVA et al., 2016), utilizando menos tempo de refrigeração e ainda um período de refrigeração maior, foram observadas porcentagens altamente mais eficientes para a taxa de prenhez após inseminação artificial, sendo desta maneira uma metodologia de serviço interessante para o pecuarista. Mais uma observação, se deve aos custos da biotécnica, sendo que os valores iniciais utilizando sêmen criopreservado são mais altos, comparando ao sêmen refrigerado, assim com a diminuição de custos e

aumento da eficiência, continua a atrair mais o interesse de pecuarista e torna a produção de bezerros uma atividade econômica mais rentável.

CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram concluir que:

9.1. Experimento I

1. Os diluidores Botubov[®] e Steridyl[®] são similares em preservar o sêmen bovino refrigerado a 5° C por até 48 horas, porém o diluidor Bovidyl[®] apresenta capacidade inferior que estes. Nota-se que após 24 horas de refrigeração houve uma queda na qualidade do sêmen, mas percorrido este período os parâmetros seminais avaliados se mantem por até 48 horas.
2. A criopreservação do sêmen com os diluidores Botubov[®] e Steridyl[®] apresenta-se semelhante na preservação das características espermáticas pós-criopreservação, mas Botubov[®] preserva melhor a integridade das membranas plasmáticas.
3. Os danos causados às células espermáticas após o processo da refrigeração a 5° C por 48 horas são semelhantes aos causados pela criopreservação do sêmen.

9.2. Experimento II

1. A taxa de prenhez após IATF em vacas é semelhante quando se utiliza sêmen refrigerado ou criopreservado.
2. A refrigeração do sêmen bovino com 15×10^6 ou 30×10^6 espermatozoides/palheta resulta em taxa de prenhez semelhante após IATF.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALVES, M. B. R.; DE ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; LANCONI, R.; OLIVEIRA, B. M. M.; TORRES, M. A.; RAVAGNANI, G. M.; ALMEIDA, T. G.; VELLONE, V. S.; CELEGHINI, E. C. C. An efficient technique to detect sperm reactive oxygen species: the CellRox Deep Red® fluorescent probe. **Biochemistry and Physiology**, v. 4, p. 2-6, 2015.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. AND LIU, I.K.M. Flow cytometric membrane and acrosomal integrity of the stallion spermatozoa. **Acta Scientiae Vet**, 31, 226-227, 2003.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C; ANDRADE, A.F.C.; GARCIA, A. R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; SOUZA, L. W. O. Cuidados com o semen em programas de IATF e TETF. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2004, Londrina-PR. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos (Simpósios). São Paulo-SP : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade de São Paulo,p.166-179

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. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos (Simpósios). São Paulo-SP : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade de São Paulo, 2006. p. 157-164

AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R.S.; DEMÉTRIO, C.G.B.; DE LIMA, C. G.; BARUSELLI, P. S. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos Indicus*) cows. **Livestock Science**, v. 123, n. 2-3 p. 175-179, 2009.

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 anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479–486, 2004.

BARUSELLI, P. S. IATF supera dez milhões de procedimentos e amplia o mercado de trabalho. **Revista CFMV**. Ano XXII, nº 69, p. 57-60. 2016

BORGES-SILVA, J.C., SILVA, M. R., MARINHO, D. B., NOGUEIRA, E., SAMPAIO, D. C, OLIVEIRA, L. O. F, ABREU, U.G.P., MOURAO, G.B., SARTORI, R. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 28 n. 7 p. 1004-1008, 2015

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, n. 7, p. 1180–1185, 2009.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: In: INTERNACIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, Porto Seguro., **Anais...**2004.

CELEGHINI, E. C. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, n. 5, p. 479–88, 2007.

CELEGHINI, E. C. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2-4, p. 119–31, 2008.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 536–543, 2010.

CENSO DEMOGRÁFICO 2015. Características da população e dos domicílios: resultados do universo. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. Acompanha 1 CD-ROM. Disponível em: . Acesso em: mar. 2016.

CRESPILHO, A. C. **Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo fixo**. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Fevereiro. 2007

CRESPILHO, A.C.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JR, J.A.; ZAHN, F.; MARTINS JR, A.; ARAUJO, G.H.M.; OBA, E. Effect of glycerol concentration on the motility and viability of cooled-stored ram semen In: International Congress on Animal Reproduction, 16, 2008, Budapest, Abstract. Budapest, Hungria: 2008.

CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.; GUASTI, P. N.; JOSE ANTONIO DELL'AQUA. Influence of Different Preservation Methods on Fertility of Bovine Semen. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 459, 2009.

CRESPILHO, A.M., PAPA, F.O., SANTOS, M. P., SÁ FILHO, M.F. Use of cooled bull semen strategy to increase the pregnancy rate in fixed time artificial insemination programs-case report. **American Journal of Animal and Veterinary Science**. 4, 7, 175-179, 12, 2012.

CRESPILHO, A.M., NICHI, M., GUASTI, P.N., FREITAS-DELL'AQUA, C. P., SÁ FILHO, M.F., MAZIERO, R.R., FREITAS-DELL'AQUA, J.A., PAPA, F.O. Sperm fertility 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. **Animal Reproduction Science**. 146, 126-133, 3, 2014.

FARRELL, P. .; FOOTE, R. .; M.M, M.; TROUERN-TREND, V. .; A.L, T. Media Handling and Dilution Effects Computer-Assisted Procedures on Human, Tested

Rabbit, to Minimize and Bull Sperm Sperm Analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v. 17, n. 3, p. 293–300, 1996.

GARCIA, A.R.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H. et al. Influência do uso de sêmen resfriado e da aplicação de GnRH sobre a taxa de prenhez de novilhas Nelore inseminadas em tempo-fixado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.342-344, 1999.

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, n. 8, p. 1260–1268, 2008.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Transporte e sobrevivência de gametas. In. *Reprodução Animal*. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. p.83-96.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 947–961, 2001.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle Membrane Changes in Cryopreserved Bull Semen in Relation with Sperm Viability, Chromatin Structure, and Field Fertility. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 743–758, 2003.

MAPA. **Brasil Projeções do Agronegócio 2010/2011 a 2020/2021**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOS DO AGRONEGOCIO 2010-11 a 2020-21 - 2_0.pdf>.

MURPHY, E. M.; MURPHY, C.; O'MEARA, C.; DUNNE, G.; EIVERS, B.; LONERGAN, P.; FAIR, S. A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. **Journal Dairy Scienc**. v.100, n. 2, p. 1-14, 2016

NOGUEIRA, É.; SILVA, A. S., MARQUES JÚNIOR, H. R.; NOGUEIRA, R. J.; BORGES, J. C. Taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF no Planalto Boliviano Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011. 5p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 101). Disponível em: .Acesso em: 20 dez. 2015

OLIVEIRA, B.M.M.; ARRUDA, R.P.; THOME, H.E.; MATURANA FILHO, M.; OLIVEIRA, G.C.; NICHI, M.; SILVA, L.A.; CELEGHINI, E.C.C. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology**, v. 82, p. 767-772, 2014.

PAPA., F. O., SANTOS, M. P., SÁ FILHO, M.F. Use of cooled bull sêmen as a strategy to increase the pregnancy rate in fixed time artificial insemination programs. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 7 n.4, 2012

PAPA, M.P., MAZIERO, R. M., GUASTI, P. N., JUNQUEIRA, C. R., FREITAS-DELL'AQUA, C. P., PAPA., F. O., PAPA., F. O., VIANA, F. P., ALVARENGA, M. A., PAPA., F. O. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. **Theriogenology**. 83, 107-113, 8, 2015

- PAPA, O. F. Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2006, Londrina-PR. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos (Simpósios). São Paulo-SP : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", 2008. p. 78-94
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209–222, 1992. RABELO, L. Planejamento e Gestão na Produção Pecuária. In: V Simpósio Nacional sobre Produção e Gerenciamento da Pecuária de Corte, **Anais...**2012.
- SÁ FILHO, M. F. Importancia da ocorrência de estro e do diametro folicular no momento da inseminacao em protocolos de sincronizacao da ovulacao artificial a tempo fixo. Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012
- SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E. P.; PERRY, G. a.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled Bos indicus cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 23–30, 2010.
- VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, a.; DEWULF, J.; DE PAUW, I.; DE KRUIF, a. Storage of fresh bovine semen in a diluent based on the ionic composition of cauda epididymal plasma. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 6, p. 410–416, 2004.
- VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 912–922, 2005.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 23–53, 2000.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481–492, 2000.
- SPLITZER, J. C. Influences of nutrition on reproduction in beef cattle. In: MORROW, D. A. **Current therapy in Theriogenology**. 2 ed. Philadelphia. W. B. Saunders, p. 231-234, 1986