

Sêmen refrigerado bovino em protocolos de IATF, o que sabemos até o momento?



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pantanal
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

DOCUMENTOS 166

Sêmen refrigerado bovino em protocolos de IATF,
o que sabemos até o momento?

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pantanal
Rua 21 de Setembro, 1880
Bairro Nossa Senhora de Fátima
CEP 79320-900, Corumbá, MS
Fone: (67) 3234-5800
Fax: (67) 3234-5815
www.embrapa.br/fale-conosco/sac
<https://www.embrapa.br/pantanal>

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Pantanal

Presidente
Suzana Maria Salis

Membros
*Ana Helena B Marozzi Fernandes,
Fernando Rodrigues Teixeira Dias,
Juliana Corrêa Borges Silva,
Márcia Furlan Nogueira Tavares de Lima,
Viviane de Oliveira Solano*

Supervisão editorial
Suzana Maria Salis

Revisão de texto
Suzana Maria Salis

Normalização bibliográfica
Viviane de Oliveira Solano

Tratamento das ilustrações
Marilisi Jorge da Cunha

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Marilisi Jorge da Cunha

Foto da capa:
Raquel Brunelli D Avila

1ª edição
Versão digital (2020)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pantanal

Sêmen refrigerado bovino em protocolos de IATF, o que sabemos até o momento?/
Juliana Correa Borges Silva... [et al.]. - Corumbá: Embrapa Pantanal, 2020.

PDF (17 p.) : il. color. - (Documentos / Embrapa Pantanal, ISSN 1981-7223;
166).

1. Bovino. 2. Inseminação Artificial. 3. Sêmen. I. Silva, Juliana Corrêa Borges.
II. Silva, Márcio Ribeiro. III. Silva, Renato Guimarães da. IV. Massoneto, José
Francisco. V. Loro, Pablo Storari. VI. Alves, Ivo Augusto Cavalieri. VII. Nogueira,
Ériklis. VIII. Nicacio, Alessandra Corallo. IX. Oliveira, Luiz Orcirio Fialho de. X.
Abreu, Urbano Gomes Pinto de. XI. Marinho, Daniel Barros. XII. Título. XIII. Série.
XIV. Embrapa Pantanal.

CDD (21. ed.) 636.2

Viviane de Oliveira Solano CRB 1-2210

© Embrapa, 2020

Autores

Juliana Corrêa Borges Silva

Médica-veterinária, doutora em Medicina Veterinária,
pesquisadora da Embrapa Pantanal, Campo Grande, MS

Márcio Ribeiro Silva

Médico-veterinário, doutor em Zootecnia,
diretor da Melhor Animal Consultoria Ltda, Jaboticabal, SP

Renato Guimarães da Silva

Médico-veterinário,
técnico do Geneplus, Campo Grande, MS

José Francisco Massoneto

Médico-veterinário,
técnico da Ema Pantanal Ltda, Corumbá, MS

Pablo Storari Loro

Médico-veterinário,
técnico da Ema Pantanal Ltda, Corumbá, MS

Ivo Augusto Cavalieri Alves

Médico-veterinário,
técnico da Ema Pantanal Ltda, Corumbá, MS

Ériklis Nogueira

Médico-veterinário, doutor em Medicina Veterinária,
pesquisador da Embrapa Pantanal, Campo Grande, MS

Alessandra Corallo Nicacio

Médica-veterinária, doutora em Medicina Veterinária
pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Luiz Orcírio Fialho de Oliveira

Engenheiro-agrônomo e médico-veterinário, doutor em Ciência Animal,
pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

Urbano Gomes Pinto de Abreu

Médico-veterinário, doutor em Zootecnia,
pesquisador da Embrapa Pantanal, Corumbá, MS

Daniel Barros Marinho

Médico-veterinário,
diretor da Ema Pantanal Ltda, Corumbá, MS

Apresentação

A adoção da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) cresce a cada ano no Brasil, bem como o número de pesquisas nessa área, com intuito de melhorar cada vez mais os índices reprodutivos na pecuária.

Por essa razão, a utilização desta biotecnologia é cada vez mais difundida, principalmente em gado de corte e em regiões de difícil manejo, como o Pantanal por exemplo, com taxas médias de prenhez cada vez mais satisfatórias. Mas, existem muitos fatores que influenciam os resultados da IATF e a viabilidade espermática é um deles.

Com o objetivo de garantir essa viabilidade é utilizada a técnica de criopreservação do sêmen. No entanto, há grande perda de células espermáticas durante o processo, assim a importância de pesquisar a utilização do sêmen refrigerado, que apresentou aumento da taxa de prenhez, quando comparado ao congelado.

O presente documento disponibiliza o histórico dos experimentos realizados nessa linha de pesquisa, dentro do projeto denominado Mais Cria, com objetivo de obter mais e melhores animais. Espera-se que essa abordagem alcance diferentes segmentos (produtores, pesquisa/universidade, centros de processamento de sêmen e profissionais de campo), e possa contribuir para os avanços, tanto na área de andrologia, como efetivamente na reprodução e produção animal, não só para a região de atuação da Embrapa Pantanal, como para todo o País.

Jorge Antonio Ferreira de Lara
Chefe-Geral da Embrapa Pantanal

Sumário

Introdução	7
Conceitos técnicos	7
Por que utilizar agora o sêmen refrigerado?	8
Vantagens da IATF	9
Cuidados na IATF	9
Conclusões	16
Considerações finais	16
Agradecimentos	16
Referências	16

Introdução

O processo de criopreservação espermática (congelamento de sêmen) embora possua inúmeras vantagens e aplicações, causa lesões celulares, principalmente em membranas, induzidas pelo frio (curva de refrigeração e congelamento) e pelo processo de descongelamento, diminuindo a viabilidade celular (Holt, 2000; Nagy et al., 2004; Borges et al., 2011). Devido a desvantagem de perda da viabilidade celular do sêmen congelado, o processamento reduzido do sêmen refrigerado apresenta grande aplicabilidade relacionada à utilização de touros geneticamente superiores em programas de IATF, em rebanho de corte.

O uso do sêmen refrigerado bovino cresce a cada dia com resultados satisfatórios, sendo uma nova linha de pesquisa a ser seguida para que mais resultados corroborem avaliando e viabilizando sua utilização em massa, garantindo aumento dos índices de prenhez. A primeira hipótese a ser testada foi verificar, se o menor processamento da célula espermática, seria proporcional ao maior número de células viáveis disponíveis no momento da fecundação e, conseqüentemente, aumentaria a prenhez, comparado ao uso do sêmen refrigerado com o sêmen congelado de um mesmo touro. Assim, na tentativa de diminuir as perdas celulares, o uso do sêmen refrigerado ressurgiu com a possibilidade de aumentar a prenhez nos protocolos de IATF, o que foi comprovado em nosso primeiro estudo, com aumento de 10% ($P < 0,05$) (Borges-Silva et al., 2016; Silva, 2017b). Em seguida, passamos a pesquisar a principal pergunta dos técnicos e produtores: por quanto tempo o sêmen refrigerado fica viável e com bons resultados de prenhez? Em decorrência disso, os experimentos relatados a seguir, foram conduzidos em diferentes estações de monta, em propriedades distintas, com diversas categorias animais avaliadas com 24, 48 e 72 horas de refrigeração do sêmen a 5°C.

Conceitos técnicos

É importante começarmos com a padronização do significado dos termos para podermos comparar melhor os resultados entre os técnicos, pois muitas vezes um técnico diz que usou sêmen refrigerado sendo que, na realidade, foi utilizado sêmen fresco, ou vice-versa.

Sêmen criopreservado ou congelado: processamento do sêmen que após diluição faz-se curva de refrigeração e criopreservação chegando a -196°C.

Sêmen refrigerado: processamento do sêmen que após diluição faz-se uma curva de refrigeração podendo chegar 4-5°C ou 15-18°C.

Sêmen fresco: sêmen coletado, diluído e utilizado em temperatura ambiente, podendo ser essa utilização em até 8 horas após colheita, porém SEM abaixar a temperatura.

Sêmen líquido: nomenclatura mais utilizada em publicações internacionais por países que utilizam o sêmen refrigerado em escala comercial, porém o sêmen faz a curva chegando a temperaturas ambientes mais baixas, em países como Irlanda e Nova Zelândia.

Por que utilizar agora o sêmen refrigerado?

Quando o assunto é sêmen refrigerado, ainda parece que teremos que quebrar alguns paradigmas, pois o mercado está adaptado e consolidado com o uso do sêmen criopreservado. Por que, em época de avaliação genômica, clonagem, produção *in vitro* de embriões, voltamos a falar de sêmen refrigerado? Parece um retrocesso, certo? Errado. Agora podemos utilizar o sêmen refrigerado, única e exclusivamente, por causa da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

É interessante fazer um breve histórico da evolução da IATF para fazermos uma analogia com o uso do sêmen refrigerado. No final da década de 1990, ou seja, estamos falando de apenas 20 anos atrás, os protocolos de IATF, além de caros chegavam, a no máximo, 30% de prenhez (Baruselli; Madureira, 2000), isso quando o resultado era bom. O produtor esperava sempre o vizinho utilizar primeiro para ver o tamanho do “tombo”. No entanto, passados vinte e poucos anos, os produtores já conhecem essa tecnologia, os protocolos estão estabelecidos e todos os fatores que influenciam nos resultados são amplamente conhecidos e ainda estudados, por aumento de demanda. Hoje a IATF tem alcançado índices médios de prenhez cada vez mais satisfatórios (50%), com protocolos mais acessíveis economicamente. E a decisão sobre a sua utilização foi, e é do mercado (do produtor). Mesmo assim, por mais que seja uma biotécnica muito difundida e repleta de vantagens, não é para todos, pois não existirá uma biotecnologia viável e executável em todas as realidades das propriedades rurais.

Nesse ponto cabe a analogia com o uso do sêmen refrigerado, acreditamos que o mercado será soberano na ampliação, ou não, do seu uso de forma comercial e na evolução de mais pesquisas (devido à demanda) para melhorar cada vez mais os índices alcançados, aumentando sua longevidade e facilitando a adoção principalmente em relação à logística. Um ponto extremamente favorável ao uso do sêmen refrigerado, e que difere do início da história da IATF, são os resultados positivos, desde o início das pesquisas.

A IATF resolveu, parcialmente, as dificuldades encontradas com a técnica tradicional, promovendo o avanço do uso de IA no Brasil. A utilização da IATF tomou espaço considerável na pecuária de corte, aumentando significativamente, a cada ano. Em seu histórico de 2002 a 2018 observamos que houve aumento de 1% para 86,3% em 16 anos (Baruselli, 2019), podendo expandir ainda mais. No entanto, verificamos que o rebanho bovino brasileiro utiliza apenas 13,1% de inseminação artificial (Asbia, 2020), sendo o restante (86,9%), monta natural.

O aspecto fundamental da IATF e sua realização com sêmen refrigerado é o momento exato da inseminação, podendo assim controlar e ajustar o tempo de coleta do sêmen em função dos lotes agendados para a inseminação (Bucher et al., 2009; Crespillo et al., 2014; Tarragó, 2017; Murphy et al., 2018; Silva et al., 2020). Assim, é importante destacar a conscientização tanto dos produtores quanto dos responsáveis técnicos sobre a escolha do reprodutor a ser utilizado, pois devem ser escolhidos touros reprodutores geneticamente avaliados. Desse modo, aumentar a taxa de natalidade, juntamente com a qualidade genética da progênie, é o ponto importante na recomendação para adoção dessa prática. O investimento na compra de touros melhoradores para ampla utilização no rebanho será uma alternativa interessante para difundir a genética e ter o rápido retorno do capital investido.

Outra grande vantagem para a utilização do sêmen refrigerado é justamente por causa da avaliação genômica, onde podemos utilizar na IATF, touros jovens e com acurácia alta, sendo que seria grande a probabilidade do sêmen não passar no processo de criopreservação, em função da idade dos touros jovens e momento fisiológico. Dessa maneira, o processo de refrigeração será a oportunidade de uso, o mais cedo possível, desse material genético. Além disso, touros desejados geneticamente, e que não toleram o processo de congelamento, poderão ter a perspectiva de uso pelo processo de refrigeração, necessitando apenas que os padrões seminais estejam satisfatórios apresentando motilidade espermática progressiva (mínima de 70%) e defeitos totais (máximo de 30%), conforme prevê o Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Outro ponto importante a ser considerado, dentro de uma propriedade, é a sanidade dos reprodutores selecionados como doadores de sêmen, visto que, doenças infectocontagiosas, como, brucelose, tuberculose, campilobacteriose, tricomonose, leptospirose, entre outras, poderão ser transmitidas pelo processo de inseminação artificial. Por esta razão, todos os touros da propriedade que serão utilizados reprodutivamente, seja por inseminação artificial ou monta natural, deverão passar por exames que assegurem o menor risco possível de disseminação de doenças. Assim, o risco sanitário de touros selecionados na propriedade como doadores de sêmen é o mesmo dos reprodutores utilizados via monta natural. O produtor deve consultar o médico-veterinário que o assiste a fim de respaldar o manejo e procedimentos sanitários cabíveis.

Cabe ressaltar, que a comercialização de sêmen (congelado ou refrigerado) só pode ser realizada pelos Centros de Coletas e Processamento de Sêmen, por obedecerem às normas rígidas de controle sanitário, estabelecidos pelos órgãos competentes. Assim, mesmo os touros estando comprovadamente sadios, se as doses de sêmen refrigerado, ou congelado, forem processadas nas fazendas, estas deverão ser utilizadas exclusivamente na mesma propriedade.

Vantagens da IATF

A inseminação artificial (IA) em bovinos é a biotécnica aplicada à reprodução com maior difusão e impacto no melhoramento genético de animais de produção zootécnica, por meio da utilização de sêmen de reprodutores provados para a produção de leite e carne. E quando falamos da IATF outras vantagens despontam como: obtenção de maior número de descendentes de um reprodutor; padronização do rebanho; não observação de cio; indução da ciclicidade em vacas em anestro; redução do intervalo de partos; homogeneidade dos lotes; sincronização dos nascimentos; racionalização da mão de obra e inseminação com dia e hora marcados.

Cuidados na IATF

Existem fatores que influenciam os resultados da IATF e que devem ser observados, tais como: necessidade de estrutura da fazenda (mangueiro, cerca, divisão de lotes), categoria animal (nulíparas, primíparas e múltiparas), escore de condição corporal, tamanho do lote, protocolo hormonal, inseminador e, particularmente, a qualidade do sêmen (Silva et al., 2017b).

É comprovada a variabilidade individual entre animais (efeito touro) e que, quanto melhor é a qualidade do sêmen, melhor é a taxa de prenhez, principalmente na IATF. Isso reforça a hipótese de que a taxa de prenhez pode não estar aumentando em função da não disponibilidade de sêmen de qualidade no momento exato da ovulação, visto que, além da sincronia de ovulações variarem em relação às fêmeas, varia também em relação aos fármacos utilizados no protocolo para indução de ovulação.

Mostraremos a seguir um resumo dos principais resultados obtidos com nossos experimentos com sêmen refrigerado nos protocolos de IATF, seguindo sempre o processamento de refrigeração de Silva et al. (2017a).

Experimento 1: Comparação do sêmen criopreservado versus sêmen refrigerado por 24 horas a 5°C em protocolos de IATF (Silva et al., 2017b)

A escolha dos touros é fundamental, e ponto a ser frisado, com a recomendação de que sempre sejam utilizados animais avaliados geneticamente em programa de melhoramento genético, pois além de aumentar a taxa de prenhez, o objetivo é aumentar a qualidade dos animais nascidos, como dito anteriormente.

Com o objetivo de aumentar a taxa de prenhez utilizou-se sêmen refrigerado com diluidor sem glicerol, comparado ao sêmen criopreservado com diluidor com glicerol, após o protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Em um dia aleatório do ciclo estral (Dia 0 do protocolo) todas as vacas receberam 2 mg de benzoato do estradiol (RIC-BE®, Syntex, Argentina) e um dispositivo intravaginal de progesterona (PRIMER®, Tecnopec, Brasil). No Dia 8, o dispositivo de progesterona foi removido e administrou-se 150 µg de d-Cloprostenol (Prolise®, i.m., ARSA, Argentina), 300 UI de eCG (Folligon 5000®, i.m., Intervet, Holanda) e 1 mg de benzoato do estradiol. No Dia 10 foi procedida a IATF, com intervalo de 44 a 48 horas após a retirada do dispositivo. O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia (modelo DP 2200 VET®, Mindray, China) 30 a 45 dias após a IATF. Foram utilizados três touros geneticamente superiores, doadores de sêmen, cujos ejaculados foram criopreservados ou refrigerados a 5°C, por no máximo 24 horas, com mesma concentração espermática em palheta fina (25×10^6 espermatozoides). Foram inseminadas 838 vacas múltiparas, sendo 430 vacas com o sêmen refrigerado. Os testes complementares: hiposmótico (HIPO) e teste de termo resistência (TTR) foram realizados para todas as partidas e foram melhores para o sêmen refrigerado ($P < 0,05$). O uso do sêmen refrigerado aumentou 10% a taxa de prenhez ($P < 0,01$). Concluímos que o uso do sêmen refrigerado aumenta a taxa de prenhez na IATF e faz-se uma alternativa relevante.

A partir deste trabalho, os experimentos foram especificamente realizados com o sêmen refrigerado, pois validamos a hipótese inicial, em relação ao sêmen criopreservado com grande número de animais. Assim, o sêmen comercial (congelado) adquirido de diferentes Centros de Coleta de Processamento de Sêmen – CCPs, utilizados nas rotinas das fazendas onde os estudos foram conduzidos, serviram de comparação para as taxas de prenhez com o sêmen refrigerado e congelado (controle negativo).

Os poucos estudos com sêmen refrigerado bovino variam em relação à metodologia, necessitando de mais experimentos controlados para comparações e validações. O que todos experimentos têm em comum é o uso da IATF e o sêmen dentro dos padrões do Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), ou seja, máximo de 30% de defeitos totais e mínimo de 70% de motilidade espermática progressiva.

Exemplo de fatores que precisamos avaliar ao comparar a taxa de prenhez do sêmen congelado e refrigerado são: a concentração espermática utilizada; o tipo de palheta, a composição do diluidor, o tempo e a temperatura utilizados, o processo de refrigeração e de manuseio das palhetas (se aquece ou não antes da IATF e como é o manuseio no momento da retirada da caixa térmica), quantos manejos do protocolo hormonal, quantidade de touros por experimento e categoria das fêmeas, efeito touro mesmo com sêmen refrigerado, etc. Ou seja, muitos são os fatores que devem ser levados em conta quando comparamos os poucos trabalhos na área e por isso também a necessidade de mais estudos similares.

Embora ocorra essa diferença de metodologia, os trabalhos (Crespilho et al., 2012; Papa et al., 2015; Borges-Silva et al., 2016; Resende et al., 2018) verificaram aumento significativo de prenhez, utilizando sêmen refrigerado com 24 horas a 5°C, comparado ao sêmen criopreservado, conforme (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação da taxa de prenhez (%) com uso de sêmen refrigerado por 24 horas a 5°C e sêmen congelado realizado por diferentes estudos, com a indicação dos números de animais avaliados (n).

Referência	Taxa de prenhez (%)*	
	Sêmen refrigerado	Sêmen congelado
Crespilho et al. (2012); n=349	61,5 ^a	45,7 ^b
Papa et al. (2015); n=494	51,0 ^a	41,0 ^b
Borges-Silva et al. (2016); n=836	59,9 ^a	49,4 ^b
Resende et al. (2018); n=152	64,5 ^a	44,7 ^b

*Letras distintas (a e b) demonstram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as taxas de prenhez usando sêmen refrigerado e sêmen congelado.

Experimento 2: Sêmen bovino refrigerado por 24 horas a 5°C utilizado na IATF contendo ou não glicerol no diluidor (Borges et al., 2016)

A composição do diluidor merece atenção, a começar pelo glicerol, agente crioprotetor, que até o presente momento, permanece sem o conhecimento de sua atuação na célula espermática e, portanto, poderia ter efeito tóxico durante o período de refrigeração. Assim, o estudo avaliou o uso do sêmen refrigerado contendo ou não glicerol no diluidor TRIS-gema utilizado nos protocolos de IATF de bovinos de corte.

Foram coletados ejaculados de três touros, no dia 9 do protocolo de IATF, e divididos em dois tratamentos: 1) sêmen refrigerado com glicerol (6%) e 2) sêmen refrigerado sem glicerol. Palhetas finas com dose inseminante com concentração de 25×10^6 espermatozoides foram submetidas ao processo de refrigeração a 5°C por 24 h, até o momento da IATF. Vacas Nelore (n=346) submetidas a IATF receberam o mesmo protocolo de três manejos que o experimento anterior (Dia 0, Dia 8 e Dia 10). No Dia 10, 44 horas aproximadamente após a retirada do dispositivo, todas as vacas foram inseminadas, aleatoriamente, com o sêmen refrigerado com e sem glicerol. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF por ultrassonografia (modelo DP-2200 Vet®, Mindray, China). A análise estatística foi conduzida pelo programa SAS, versão 9.2. Não houve diferença de prenhez por IA (P/IA) comparando o diluidor contendo ou não o glicerol (Tabela 2). Não houve diferença na P/IA entre touros ($P=0,44$) e entre tratamentos (com e sem glicerol) no sêmen refrigerado quando avaliado a motilidade espermática (81,7% vs. 79,0%), teste de termo resistência lento (68,1% vs. 66,7%) e teste hiposmótico (55,3% vs. 53,7%), respectivamente ($P > 0,05$). Papa et al, 2015, também não observaram diferença entre sêmen refrigerado com e sem glicerol (Tabela 2).

Tabela 2. Estudos que demonstram taxas de prenhez semelhantes com uso de diluidores contendo ou não glicerol no sêmen refrigerado por 24 horas a 5°C (P>0,05).

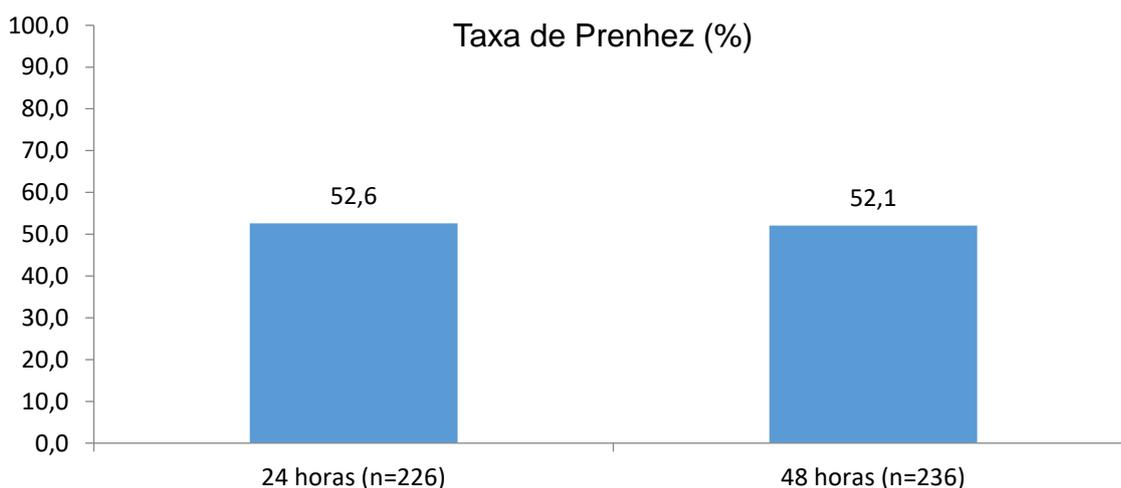
Referência	Taxa de prenhez com uso do sêmen refrigerado (%)	
	Diluidor com glicerol	Diluidor sem glicerol
Papa et al. (2015); n=546	51,0	44,0
Borges et al. (2016); n=346	50,1	53,3

Conclui-se que o diluidor com glicerol pode ser utilizado para sêmen refrigerado sem interferir na taxa de prenhez. Dessa forma, pode-se utilizar diluidor comercial com 6% de glicerol para refrigeração de sêmen a ser utilizado em IATF.

Experimento 3: Sêmen bovino refrigerado por 24 e 48 horas a 5°C utilizado na IATF

Em uma fazenda na região do Pantanal do Abobral, MS, foram utilizados quatro touros superiores, geneticamente avaliados, no lote 1, com 257 vacas solteiras, sendo 126 vacas inseminadas com sêmen refrigerado por 24 horas, e 131 com sêmen refrigerado por 48 horas. No lote 2, foram utilizados três touros com 205 novilhas, sendo 100 inseminadas com sêmen refrigerado por 24 horas, e o restante com 48 horas de refrigeração. Foram utilizadas palhetas finas com dose inseminante de 30×10^6 de espermatozoides viáveis em dois tratamentos a 5°C, com diluidor TRIS-gema contendo glicerol. O protocolo de IATF foi o mesmo de três manejos mencionado nos experimentos anteriores. No Dia 10, 44 horas aproximadamente após a retirada do dispositivo, todas as fêmeas foram inseminadas, aleatoriamente, com o sêmen refrigerado por 24 ou 48 horas.

O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF por ultrassonografia (modelo DP-2200 Vet®, Mindray, China). Não houve diferença de prenhez por IA (P/IA) comparando o sêmen refrigerado com 24 e 48 horas, respectivamente, para vacas solteiras (49,2% [62/126] vs. 54,2% [71/131]; P>0,05), para novilhas (57% [57/100] vs. 49,5% [52/105]; P>0,05) e para ambos os lotes (52,6% [119/226] vs. 52,1% [123/236]; P>0,05) na Figura 1.

**Figura 1.** Taxa de prenhez (%) semelhante com o uso do sêmen refrigerado por 24 e 48 horas a 5°C (P>0,05).

Fonte: Silva et al. (2020).

Verificou-se efeito de touro (P < 0,05) variando de 36% a 71% de prenhez com 24 horas e 27,7% a 65% de prenhez com 48 horas, dentre os sete touros utilizados na inseminação das 462 fêmeas. Isso demonstra que o efeito touro é importante do mesmo modo como ocorre no sêmen congelado e que conhecer esses indivíduos previamente é importante para a obtenção de bons resultados.

Conclui-se que o sêmen refrigerado por 48 horas a 5°C pode ser utilizado com a obtenção de mesmos índices satisfatórios dos refrigerados por 24 horas, melhorando assim sua distribuição logística e aumentando seu uso em mais animais protocolados.

Experimento 4: Sêmen bovino refrigerado por 24 horas a 5°C utilizado na IATF com diferentes tipos de palhetas

No Brasil não se tinha conhecimento de que havia no mercado exterior uma palheta própria para o uso do sêmen refrigerado. Tal palheta é confeccionada com um material que não permite a troca de oxigênio com o meio externo, podendo em teoria, melhorar a qualidade espermática, por evitar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) o que compromete a membrana espermática e a viabilidade celular. Assim, no Pantanal do Mato Grosso do Sul, região do Abobral, foram utilizados sêmen refrigerado por 24 horas a 5°C, testando dois tipos de palhetas (comum versus específica). Foi coletado sêmen de dois touros superiores, geneticamente avaliados, distribuídos em dois tratamentos, ambos com palhetas finas e dose inseminante de 30×10^6 espermatozoides. Tratamentos: 1) 98 novilhas inseminadas usando palheta comum (PC) e 2) 98 novilhas inseminadas usando palheta específica (PE). O protocolo de IATF foi o mesmo de três manejos mencionado nos experimentos anteriores. No Dia 10, 44 horas aproximadamente após a retirada do dispositivo, todas as fêmeas foram inseminadas, aleatoriamente, alternando o tipo de palheta. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF por ultrassonografia (modelo DP-2200 Vet®, Mindray, China). Nesse mesmo lote, para comparação com o sêmen criopreservado, foram utilizados mais dois touros com sêmen congelado comercial inseminando 97 novilhas. Os dados foram analisados pelo qui-quadrado programa SAS, versão 9.2. Não houve diferença de prenhez por IA (P/IA) comparando o tipo de palheta comum (45,91% [45/98]) versus específica (52,04% [51/98]), respectivamente. Também não houve diferença de prenhez entre sêmen refrigerado (ambos os tipos de palhetas – 48,9% [96/196]) versus sêmen criopreservado (40,2% [39/97]), respectivamente ($P > 0,05$). Como a diferença numérica encontrada neste experimento ($\approx 9\%$) continua parecida ao que verificamos em nosso primeiro experimento (10%), acreditamos que, talvez com maior número de animais fosse encontrada diferença significativa, tanto em relação à comparação do sêmen refrigerado vs. congelado, quanto em relação ao tipo de palheta (comum vs. específica). Cabe ressaltar que não comparamos o mesmo touro nos processamentos de refrigerado vs. congelado. Em relação ao uso dos diferentes tipos de palhetas, que foram avaliados para mesmos touros, ejaculados e concentração espermática, os resultados demonstram que o uso de palheta comum é satisfatório e que a tomada de decisão para a utilização da palheta específica para sêmen refrigerado será uma questão comercial em função do seu valor de mercado. Assim, conclui-se que o desempenho da palheta convencional é semelhante ao da palheta específica para sêmen refrigerado.

Experimento 5: Avaliação do sêmen refrigerado bovino durante quinze dias, comparando três diluidores comerciais (Cavalcanti et al., 2019)

O estudo foi conduzido com objetivo de comparar três diluidores comerciais, sendo dois a base de gema de ovo e um a base de lipossomos sintetizados, durante 15 dias, analisando a viabilidade do sêmen refrigerado, com base na quantidade de espermatozoides vivos, que apresentavam motilidade e vigor espermáticos, avaliados *in vitro*, pela análise computadorizada (CASA) e pelo teste de termorresistência lento (TTR).

Foram coletados ejaculados de seis touros jovens da raça Nelore (*Bos indicus*), com idade entre 4 e 5 anos, residentes do Centro Nacional em Pesquisa de Gado de Corte, Campo Grande, MS. Os diluidores comerciais escolhidos foram: Botubov® (Botupharma Biotecnologia Animal, Botucatu, SP), Triladyl® (Minitube, Berlim, Alemanha) e Optixcell® (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, França). Cada ejaculado foi dividido em partes iguais nos três diluidores. Todos os tratamentos foram depositados em tubos tipo Falcon de 15 mL, os quais foram identificados de acordo com o touro e o diluidor utilizado, totalizando 18 amostras. As amostras foram armazenadas em duas caixas térmicas de transporte do modelo Botutainer® (Botupharma Biotecnologia Animal, Botucatu, SP), sendo que as caixas eram abertas apenas para a realização das análises e os gelos eram trocados a cada 24 horas, para evitar a oscilação de temperatura. Para comparar as variáveis da cinética espermática e do teste de termorresistência durante o tempo (medidas repetidas) empregou-se a análise de variância, pelo Proc Mixed, com nível de significância de 5%. A análise estatística foi conduzida pelo programa SAS, versão 9.2.

A cada 24 horas, durante o período de 15 dias, totalizando 360 horas de avaliação espermática foram realizados os testes de termorresistência lento (TTR), para análise da viabilidade espermática, e a avaliação de motilidade espermática pelo método computadorizado CASA (Computer Aided Semen Analysis, modelo Sperm Class Analyzer – SCA), onde foram verificadas motilidade total, motilidade progressiva, velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos do flagelo (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN); valores obtidos a partir da análise de cinco campos aleatórios da amostra. Em relação ao diluidor, foi demonstrado que não há diferença ($P>0,05$) na atuação dos mesmos (Figura 2), nas primeiras 96 horas de estocagem (4 dias).

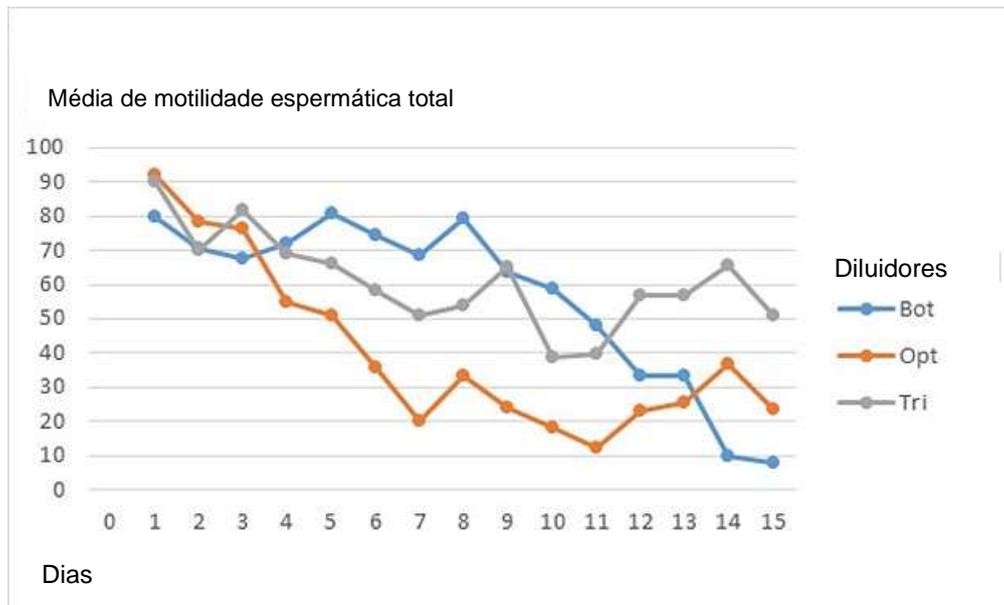


Figura 2. Média da motilidade espermática progressiva retilínea de seis touros Nelore avaliada pelo CASA durante 15 dias em diferentes diluidores comerciais, onde Bot = BotuBOV, Opt = Optixcell e Tri = Triladyl.
Fonte: Cavalcanti et al. (2019).

Os resultados de motilidade e vigor, em função do tempo, foram satisfatórios mostrando que o sêmen refrigerado tem potencial para ficar armazenado por mais tempo do que já descrito em literatura, sem demonstrar muitos prejuízos na viabilidade espermática. No entanto, experimentos que avaliem a taxa de prenhez são necessários.

Experimento 6: Sêmen bovino refrigerado por 72 horas a 5°C utilizado na IATF

Após a longevidade espermática avaliada *in vitro*, por pelo menos 96 horas em diferentes diluidores (Cavalcanti et al., 2019), criou-se a expectativa de bons resultados de prenhez após 72 horas de refrigeração a 5°C. Dois touros superiores, geneticamente avaliados, foram utilizados em 74 vacas paridas, sendo outros três touros utilizados no mesmo lote, em 170 fêmeas paridas, porém com sêmen congelado comercialmente. Para o sêmen refrigerado por 72 horas a 5°C, foram utilizadas palhetas finas com dose inseminante de 30×10^6 espermatozoides e diluidor TRIS-gema contendo glicerol. O protocolo de IATF foi o mesmo de três manejos mencionado nos experimentos anteriores. No Dia 10, 44 horas aproximadamente após a retirada do dispositivo, as fêmeas foram inseminadas, aleatoriamente, com o sêmen refrigerado por 72 horas a 5°C ou com o sêmen congelado. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF por ultrassonografia (modelo DP-2200 Vet®, Mindray, China). Os dados foram analisados pelo qui-quadrado do programa SAS, versão 9.2. Houve diferença de prenhez entre os dois touros utilizados com sêmen refrigerado por 72 horas, sendo o touro 1 melhor que o touro 2 (Tabela 3). Também houve diferença na prenhez com o uso do sêmen congelado sendo melhor que o sêmen refrigerado por 72 horas a 5°C (Tabela 3). Não houve diferença entre o touro 1 do sêmen refrigerado e os três utilizados com sêmen criopreservado (Tabela 3).

Tabela 3. Diferença de prenhez em relação ao processamento do sêmen (refrigerado por 72 horas a 5°C versus congelado) e entre touros.

Touros	Taxa de prenhez*	
	Sêmen refrigerado por 72 horas (%)	Sêmen congelado comercial (%)
1	38,5 ^a	
2	12,5 ^b	
3		43,5 ^a
4		43,4 ^a
5		29,1 ^a
Total	21,6^A	39,4^B

*Letras minúsculas diferem entre touros e letras maiúsculas diferem entre processamento do sêmen (P<0,05).

Fonte: Silva et al. (2020).

Conclui-se que o sêmen refrigerado por 72 horas a 5°C não melhorou a prenhez comparado com o sêmen criopreservado.

Experimento 7: Sêmen bovino refrigerado por 48 horas a 5°C utilizado na IATF comparando dois diluidores comerciais

Para verificar a viabilidade espermática foram utilizados três touros superiores, geneticamente avaliados, que tiveram o sêmen refrigerado por 48 horas a 5°C, distribuídos em dois diluidores comerciais. Em uma fazenda na região do Pantanal do Abobral, MS, foram utilizadas 97 vacas paridas. As palhetas finas com concentração de 30×10^6 espermatozoides foram refrigeradas em dois tratamentos por 48 a 5°C, com dois diluidores comerciais: 1) sêmen refrigerado por 48 horas em diluidor a base de Tris-gema (BotuBOV®) e 2) sêmen refrigerado por 48 horas em diluidor a base de leite (INRA 96®), até o momento da IATF. O protocolo de IATF foi o mesmo de três manejos mencionado nos experimentos anteriores. No Dia 10, 44 horas aproximadamente após a retirada do dispositivo, todas as fêmeas foram inseminadas, aleatoriamente, com o sêmen refrigerado por 48 horas nos diferentes diluidores. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF por ultrassonografia (modelo DP-2200 Vet®, Mindray, China). Os dados foram analisados pelo qui-quadrado programa SAS, versão 9.2. Não houve diferença de prenhez por IA (P/IA) comparando o sêmen refrigerado por 48 horas em ambos diluidores, a base de TRIS-gema (64,6% [31/48]) e leite (47,0% [23/49]; P>0,05), respectivamente. A média final de prenhez foi de 55,7% (54/97) e não houve diferença entre touros (P > 0,05). Conclui-se que o sêmen refrigerado por 48 horas a 5°C tiveram desempenho semelhante em ambos diluidores.

Experimento 8: Sêmen bovino refrigerado por 24 e 48 horas a 5°C utilizado na IATF comparando dois diluidores comerciais (Silva et al., 2020)

O estudo foi conduzido para avaliar o uso do sêmen refrigerado a 5°C, em dois tempos de refrigeração, 24 e 48 horas, utilizando dois diluidores comerciais (BotuBOV® e INRA 96®), totalizando 4 tratamentos (24 B, 24I, 48B, 48I). Foram coletados ejaculados de cinco touros que foram refrigerados e utilizados em duas fazendas (1 e 2). Palhetas finas (30×10^6 espermatozoides) foram refrigeradas em quatro caixas Botutainer®, sendo duas para cada fazenda (24 e 48 horas), até o momento da IATF. Todo o sêmen estava nos padrões do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Vacas Nelore (n= 946) foram submetidas aos mesmos protocolos de três manejos na IATF. No Dia 10, 44 horas aproximadamente após a retirada do dispositivo, todas as vacas foram inseminadas, aleatoriamente, com o sêmen refrigerado nos diferentes tratamentos. A análise estatística foi realizada pelo programa programa SAS, versão 9.2, utilizando a análise de variância pelo teste de Tukey e qui-quadrado (P <0,05).

Não houve diferença de prenhez entre 24 e 48 horas de refrigeração (Figura 3) e também não houve diferença entre diluidores 24B, 24I, 48B e 48I (Figura 4). Embora um touro tenha diferido ($P < 0,04$) para o diluidor B (58,6%) em relação ao I (34,1%), não houve diferença entre touros ($P > 0,05$), mas houve diferença entre as fazendas 1 (54,5% [239/438]) e 2 (45,0% [229/508]) ($P = 0,03$).

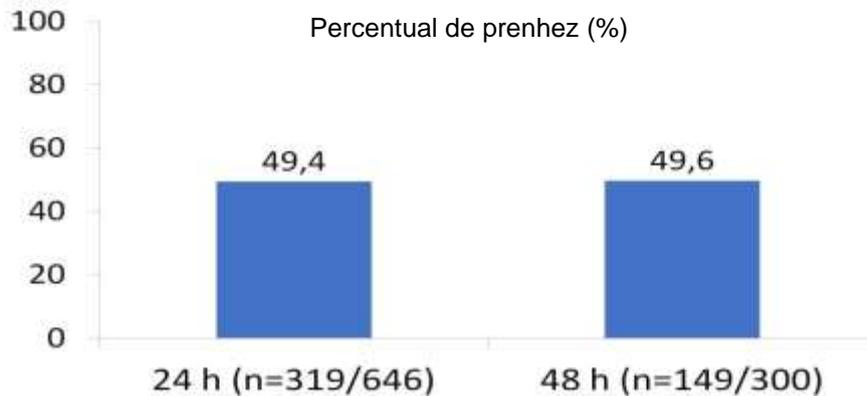


Figura 3. Percentual de prenhez de vacas Nelore múltiparas (35 a 45 dias pós parto) submetidas ao protocolo de IATF de acordo com o tempo de refrigeração de sêmen (24 e 48 horas) ($P > 0,05$).

Fonte: Silva et al. (2020).

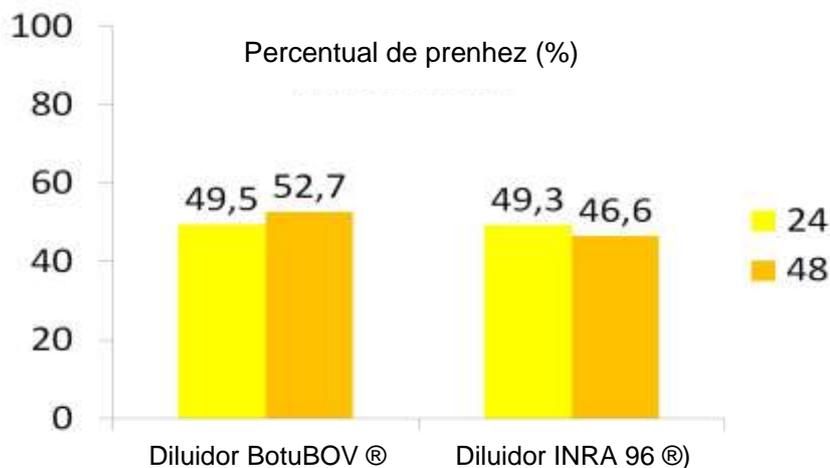


Figura 4. Percentual de prenhez por diluidor por tempo de refrigeração (24 e 48 horas; $P > 0,05$).

Fonte: Silva et al. (2020).

Conclui-se que a utilização do sêmen refrigerado por 48 horas a 5°C, nos protocolos de IATF é igual ao uso com 24 horas, com qualquer um dos diluidores comerciais testados, aumentando a viabilidade de sua utilização.

Conclusões

- Sêmen refrigerado por 24 horas a 5°C comparado ao sêmen congelado de mesmo touro, aumenta a taxa de prenhez.
- Sêmen refrigerado por 48 horas a 5°C possui taxa de prenhez semelhante ao de 24 horas.
- Sêmen refrigerado por 24 e 48 horas a 5°C possuem a mesma taxa de prenhez em diferentes diluidores comerciais.
- Sêmen refrigerado em palheta comum por 24 horas a 5°C apresenta o mesmo desempenho de prenhez que o sêmen refrigerado em palheta específica.
- Sêmen refrigerado por 72 horas a 5°C diminuiu a prenhez comparado ao sêmen criopreservado.
- Resultados in vitro (em laboratório) demonstraram que até 96 horas o sêmen refrigerado a 5°C permanece com satisfatórios índices de motilidade e vigor espermáticos em diferentes diluidores comerciais, no entanto, faltam trabalhos in vivo (a campo).

Considerações finais

Por ser uma linha de pesquisa esquecida desde a década de 1940, após a descoberta do glicerol, muitos são os questionamentos em relação aos custos-benefícios, qualidade de mão de obra envolvida, padronização do processamento, tempo de viabilidade espermática, diluidor de escolha, logística para sua distribuição, equipamentos necessários e, principalmente, taxas de prenhez.

Poucos são os trabalhos disponíveis em literatura com o uso em IATF, mas o número vem crescendo, pois a maioria tem demonstrado resultados promissores com a adoção desta biotécnica. Assim, o desenvolvimento de experimentos pode contribuir para a melhoria dos índices do sêmen refrigerado, aumentando sua longevidade e facilitando a adoção em relação à logística, por exemplo.

Agradecimentos

Às fazendas Ema Pantanal e BR PEC, ambas em Corumbá, MS, pela parceria e apoio na realização dos experimentos.

Referências

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Index Asbia** - 1º semestre 2020 - Mídia: o retrato do avanço da IA pelo Brasil. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2020/08/Index-ASBIA-1%C2%BA-Semestre-2020-M%C3%8DDIA-2.pdf>. Acesso em 09 out. 2020. 44 p.

BARUSELLI, P. S. Avaliação do Mercado de IATF no Brasil. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP**. Edição 1, 19 fev. 2019. Disponível em: https://drive.google.com/file/d/1FCVG3cmIA9_xdaQX32e1XGhnS2irDxDq/view. Acesso em 13 nov. 2020.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H. Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES. **Anais...** São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.

- BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; OLIVEIRA, L. O. F. de; ABREU, U. G. P. de; MARINHO, D. B.; SARTORI, R. Sêmen bovino refrigerado utilizado na IATF contendo ou não glicerol no diluidor. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY, 30., 2016, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Foz do Iguaçu: SBTE, 2016. p. 209. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1061148/1/SP18396.pdf>. Acesso em: 10 out.2020.
- BORGES-SILVA, J. C.; SILVA, M. R.; MARINHO, D. B.; NOGUEIRA, E.; SAMPAIO, D. C.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; MOURA, G. B.; SARTORI FILHO, R. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, p. 1004-1008, 2016.
- BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J. B.; DEJARNETTE, J. M.; WHITTIER, W. D.; KÄHN, W.; XU, Z. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. **Theriogenology**, v. 71, p.1180-1185, 2009.
- CAVALCANTI, P. R.; MOTTI, A. C. L.; REIS, W. V. A. dos; SILVA, L. G. da; NICACIO, A. C.; DIAS, F. R. T.; NOGUEIRA, E.; SILVA, J. C. B. **Avaliação do sêmen refrigerado bovino durante quinze dias, comparando três diluidores comerciais**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2019. 8 p. (Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico, 112). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1116595/1/Avaliacaoosemenrefrigeradobovino2019.pdf>. Acesso em: 10 out. 2020.
- CBRA. COLÉGIO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- CRESPILHO, A. M.; NICHI, M.; GUASTI, P. N.; FREITAS-DELL`AQUA, C. P.; SÁ FILHO, M. F.; MAZIEIRO, 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**, v.146, p.126-133, 2014.
- CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; SANTOS, M. P.; SÁ FILHO, M. F. Use of cooled bull semen as strategy to increase the pregnancy rate in fixed time artificial insemination programs-case report. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 7, n. 4, p.175-179, 2012.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, v.1-3, p. 03-22, 2000.
- MURPHY, E. M.; O`MEARA, C.; EIVERS, B.; LONERGAN, P.; FAIR, S. Optimizing storage temperature of liquid bovine semen dilutes in INRA96. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 5549-5558, 2018.
- NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNES, H. Changes in plasma membrane and acrossome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n. 3-4, p. 225-235, 2004.
- PAPA, M. P.; MAZIEIRO, R. M.; GUASTI, P. N.; JUNQUEIRA, C. R.; FREITAS-DELL`AQUA, C. P.; PAPA, F. O.; VIANA, F. P.; ALVARENGA, M. A.; CRESPILHO, A. M.; DELL`AQUA JUNIOR, J. A. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. **Theriogenology**, v. 83, 107-113, 8, 2015. RESENDE, O. A.; ALVES, P. A. P. M.; FAJARDO, R. S. L.; ALMEIDA, J.; SILVA, O. R.; MELLO, M. R. B. Eficiência do sêmen refrigerado na IATF de vacas Girolando. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY, 32., Florianópolis. **Proceedings...** Florianópolis: SBTE, p. 209, 2018.
- SAS. Statistical Analysis System. **User's guide**. 2nd ed. Version 9.2. Cary. North Caroline: SAS Institute Inc., 2009.
- SILVA, J. C. B.; NOGUEIRA, E.; SILVA, M. R. **Processamento de sêmen bovino refrigerado**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2017a. 6 p. (Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico, 108). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/173024/1/COTJuliana-formatado-final-07fev2018.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2020.
- SILVA, J. C. B.; SILVA, M. R.; MASSONETO, J. F. M.; LORO, P. S.; ALVES, I. A. C.; NOGUEIRA, E.; OLIVEIRA, L. O. F. de; ABREU, U. G. P. de; MARINHO, D. B. Bovine chilled semen by 24h or 48h in two different commercial extenders for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Animal Reproduction**, v.17, n. 3, 2020. Physiology of reproduction in male and semen technology. Abstracts 34th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 13 a 15 de agosto de 2020. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1126486/1/Bovine-chilled-semen-2020.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- SILVA, J. C. B.; SILVA, M. R.; RESENDE, O. de A.; SAMPAIO, D. C.; NOGUEIRA, E.; ABREU, U. G. P. de; OLIVEIRA, L. O. F. de; RODRIGUES, W. B.; SARTORI FILHO, R. **Sêmen bovino refrigerado e aumento de prenhez de vacas de corte submetidas à IATF**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2017b. 9 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 114). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/169514/1/CT-114.pdf>. Acesso em: 10 out. 2020.
- TARRAGÓ, O. F. B. **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.



Pantanal

