

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**“ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES
METODOLOGIAS DE PRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO
PARA A UTILIZAÇÃO EM PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM TEMPO-FIXO (IATF)”**

ANDRÉ MACIEL CRESPILO

Botucatu-SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**“ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES METODOLOGIAS DE
PRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO PARA A UTILIZAÇÃO EM
PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO-FIXO
(IATF)”**

ANDRÉ MACIEL CRESPILHO

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária (Área de Concentração: Reprodução Animal) para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu - SP

Agosto de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Crespilho, André Maciel.

Avaliação de diferentes metodologias de preservação do sêmen bovino para a utilização em programas de inseminação artificial em tempo-fixo (IATF) / André Maciel Crespilho. – Botucatu, 2010

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

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504002

1. Bovino – Inseminação artificial. 2. Sêmen. 3. Criopreservação.

Palavras-chave: Criopreservação; Gema de ovo; Inseminação artificial em tempo-fixo; Lecitina de soja; Refrigeração; Sêmen bovino.

NOME DO AUTOR: André Maciel Crespilho

TÍTULO: “Estudo comparativo de diferentes metodologias de preservação do sêmen bovino para a utilização em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF)”

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa (Presidente e Orientador)
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof^a. Dr^a. Eunice Oba (Membro)
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária,
FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof. Dr. José Antônio Dell’Aqua Junior (Membro)
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof. Dr. Alicio Martins Junior (Membro)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal
CMVA, FOA – UNESP - Araçatuba - SP

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda (Membro)
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – Pirassununga - SP

DATA DA DEFESA: 26 de agosto de 2010

DEDICATÓRIA

Essa tese é dedicada aos meus pais José Célio Crespilho e Silvia Helena Maciel Crespilho, a minha noiva Fernanda Carpi dos Santos e a todos os amigos que direta ou indiretamente me incentivaram e colaboraram na execução de todos os trabalhos e projetos de minha vida!

Qualquer um pode chegar a imortalidade.....

Basta fazer apenas uma coisa notável....

KEEP WALKING

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Titular Frederico Ozanam Papa pelos ensinamentos, exemplo de ética, postura, profissionalismo e amizade. Muito obrigado pela confiança!!!
- A FAPESP pela bolsa de estudos que viabilizou a execução do projeto de pesquisa.
- Ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP Campus de Botucatu/SP, em nome de todos os seus professores e funcionários.
- As fazendas Sete Voltas (Água Clara - MS), Bela Vista (Rio Verde de Mato Grosso - MS), Cristo Redentor (Miranda - MS) Estrela do Guaporé (Comodoro - MT) e fazenda e Haras Braido (Cerqueira César - SP), em nome de seus proprietários e funcionários, pelo apoio a pesquisa fornecendo os animais para a prática experimental.
- Aos Médicos Veterinários Manoel de Sá, Marcos de Paula Santos, Luciano Penteado e Fabíola Soares Zahn pela inestimável contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.
- Ao pós-graduando Marcílio Nichi do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da FMVZ-USP, São Paulo - SP, pelo auxílio na execução dos ensaios de peroxidação lipídica.
- Aos amigos do curso de pós-graduação e companheiros do Centro de Reprodução Animal (CERAN) da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu - SP, pela convivência, amizade e troca de experiências.
- A Cristiane Rubio, Camila Freitas Dell’Aqua e Gabriel Monteiro pela revisão final dos trabalhos científicos.
- A todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho...

DEDICO, HOMENAGEIO e AGRADEÇO.....!

LISTA DE TABELAS

Tabela.1 (Trabalho1.): Média e desvio padrão da média para os resultados da análise computadorizada do movimento espermático e avaliação da integridade estrutural dos espermatozóides bovinos criopreservados em meio Tris-gema de ovo-frutose (TRIS), Botu-Bov® (BB) ou Botu-Bov® à base de lecitina de soja (BB-L).....**34**

Tabela.2 (Trabalho1.): Taxa de concepção e probabilidade de prenhez após sincronização do ciclo estral e ovulação de acordo com o diluidor utilizado para criopreservação do sêmen bovino.....**34**

Tabela.1 (Trabalho2.): Efeito de diferentes diluidores (média $\pm$ desvio padrão da média) utilizados para refrigeração passiva dos espermatozóides bovinos sobre as características de movimento espermático e integridade de membrana plasmática e acrossmal (IPMA, %) ao longo de 48 horas de manutenção a 5°C.....**50**

Tabela.2 (Trabalho2.): Taxa de concepção e probabilidade de prenhez após sincronização do ciclo estral e ovulação em função da metodologia e do diluidor utilizado para preservação do sêmen bovino.....**53**

Tabela.1 (Trabalho3.): Tabela.1: Efeito da metodologia de preservação do sêmen bovino sobre as taxas de concepção e probabilidade de prenhez de vacas Nelore submetidas a IATF.....**65**

LISTA DE FIGURAS

Figura.1 (Trabalho2.): Curva de refrigeração da caixa Botutainer® utilizada para o transporte e manutenção do sêmen bovino.....51

Figura.2 (Trabalho2.): Efeito do meio diluidor sobre a motilidade espermática total (MOT,%) ao longo de 48 horas de refrigeração a 5°C.....51

Figura.3 (Trabalho2.): Efeito do tempo de preservação seminal sob refrigeração de 5°C sobre a peroxidação dos lipídeos de membrana espermática avaliados indiretamente através da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ng TBARS $\times 10^8$).....52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALH: Amplitude do deslocamento lateral de cabeça;

BB: Botu-Bov®;

BB-L: Botu-Bov® a base de lecitina de soja;

BE: Benzoato de estradiol

CASA: Análise computadorizada do movimento espermático;

C/IA: Taxa de concepção por inseminação artificial;

CPs: Crioprotetores penetrantes;

ECP: Cipionato de estradiol;

EROS: Espécies reativas de oxigênio;

FITC-PSA: Isothiocionato de fluoresceína associado a aglutinina do *Pisum sativum*;

FSH: Hormônio folículo estimulante;

IA: Inseminação artificial;

IAs: Inseminadas;

IATF: Inseminação artificial em tempo-fixos;

IPMA: Integridade de membrana plasmática e acrossomo;

LIN: Linearidade espermática;

LPLs: Lipoproteínas de baixa densidade.

LPO: Peroxidação lipídica;

MDA: Malondialdeído;

mL: Mililitro;

MOT: Motilidade total;

MP: Motilidade progressiva;

N₂: Nitrogênio líquido;

OV: Ovulação;

PI: Iodeto de Propídeo;

RAP: Espermatozóides com movimento rápido;

TRIS: Tris (hidroximetil-aminometano) gema de ovo-frutose;

UI: Unidade internacional;

μL: Microlitro;

VCL: Velocidade curvilinear.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	xii
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
<i>Criopreservação Espermática.....</i>	<i>1</i>
<i>Refrigeração do sêmen.....</i>	<i>4</i>
<i>Diluidores para criopreservação espermática.....</i>	<i>5</i>
<i>Meios diluidores para manutenção do sêmen fresco ou refrigerado.....</i>	<i>9</i>
<i>Inseminação Artificial (IA) Utilizando Sêmen Bovino Criopreservado.....</i>	<i>12</i>
<i>Inseminação Artificial (IA) Utilizando Sêmen Bovino Fresco ou Refrigerado.....</i>	<i>15</i>
<i>Inseminação Artificial em Tempo-Fixo (IATF).....</i>	<i>17</i>
<i>Análise computadorizada do movimento espermático.....</i>	<i>19</i>
<i>Integridade de membrana plasmática.....</i>	<i>20</i>
<i>Integridade de membrana acrossomal.....</i>	<i>21</i>
<i>Avaliação do estresse oxidativo.....</i>	<i>21</i>
TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	24
Trabalho.1 (Viabilidade e fertilidade do sêmen bovino criopreservado em diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja).....	24
Trabalho.2 (Fertilidade e viabilidade dos espermatozoides refrigerados a 5 °C por 48 horas: Avaliação de diferentes diluidores para a manutenção do sêmen bovino no estado líquido).....	38
Trabalho.3 (Uso do sêmen bovino refrigerado como estratégia para o aumento da taxa de concepção dos programas de inseminação artificial em tempo-fixe).....	59
CONCLUSÕES GERAIS.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICE.....	83

CRESPILHO, A.M. Estudo comparativo de diferentes metodologias de preservação do sêmen bovino para a utilização em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Botucatu, 2010. 114p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do estudo foi comparar a efetividade de três diluidores empregados para criopreservação e refrigeração do sêmen bovino em relação aos padrões de motilidade, integridade de membrana plasmática e acrossomal, índice de peroxidação lipídica e fertilidade nos programas de inseminação artificial em tempo-fixo (IATF). No Trabalho científico número 1 foi comparado a viabilidade e fertilidade pós-descongelação proporcionada pelos diluidores Tris-frutose (TRIS, Controle) e Botu-Bov® (BB), ambos contendo 20% de gema de ovo como fonte de lipoproteínas, frente à diluição em Botu-Bov®-Lecitina de Soja (meio BB-L) apresentando 1% de lecitina em substituição ao produto de origem animal. No Trabalho 2 foram avaliados os mesmos diluentes quando utilizados para a refrigeração do sêmen bovino por 48 horas a 5°C. Já no Trabalho número 3 foi avaliada a taxa de concepção na inseminação artificial (C/IA) proporcionada pelo sêmen bovino refrigerado por 24 horas em meio Botu-Bov® em comparação ao sêmen convencionalmente criopreservado no mesmo diluidor. Os meios TRIS e BB a base de gema de ovo foram mais efetivos na manutenção da viabilidade espermática pós-descongelação, conferindo melhores resultados de C/IA ($P < 0,05$) em relação ao meio BB-L. No entanto, quando utilizado o sêmen na forma líquida e refrigerado (Trabalho número 2) foi observada uma maior proteção contra o estresse oxidativo proporcionado pelo diluidor a base de lecitina de soja, resultando em maior probabilidade de prenhez quando comparado às amostras refrigeradas em TRIS ou BB, alcançando índice de concepção similar ao obtido com o sêmen congelado. A utilização do sêmen bovino refrigerado por 24 horas levou ao aumento da C/IA de vacas submetidas a IATF quando comparado ao sêmen congelado em meio Botu-Bov®. Conclui-se que embora a lecitina de soja represente uma alternativa para a produção de diluentes quimicamente definidos e com menor risco de contaminação biológica, os meios a base de gema são mais efetivos na preservação da viabilidade e fertilidade do sêmen bovino congelado. No entanto, uma

maior produção de radicais livres de oxigênio foi associada a utilização de meios a base de gema de ovo para refrigeração seminal, resultando em índices de concepção inferiores ao obtido com o sêmen bovino congelado. A O sêmen bovino refrigerado mostrou-se uma estratégia eficiente para o aumento da C/IA quando utilizado com até 24 horas de manutenção sob refrigeração.

Palavras-chave: sêmen bovino, gema de ovo, lecitina de soja, refrigeração, criopreservação.

CRESPILHO, A.M. Comparison of different bull semen preservation methods for use in fixed-time artificial insemination (FTAI) programs. Botucatu, 2010. 114p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare three different extenders used for cryopreservation of bovine semen, based on the results obtained during the cooling storage and post-thaw evaluation for motility patterns, integrity of plasmatic and acrossomal membranes, lipid peroxidation rate, as well as conception rate after fixed-time artificial insemination (FTAI). In Paper.1, the efficiency of Tris-Fructose extender (TRIS, control group), Botu-Bov® extender (BB), both containing 20% of egg yolk, and Botu-Bov®-Lecithin extender (BB-L), which has 1% of soy lecithin instead of egg yolk, were compared in cryopreservation of bovine semen. In Paper.2, ejaculates from different bulls were cooled to 5°C for 48 hours using the same extenders of Paper.1. In Paper.3 the fertility trial was conducted either with frozen-thawed semen or cooled semen for 24 hours in the BB extender. The egg yolk extenders, TRIS and BB, demonstrated significant differences on the viability and the fertility of frozen-thawed bovine semen when compared to BB-L ($P<0.05$). However, the use of lecithin instead of egg yolk on semen extender resulted in a greater protection against oxidative stress; moreover, this extender improved the conception rates, reaching the results obtained in FTAI programs with frozen-thawed semen. The use of cooled bovine semen at 5°C for 24 hours improves the conception rate of Nelore cows submitted to FTAI. Although soy lecithin is an interesting alternative source of phospholipids in the elaboration of chemically defined extenders and decrease the risk of microbiological contamination, the egg yolk semen extenders are more effective in preserving the viability and fertility of frozen-thawed bovine semen. However, there was a higher production of free radicals in cooled semen with the use of egg yolk based extenders, resulting in lower conception rates when compared to frozen-thawed semen ($P<0.05$). The use of cooled bovine semen at 5°C until 24 hours improves the conception rates in FTAI programs and represents an alternative way to conventional frozen semen.

Key words: Bull semen, egg yolk, soy lecithin, cooled semen, frozen-thawed semen.

INTRODUÇÃO

Ao contrário da grande maioria dos países desenvolvidos que acumularam grandes prejuízos econômicos em virtude da crise econômica mundial ocorrida no primeiro semestre desse ano, foi possível observar um forte crescimento da indústria brasileira no ano de 2010, sobretudo no setor de produção de gêneros alimentícios (especialmente no abate e produção de carnes e subprodutos industrializados) que vêm sobrepujando setores tradicionais da economia como o de extração de petróleo, automobilístico, produção de biocombustíveis e de minério de ferro, que historicamente representavam o “carro-chefe” da indústria nacional.

De acordo com levantamentos do portal eletrônico de notícias “Beef Point”, apenas no mês de junho de 2010 foram exportadas 96.400 toneladas de carne bovina *in natura* responsáveis pela receita de US\$ 384,2 milhões, valores que superaram em 7,29% e 32,85%, respectivamente, o volume exportado e a receita cambial gerada no mesmo período de 2009, resultados que demonstram não apenas o crescimento do setor como também uma forte valorização do produto brasileiro no mercado internacional.

O papel de destaque da carne e dos subprodutos industrializados na geração do produto interno bruto nacional (PIB) apontam para um novo panorama de produção pecuária, exigindo o aprimoramento constante dos sistemas de produção agroindustriais para garantir não apenas a produtividade do setor pecuário, mas a capacidade de se produzir com sustentabilidade e competitividade pelas gerações futuras.

Nesse contexto, diversas biotécnicas da reprodução animal como a sexagem de gametas, fertilização *in vitro*, tecnologia de transgênicos, clonagem e utilização de marcadores moleculares para caracteres produtivos vêm sendo desenvolvidas e gradativamente incorporadas comercialmente ao sistema de produção de bovinos. No entanto, nenhum desses avanços, por mais complexos e inovadores, representam biotécnicas tão importantes e abrangentes quanto a inseminação artificial (IA) para a produção e melhoramento genético animal em escala industrial, atuando de forma decisiva para a obtenção de animais com maior potencial de produção e reprodução.

Entretanto, as deficiências básicas de manejo nas propriedades têm limitado a ampla difusão da técnica na maior parte dos sistemas de produção agropecuária do país, constatando-se que apenas uma pequena parcela das fêmeas bovinas em idade reprodutiva são inseminadas anualmente no Brasil.

Os principais empecilhos para a implementação dos programas de IA em países de clima tropical representam as baixas taxas de detecção de estro dos rebanhos e o balanço energético negativo (expresso através do escore de condição corporal), sobretudo no período pós-parto, condições que confluem na determinação dos quadros de anestro, comumente observados em rebanhos de corte formados por animais *Bos indicus* ou suas cruzas. O anestro pós-parto determina o aumento do intervalo entre partos (IEP), que por sua vez leva a uma menor eficiência reprodutiva em virtude da diminuição das taxas de serviço, e por consequência, um menor número de vacas são inseminadas a cada ano.

Uma das principais alternativas para o aumento da utilização da inseminação artificial corresponde à adoção de protocolos hormonais capazes de regular o ciclo estral e sincronizar a ovulação das fêmeas bovinas, tornando possível a realização da inseminação artificial em tempo-fixo ou pré-determinado (IATF). A IATF representa uma importante ferramenta de gestão dos rebanhos por viabilizar a utilização da inseminação artificial sem observação de estro, diminuindo o impacto do anestro pós-parto e por consequência determinado o aumento das taxas de serviço das propriedades, fatores determinantes de um maior ganho econômico e genético.

No entanto, um dos principais entraves para a ampla utilização da IATF representa a baixa taxa de concepção dos programas que oscila em torno de 40 a 50%, índice que torna a biotecnologia proibitiva para muitos sistemas de produção de bovinos, sobretudo pelo investimento realizado na compra de sêmen e hormônios indispensáveis à sincronização. Além dos diferentes fatores inerentes às fêmeas bovinas, a qualidade das amostras seminais exerce influência significativa sobre a taxa de concepção na IATF.

Nesse sentido, embora a inseminação artificial utilizando sêmen bovino criopreservado represente o tipo de manejo reprodutivo mais difundido na produção pecuária mundial, poucos avanços tecnológicos têm sido observados nas últimas décadas em relação à melhora dos índices de congelabilidade dos ejaculados.

Uma alternativa ao emprego do sêmen congelado corresponde à utilização do sêmen bovino na forma líquida sob refrigeração, evitando-se as injúrias celulares relacionadas à criopreservação, apresentando, portanto, um grande potencial para utilização em programas de IA.

Nesse sentido, essa tese baseia-se:

1. No estudo da influência do meio diluidor para congelação do sêmen bovino destinado à IATF, avaliando-se o impacto de alternativas tecnológicas nacionais para o aumento da viabilidade e fertilidade do sêmen bovino congelado.
2. Na avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen refrigerado como alternativa para a preservação do sêmen bovino destinado a programas de inseminação artificial em tempo-fixado.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Criopreservação

Uma das constatações mais importantes realizada no início da década de 50 foi a de que espermatozóides podem ser congelados e, subsequentemente, descongelados caso o glicerol seja incorporado aos meios de diluição (LOVELOCK & POLGE, 1954). A partir dessa observação e da subsequente descoberta das propriedades crioprotetoras do agente dimetil-sulfóxido (Me_2SO) por Lovelock e Bishop em 1959, muitas células e tecidos têm sido criopreservados (WOODS et al., 2004).

A criopreservação espermática reconhecidamente traz enormes benefícios a reprodução de animais de importância agropecuária, sendo reconhecida também por contribuir com a conservação de espécies ameaçadas de extinção e atuar para a superação de alguns aspectos relacionados a infertilidade humana (WATSON, 2000). A congelção seminal é especialmente importante para a formação dos bancos de gametas ou germoplasma, tornando mais acessível o material genético de espécies afastadas por barreiras físicas, geográficas ou comportamentais para utilização em programas de acasalamento (LOCKYEAR et al., 2009).

O sucesso da congelção depende da efetividade do processamento que atua no bloqueio completo de todos os processos metabólicos desenvolvidos pelas células espermáticas, processos esses que se iniciam prematuramente nos testículos e que continuam a ocorrer nos epidídimos e após a ejaculação (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Embora a criopreservação tenha se tornado um procedimento de rotina na indústria bovina da inseminação artificial, admite-se que a maioria dos protocolos utilizados até o presente baseiam-se em observações empíricas (CHAVEIRO et al., 2004) resultando em um número considerável de espermatozóides que falham em sobreviver ao processamento (NAGY et al., 2004). A despeito da importância e da grande difusão do sêmen congelado para a produção de bovinos, relativamente pouco progresso têm sido alcançado, observando-se a perda significativa da integridade e funcionalidade dos espermatozóides quando submetidos a criopreservação (CELEGHINI et al., 2008).

O processo de criopreservação é responsável pelo decréscimo de 50% a 60% na viabilidade dos espermatozóides (CHAVEIRO et al., 2006; GRAVANCE et al., 1998; THOMAS et al., 1998), observando-se diversas alterações bioquímicas e estruturais abrangendo os diversos compartimentos anatômicos da célula espermática (acrossomo, núcleo, mitocôndrias, axonema, membrana plasmática). De acordo com Yoshida (2000), apenas 10% dos espermatozóides encontram-se viáveis em uma amostra seminal após o processo de congelação/descongelação.

Em criobiologia, ramo do conhecimento que estuda o efeito das baixas temperaturas sobre as células e tecidos, são reconhecidas 3 fases distintas que compõe o processo de criopreservação segundo Wolfe & Bryant (2001): a refrigeração que envolve o decréscimo a partir da temperatura ambiente até valores próximos a 0°C; congelação que ocorre na faixa de temperatura entre 0°C a - 40°C, representando a fase na qual se observam os principais danos celulares ou crioinjúrias; e a criopreservação, que se torna possível apenas sob temperaturas inferiores a - 40°C.

Os protocolos para criopreservação do sêmen bovino geralmente incluem o resfriamento lento do sêmen para 4 a 5°C, seguido por um intervalo variável de equilíbrio (de 30 minutos a 24 horas) sob temperatura de refrigeração e posteriormente a congelação seminal (LEITE et al., 2010). A fase de refrigeração representa o início do estresse térmico submetido às células espermáticas durante o processo de criopreservação. O efeito da rápida refrigeração do sêmen das diferentes espécies animais induz a um estresse letal conhecido como choque frio (STORNELLI, 2005; WATSON, 2000).

O choque frio caracteriza-se pela queda irreversível da motilidade espermática, alterações termodinâmicas e estruturais da membrana plasmática (rearranjo dos fosfolipídeos de membrana que sofrem uma transição do estado líquido cristalino para a fase gel levando ao aumento da permeabilidade celular), modificações na atividade enzimática e aumento do influxo de cálcio intracelular (HOLT, 2000; JANUSKAUSKAS et al., 1999; MEDEIROS et al., 2002; WATSON, 2000).

As principais injúrias celulares relacionadas ao choque frio ocorrem entre 15° a 5°C, temperatura de maior sensibilidade especialmente para os espermatozóides bovinos (STORNELLI et al., 2005; WATSON, 2000), levando a queda significativa na motilidade espermática e atividade metabólica (BLACKSHAW & SALISBURY, 1957).

A sensibilidade espermática ao choque frio é influenciada pela composição dos fosfolípidos e pela relação colesterol/fosfolípidos de membrana, que é particularmente menor em espécies mais sensíveis ao choque frio e a criopreservação (MORAES et al., 2010).

Durante a congelação as células estão sujeitas ao estresse resultante da interação água-soluto que surge a partir do fenômeno de cristalização do gelo (HOLT, 2000b). A criopreservação expõe os espermatozóides a um ambiente hiperosmótico causando a saída de água intracelular, redução no volume da célula e influxo de íons (HOLT, 2000). Nesse estágio os espermatozóides tornam-se particularmente susceptíveis às altas concentrações de solutos presentes nas pequenas porções de meio extracelular que ainda apresentam-se em estado líquido, afetando as interações iônicas indispensáveis à regulação enzimática celular (WOLFE & BRYANT, 2001).

Os efeitos deletérios impostos aos espermatozóides durante a criopreservação apresentam uma relação direta com a velocidade da curva de congelação, que por sua vez determina alterações na pressão osmótica do meio extracelular que envolve as células espermáticas (WATSON, 2000). As alterações físicas que ocorrem durante o processamento do sêmen são dramáticas para os espermatozóides, reconhecendo-se na velocidade da curva congelação/descongelação a ferramenta para modulação da extensão e da maneira como as alterações físicas se expressam (CHAVEIRO et al., 2006).

Segundo Mazur (1970) cada variedade celular apresenta uma velocidade ótima de congelação que garante a sobrevivência ao processamento. Nesse sentido, a queda de temperatura deve ser suficientemente lenta para permitir a plena desidratação celular, prevenindo a formação de cristais de gelo intracelulares. Contudo, a congelação deve ser rápida o suficiente para abreviar a exposição dos espermatozóides às condições hiperosmóticas crescentes que acompanham a desidratação das células espermáticas, situação que pode determinar a desnaturação de macromoléculas e irreversível colapso de membranas (HAMMERSTEDT et al., 1990; MEDEIROS et al., 2002; STORNELLI et al., 2005).

2. Refrigeração do sêmen

Todo diluente, independente de sua complexidade, tem como princípio básico a preservação da viabilidade espermática, garantindo a longevidade necessária para a utilização das amostras seminais em programas de reprodução animal. Para que esses princípios sejam atendidos pelo sêmen refrigerado, torna-se necessária a redução da temperatura de manutenção para valores próximos a 5°C, resultando na diminuição do metabolismo espermático e aumento da longevidade dos espermatozóides (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Após a diluição do sêmen para o início do processo de refrigeração, os espermatozóides passam pela zona crítica de temperatura que determina o choque frio (15 a 5°C), da mesma forma que ocorre durante a criopreservação. Durante esse processo, a viabilidade espermática sofre influência de diversos fatores destacando-se, segundo Hammerstedt et al., (1990), a ação de substâncias tampões que podem quelar íons metálicos alterando as interações entre íons e os lipídeos de membrana; alteração de proteínas de ligação, segregação de lipídeos e formação de lipoproteínas alteradas; mudanças no balanço bioenergético que influenciam a disponibilidade de açúcares livres e a manutenção de processos fisiológicos essenciais, como batimentos flagelares e funcionamento dos mecanismos de troca de membrana.

A membrana plasmática dos espermatozóides responde às mudanças de temperatura alterando o estado físico de seus lipídeos, que passam de uma fase fluida para o predomínio da fase gel (HOLT, 2000), alterando irreversivelmente o arranjo e fluidez da membrana, resultando, entre outros fatores, na alteração de enzimas celulares e no influxo de grande concentração de cálcio citoplasmático.

Em virtude dos efeitos biológicos adversos determinados pelo processo de refrigeração, pode-se afirmar, segundo Batellier et al., (2001), que o sucesso do uso do sêmen refrigerado em programas de IA, depende essencialmente da temperatura de manutenção do sêmen, da velocidade da curva de refrigeração, composição dos meios diluidores, concentração espermática na dose inseminante e número de inseminações realizadas. Destaca-se, ainda, que a eficiência do sêmen refrigerado também é influenciada por um adequado sistema de transporte ou sistema de manutenção (MELLO et al., 2007).

Embora existam algumas limitações, a refrigeração, manutenção e transporte do sêmen para o uso subsequente na IA corresponde a uma importante ferramenta para o manejo reprodutivo de diversas espécies (MIRÓ et al., 2009). Uma das principais vantagens dessa forma de armazenamento é que a fertilidade espermática pode ser preservada pelo período de 3 a 5 dias pós-diluição, mesmo sob temperatura ambiente (10 a 21°C), permitindo a redução da dose inseminante para até 1 milhão de espermatozóides em bovinos (YOSHIDA, 2000).

No entanto, muitos aspectos relacionados ao processo de refrigeração dos espermatozóides bovinos como os meios diluidores a serem utilizados, sistemas de manutenção e transporte seminal, longevidade do material genético estocado sob refrigeração, além das recomendações técnicas e procedimentos para utilização do sêmen refrigerado de touros em programas de inseminação artificial não apresentam uma definição clara na literatura, justificando o desenvolvimento de novos trabalhos nesse campo do conhecimento.

3. Diluidores para criopreservação espermática

A primeira etapa envolvida na criopreservação representa a diluição do sêmen em meios específicos, evitando-se os efeitos deletérios relacionados ao metabolismo espermático e exposição ambiental, garantindo a manutenção do movimento celular (FOOTE, 1982). Em virtude de sua importância, considera-se que os meios diluidores desempenham um dos papéis mais importantes para o estabelecimento da inseminação artificial como prática de manejo reprodutivo em bovinos (HURST, 1953).

Assim como os protocolos de criopreservação, a composição dos meios diluidores apresentam grande influência sobre a sobrevivência espermática durante o processamento, observando-se uma importante interação entre os componentes do meio e as curvas de refrigeração/congelamento (CHAVEIRO et al., 2006).

A interação entre as células espermáticas e o meio diluidor é um fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fertilização (MANJUNATH et al., 2002). Segundo Bilodeau et al., (2002), para que sejam alcançados avanços na criopreservação do sêmen bovino existe a necessidade de um melhor entendimento sobre as propriedades dos meios diluidores utilizados.

Dentre os componentes essenciais aos meios de criopreservação estão as substâncias iônicas e não iônicas responsáveis pela manutenção da osmolaridade e tamponamento dos diluentes; fontes de lipoproteínas ou macromoléculas de alto peso molecular necessárias para prevenção do choque frio; os crioprotetores como glicerol, etilenoglicol e DMSO; fontes energéticas representadas por açúcares como glicose e frutose; e demais aditivos como antibióticos, enzimas e detergentes (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Segundo Holt (2000), as principais substâncias tamponantes responsáveis pela manutenção do pH dos meios diluidores de congelação são o citrato de sódio, Tris (tris-hidroximetil-aminometano) e Tes (N-tris-hidroximetil-aminometano ácido sulfônico). Outras substâncias com potencial atividade tamponante são os fosfatos, carbamatos e especialmente os citratos, (SALISBURY et al., 1941) presentes em muitas formulações utilizadas, na atualidade, na forma de citrato de sódio.

As principais fontes de lipídeos e lipoproteínas utilizadas no preparo dos diluentes de criopreservação de sêmen bovino provêm da gema de ovo e do leite de vaca, sendo que a grande maioria das doses disponíveis comercialmente são produzidas a partir de meios à base de gema de ovo (DEJARNETTE et al., 2000). Diversos meios utilizando leite integral homogeneizado e leite desnatado fresco ou reconstituído, além da água de coco, vêm sendo utilizados para a preservação do sêmen, embora a gema de ovo prevaleça como o componente mais utilizado para a criopreservação dos espermatozoides bovinos (AMIRAT et al., 2005).

A gema é amplamente utilizada como agente crioprotetor não permeável nos diluidores de criopreservação, atuando na proteção espermática contra o choque frio (MOUSSA, et al., 2002). O mecanismo de proteção desempenhado pela gema de ovo não é totalmente conhecido (MEDEIROS et al., 2002), embora diversos trabalhos indiquem que pequenas frações da gema compostas por lipoproteínas de baixa densidade (LPLs) são responsáveis pela resistência ao choque frio (HOLT, 2000; MOUSSA et al., 2002; VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Na maioria dos trabalhos científicos especula-se que o mecanismo de ação das LPLs relaciona-se a associação desses componentes à membrana dos espermatozoides conferindo proteção celular. Holt (2000) sugere que a ação das LPLs, embora não totalmente elucidada, deriva de modificações na permeabilidade celular a água e íons

relacionadas à interação entre as LPLs e estruturas da membrana plasmática dos espermatozóides, eventos que culminam com a ativação de bombas iônicas que afetam o comportamento osmótico celular e a permeabilidade a crioprotetores como o glicerol.

Em contrapartida, Manjunath et al., (2002), indicam que as LPLs interagem com proteínas de baixo peso molecular presentes no plasma seminal (família das BSPs) e que por sua vez atuam na potencialização de moléculas capacitantes como as lipoproteínas de alto peso molecular e glicosaminoglicanos. Segundo os mesmos autores as BSPs atuam diretamente na desestabilização da membrana plasmática pela remoção direta de colesterol e fosfolipídeos, atuação que é abolida ou minimizada através da interação protéica com as LPLs, indicando, portanto, o mais provável mecanismo de ação da gema de ovo na proteção espermática.

A quantidade de gema usualmente utilizada é muito variável em função dos diferentes meios diluidores, observando-se, segundo Vishwanth & Shannon (2000), concentrações médias de 15% a 30% do volume total dos meios de criopreservação.

Em virtude do aumento da preocupação mundial por segurança microbiológica frente à emergência internacional de problemas sanitários, como a gripe aviária e encefalopatia espongiforme bovina, novos trabalhos vêm sendo conduzidos para avaliação de fontes alternativas de lipoproteínas em substituição à gema de ovo ou leite em pó para confecção dos meios diluidores. Assim, compostos de origem vegetal como a soja têm assumido posição de destaque como possíveis substitutos aos produtos de origem animal.

As sementes de soja correspondem a uma importante fonte dos fosfolipídeos conhecidos como lecitinas (SAMOTO et al., 2007), representados principalmente pela fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e ácido fosfatídico (PENCI et al., 2010), compostos associados à estabilização das membranas celulares, apresentando, portanto, um grande potencial para utilização como fonte primária de lipídeos e lipoproteínas nos meios diluidores de congelamento e refrigeração do sêmen.

Os crioprotetores penetrantes (CPs) são necessários para o sucesso da criopreservação da maioria das células (CHAVEIRO et al., 2004). Nesse sentido, várias moléculas têm sido testadas em relação à eficácia como agentes CPs, apontando-se, no entanto, o glicerol como crioprotetor de eleição para a congelamento dos espermatozóides bovinos (GUTHRIE et al., 2002; HOLT, 2000).

Segundo citações de Chaveiro et al., (2004), os crioprotetores penetrantes, como o glicerol e DMSO, protegem às células espermáticas através de suas propriedades coligativas, mantendo a concentração de solutos intra e extracelulares em níveis toleráveis e diminuindo o ponto de congelação.

Apesar de indispensáveis a congelação espermática, os crioprotetores, na dependência da concentração utilizada, são tóxicos e podem acarretar danos à membrana plasmática e diminuição da motilidade espermática (MEDEIROS et al., 2002).

Em virtude dos efeitos tóxicos relacionados à adição dos diversos CPs aos meios de congelação, diversos pesquisadores exploraram o efeito da concentração e período de glicerolização em relação a viabilidade espermática pós-descongelação. Usualmente são utilizadas concentrações de glicerol entre 0,25 M (2,25%) a 1 M (9%) observando-se pronunciada toxicidade espermática acima desses valores (FAHY, 1986). A concentração ideal de glicerol para a congelação de sêmen bovino é influenciada pelos demais componentes presentes nos meios diluidores (VISHWANATH & SHANNON, 2000), sendo que a quantidade ideal de glicerol é espécie-específica, não devendo ser extrapolada, inclusive, entre os diferentes meios diluidores (CHEN et al., 1993).

Os açúcares simples representam a principal fonte de energia presente nos diluentes, oferecendo suporte à manutenção celular e movimento espermático (GRIFFIN, 2004). Além de matriz energética, os açúcares desempenham um papel importante na manutenção da pressão osmótica e aumento da viscosidade dos diluidores (HOLT, 2000; VISHWANATH & SHANNON, 2000), além de atuarem na estabilização das membranas espermáticas através da formação de pontes de hidrogênio com grupamentos polares dos fosfolípídeos de membrana (LIU et al., 1998) agindo como crioprotetores não permeáveis.

Naturalmente, os espermatozóides de diversas espécies têm contato com açúcares como a frutose e a glicose presentes em pequenas quantidades no plasma seminal e produzidos e liberados pelas glândulas anexas durante a ejaculação, segundo Mann, (1946). De acordo com o mesmo autor, os espermatozóides bovinos apresentam uma maior atividade enzimática para redução da frutose (açúcar mais abundante no plasma seminal da espécie) em relação a outros açúcares como glicose e manose,

representando, portanto, a fonte mais rápida de material glicosilável para geração de energia celular.

O controle do crescimento microbiano representa uma etapa importante na prevenção das enfermidades reprodutivas transmitidas através do sêmen (GRIFFIN, 2004), justificando a utilização de antibióticos nos meios de criopreservação. Diversos antimicrobianos como agentes β lactâmicos (penicilinas), aminoglicosídeos (gentamicina, estreptomicina e sulfato de amikacina) e macrolídeos (tilosina) vêm sendo utilizados isoladamente ou em associações garantindo o controle do crescimento de patógenos que naturalmente se favorecem dos próprios constituintes presentes nos diluentes (como é o caso da gema de ovo ou leite).

Hurst (1953) utilizando a associação de antimicrobianos penicilina G cristalina e sulfato de estreptomicina nos meios diluidores não observou o aumento significativo nas taxas de concepção, embora tenha concluído que a adição de antibióticos melhorou os índices de concepção médios obtidos por touros que anteriormente foram declarados como de baixa fertilidade.

4. Meios diluidores para manutenção do sêmen fresco ou refrigerado

Diferente da atenção recebida pelos meios de congelação seminal, nos últimos anos poucos autores têm abordado a avaliação e desenvolvimento de novos diluidores para a manutenção do sêmen bovino a temperatura ambiente ou refrigerado. A grande maioria das publicações disponíveis são obras anteriores ao descobrimento das propriedades crioprotetoras do glicerol, período em que a utilização do sêmen fresco ou refrigerado correspondia à principal biotecnologia aplicada em reprodução de bovinos.

Atualmente, a queda na viabilidade e fertilidade espermática relacionada a utilização do sêmen congelado em programas de reprodução animal nas espécies bovina (WATSON et al., 2000), bubalina (SANSONE et al., 2000) eqüina (VIDAMENT et al., 1997), suína (JOHNSON et al., 2000) e ovina (O'HARA et al., 2010), além do advento do sêmen sexado, que em muitas situações exige o transporte de amostras seminais do local de colheita até as Centrais que realizam a sexagem de espermatozóides (HOLLINSHEAD et al., 2004), têm exigido novos estudos voltados à preservação do sêmen na forma líquida.

O'hara et al., (2010) destaca que a criopreservação do sêmen representa um procedimento oneroso para muitos sistemas de produção de ovinos, o que favorece a utilização do sêmen fresco diluído como principal ferramenta de melhoramento genético.

Como o sucesso da preservação do sêmen na forma líquida depende da diminuição reversível da motilidade e atividade metabólica dos espermatozóides (YOSHIDA, 2000), os princípios utilizados para a elaboração dos meios voltados à criopreservação também se aplicam aos diluentes para refrigeração. Segundo Kankofer et al., (2005), a qualidade do sêmen sofre influência direta dos procedimentos relacionados à manipulação seminal, destacando o efeito significativo dos meios diluidores para preservação dos espermatozóides.

Assim como na criopreservação, a gema de ovo e o leite de vaca representam as principais fontes de proteínas e lipídeos dos meios de manutenção do sêmen no estado líquido, sendo que o diluidor Tris-gema de ovo se destaca pela efetividade na preservação da motilidade dos espermatozóides bovinos conservados na forma líquida ou congelados (FOOTE, 1970). De acordo com Sansone et al., (2000) o sêmen de bubalinos pode ser preservado a 5°C por período superior a 72 horas sem a queda significativa na motilidade espermática, destacando a utilização dos meios à base de leite desnatado e Tris gema de ovo citrato de sódio ou lactato de sódio para refrigeração.

Além da gema de ovo e leite de vaca, diversos autores abordaram a adição de crioprotetores penetrantes como glicerol, dimetil-sulfóxido e 1,2- propanediol aos meios de refrigeração. Kumar et al., (1992), testando a incorporação de 3%, 6% e 9% de glicerol ao diluidor à base de leite, concluíram que o crioprotetor exerce efeito significativo sobre a preservação da motilidade espermática apenas para o sêmen estocado por períodos superiores a 72 horas.

Conclusões similares foram apresentadas por Crespilho et al., (2008) avaliando a incorporação de 1,5%, 3,0% e 6,0% de glicerol ao meio Tris-gema de ovo-frutose para manutenção do sêmen ovino refrigerado; nesse trabalho foi observado que o efeito significativo do crioprotetor na manutenção da motilidade e integridade acrossomal somente é observado a partir de 120 horas de refrigeração, não justificando, portanto, a incorporação de glicerol para curtos períodos de estocagem.

Almquist & Wickerman (1962) observaram melhor preservação do movimento de espermatozóides bovinos refrigerados a 5°C em meio à base de leite desnatado acrescido por 5% de glicerol em relação ao grupo controle sem a incorporação de crioprotetores. Em contrapartida, Foote (1970), relatou a ocorrência de choque osmótico e movimento retrógrado de espermatozóides bovinos após a adição de 8% de glicerol ao meio Tris-gema de ovo-frutose (isomótico em relação ao plasma seminal) utilizado para refrigeração. O mesmo autor indica que esse efeito adverso não foi observado quando adicionado o mesmo crioprotetor ao diluidor Cornell University (CUE) para manutenção de sêmen bovino refrigerado, demonstrando, portanto, a existência de interação entre diluente de refrigeração e crioprotetores.

Os espermatozóides sob refrigeração dependem do substrato energético presente nos meio diluidor para manutenção da viabilidade celular. Blackshaw et al., (1957) destacaram que os espermatozóides bovinos podem utilizar uma grande variedade de substratos metabólicos, havendo, no entanto, uma maior habilidade para a degradação da frutose, cuja velocidade é inversamente proporcional a temperatura de manutenção do sêmen. Além da frutose, outros açúcares simples, como a glicose (FORD, 2006) e arabinose (O'DELL et al., 1959) são glicosiladas pelos espermatozóides bovinos e, portanto, podem ser incorporadas aos meios de refrigeração.

Para prevenir o crescimento da microflora no sêmen resfriado, os diluidores são suplementados com antibióticos, destacando-se a gentamicina, neomicina, penicilina e estreptomicina (JOHNSON et al., 2000) como principais agentes. Alguns fatores como presentes nos meios diluidores, como o tempo de estocagem e temperatura de armazenagem exercem efeito significativo sobre a probabilidade de contaminação microbiológica do sêmen resfriado.

Um dos principais fatores associados ao declínio na motilidade e fertilidade do sêmen estocado a 5°C é o estresse oxidativo que ocorre como consequência normal do metabolismo espermático, resultando na queda irreversível da qualidade do sêmen refrigerado (ÇOIAN et al., 2010). No caso das amostras processadas sob baixas temperaturas, a redução do metabolismo espermático não impede a formação das espécies reativas de oxigênio (EROS), especialmente importante sob condições de aerobiose (KRZYZOSIAK et al., 2001).

Embora notória a participação e importância das EROS no desencadeamento de processos fisiológicos orgânicos, a ação desses agentes ocasiona a peroxidação dos lipídeos de membrana e lesão do DNA espermático, resultando na queda de motilidade e morte celular (UYSAI & BUCAK, 2007). Como a membrana plasmática possui grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, os espermatozóides são células potencialmente susceptíveis aos efeitos deletérios causados pelas EROS (AURICH, 2005).

Uma das formas de minimizar o impacto do estresse oxidativo durante o processo de estocagem seria através da suplementação dos meios diluidores com agentes antioxidantes, garantindo maior qualidade ao sêmen resfriado (MICHAEL et al., 2009). Nesse sentido, diversos antioxidantes como Vitamina C e E, aminoácidos como cisteína, hipotaurina e taurina, carotenóides, piruvato, além de antioxidantes enzimáticos como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase (GRAAF et al., 2007) têm sido utilizados como estratégia para melhorar a viabilidade dos diluidores de criopreservação (SARIÖZKAN et al., 2009) e refrigeração do sêmen bovino (FOOTE, 1962), com especial referência à catalase, presente no diluidor Caprogen®, meio especialmente concebido para a preservação e manutenção do sêmen no estado líquido (VERBERCKMOES et al., 2005a).

Recentes avanços na refrigeração seminal também incluem o desenvolvimento de diluidores baseados na composição iônica e osmótica da cauda do epidídimo bovino (diluidores CEP-1 e CEP-2), inovações inspiradas, segundo Verberckmoes et al., (2004), na peculiar capacidade epididimária em preservar a habilidade de fertilização dos espermatozóides por várias semanas. De acordo com os mesmos autores, o sêmen bovino pode ser estocado a 5°C por até 6 dias em meio CEP-2, preservando a viabilidade espermática.

5. Inseminação Artificial (IA) Utilizando Sêmen Bovino Criopreservado

Após a primeira descrição da célula espermática por Leeuwenhoek em 1678, foram necessários 100 anos para que a primeira inseminação artificial fosse realizada por Lázaro Spallanzani, em uma cadela (FOOTE, 1982). No entanto, somente no século XVIII foram conduzidos os primeiros trabalhos envolvendo a utilização prática

da IA em diversas espécies de animais de produção, estabelecendo-se a base dos conhecimentos empregados até o presente na espécie bovina.

A inseminação artificial corresponde a primeira grande biotecnologia aplicada em benefício da reprodução e melhoramento genético de animais de produção (FOOTE, 2002). Os trabalhos de IA foram intensificados a partir do início do século 20, crescendo exponencialmente nos últimos 50 anos, revolucionando a reprodução de bovinos ao reduzir o risco de transmissão de doenças venéreas, auxiliar os trabalhos de seleção por mérito genético e, essencialmente, atuar na eliminação de alelos letais das linhagens bovinas (FOOTE, 1999).

Parte do mérito pelo desenvolvimento da IA pode ser atribuído à formação, organização e competitividade das Centrais de Genética e Inseminação Artificial as quais revolucionaram os Estados Unidos da América (EUA) no início da década de 40, regulamentando a produção de sêmen e criando a base para os atuais programas de melhoramento genético bovino, segundo Miller (1980). De acordo com o mesmo autor, em 1980, cerca de 60% do gado leiteiro já era inseminado nos EUA, demonstrando a importância e ampla disseminação da técnica no exterior.

Com o aumento no número de inseminações realizadas houve a real necessidade do desenvolvimento de métodos que permitissem a manutenção e estocagem dos espermatozoides por longos períodos, garantindo a viabilidade celular através da redução do metabolismo espermático (GAO et al., 1997). Nesse sentido, a descoberta das propriedades crioprotetoras do glicerol inaugurou a 2ª revolução da inseminação artificial em bovinos, viabilizando a criopreservação espermática.

O primeiro sucesso da congelação do sêmen ocorrido na Inglaterra (POLGE, 1949), estimulou pesquisas subsequentes em muitas Centrais de IA e laboratórios de Universidades dos EUA, que trabalharam intensamente para o nascimento do primeiro bezerro norte americano fruto de sêmen congelado (1953) e pelo desenvolvimento dos equipamentos para execução da IA e estocagem do sêmen (MILLER, 1980). No entanto, o mérito pelo desenvolvimento do aplicador universal e das palhetas utilizadas para a congelação do sêmen foi atribuído ao empreendedorismo de um pesquisador francês (CASSOU, 1970), que estabeleceu as bases atuais para a IA das diferentes espécies domésticas.

Atualmente, a inseminação artificial figura como a biotecnologia da reprodução mais utilizada em todo o mundo, substituindo paulatinamente a monta natural em fazendas dos países desenvolvidos ou em desenvolvimento (PARKINSON, 2004; VERA-MUNOZ et al., 2009).

Isoladamente, a IA é considerada a mais importante técnica utilizada para o melhoramento genético animal (SUGULLE et al., 2006), representando, segundo Baruselli et al., (2004), uma biotécnica fundamental para a obtenção de animais com maior potencial de produção e reprodução. Corresponde a um método eficiente para acelerar o melhoramento genético de rebanhos e, segundo Vasconcelos e Sá Filho (2010), apresenta uma relação custo/benefício muito interessante, pois através da IA é possível se obter genética de animais valiosos, que agregam eficiência de ganho aos produtos, por um custo favorável.

As principais vantagens relacionadas a utilização da IA empregando sêmen bovino criopreservado são o incontestável ganho genético, garantido através da utilização de touros de mérito zootécnico comprovado; otimização de animais melhoradores através da diluição dos ejaculados; prevenção de doenças sexualmente transmissíveis garantida pelas rigorosas avaliações sanitárias perfilhadas para animais submetidos a regimes de colheita espermática; facilidade de transporte de amostras seminais, difundindo e permitindo o intercâmbio de genética superior para as mais diversas regiões do globo; prevenção de acidentes e incidentes decorrentes do transporte de reprodutores, objetivando programas de monta natural. O objetivo dos programas de IA é maximizar a produção de bezerros de qualidade em função do número de vacas em reprodução e em um menor intervalo de tempo (SUGULLE et al., 2006).

Apesar do marcante papel da IA como biotecnologia de melhoramento genético, apenas uma pequena parcela das fêmeas em idade reprodutiva são incluídas nos programas (BÓ et al., 2003). De acordo com Vasconcelos & Sá Filho (2010), estima-se que menos de 5% dos animais de reposição dentro da população de bovinos de corte mundial sejam oriundos de inseminação artificial. Os mesmos autores relatam que no Brasil, levando-se em consideração as estatísticas oficiais para o número de doses de sêmen bovino comercializadas, nasceram no ano de 2006 cerca de 1,9 a 2,3 milhões de bezerros frutos de inseminação, valores que representam apenas 7% do total de bezerros nascidos naquele ano.

Segundo Thibier & Wagner (2002), apenas 1,2% do total de fêmeas em idade reprodutiva são IAs nos países da América do sul, representando apenas 1,09% do total de matrizes inseminadas em todo o mundo. Os resultados tornam-se ainda mais alarmantes quando comparados às taxas da Europa e América do Norte, onde, respectivamente, 61% e 25% do total de fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas anualmente.

Tal panorama, além de preocupante, representa uma grande ameaça a hegemonia brasileira no mercado internacional de exportação de produtos cárneos, o qual mostra-se mais exigente a cada ano por características relacionadas à qualidade, padronização e rastreabilidade dos animais produzidos, características de produção que se tornam possíveis apenas através da adoção de biotecnologias como a IA.

Diversos fatores podem ser apontados para o baixo percentual de utilização da inseminação artificial no manejo reprodutivo bovino, destacando-se, segundo Barros et al., (2004), a carência de mão de obra qualificada e deficiências básicas de manejo nas propriedades. Além disso, os programas de IA nos trópicos têm como principal empecilho a baixa taxa de detecção do estro, visto ser o rebanho bovino Zebu o tipo predominante e que não demonstra claramente os sinais de cio (GALINA et al., 1996), sendo observada uma grande variabilidade entre a duração do estro (1,3 a 20 horas) e o intervalo início do estro/ovulação (19 a 29 horas), segundo BÓ et al., (2003).

6. Inseminação Artificial (IA) Utilizando Sêmen Bovino Fresco ou Refrigerado

Anterior ao desenvolvimento dos processos de congelação/descongelação dos espermatozóides, a inseminação artificial em bovinos era realizada apenas com sêmen fresco (VERBERCKMOES et al., 2005), observando-se uma longevidade espermática de até 48 horas (THACKER & ALMQUIST, 1953). No entanto, com a descoberta dos agentes crioprotetores e avanços na produção de meios diluidores, paulatinamente a utilização do sêmen bovino fresco ou refrigerado foi abandonada em virtude dos evidentes benefícios relacionados com a criopreservação.

Contudo, a congelação não foi capaz de resolver todos os problemas relativos a conservação do sêmen, já que o processamento reduz drasticamente a fertilidade dos espermatozóides da maioria das espécies mamíferas (WATSON, 2000). Uma expressiva parcela de reprodutores mostram-se intolerantes ao processo de criopreservação,

apresentando significativa queda na fertilidade espermática após o processamento, com especial destaque para a espécie equina (BATELLIER et al., 2001) e suína (GIL et al., 2008). Por outro lado, a congelação representa um processo caro em relação à IA utilizando sêmen fresco, que pode ser utilizado como método adicional para propagação de material genético (LEBOEUF et al., 2003).

O'Hara et al., (2010) destacaram que a utilização do sêmen fresco ou refrigerado também apresenta grande aplicabilidade nos trabalhos de IA na espécie ovina em virtude da baixa fertilidade obtida após a inseminação transcervical com sêmen congelado.

A utilização do sêmen bovino na forma líquida apresenta como principais vantagens a otimização de touros geneticamente superiores, ausência de custos relacionados a estocagem e simplicidade na sua manipulação/utilização na IA quando comparado ao sêmen congelado (VISHWANATH, 2003). De acordo com simulação feita por Bucker et al., (2009), considerando a redução na dose inseminante proporcionada pela utilização do sêmen fresco, um reprodutor que produz 400 doses de sêmen congelado por coleta (20×10^6 espermatozóides por palheta), pode produzir até 5300 doses ($1,5 \times 10^6$ espermatozóides por palheta) através da utilização do sêmen fresco diluído sem comprometer os índices de fertilidade.

Em virtude das vantagens relacionadas à utilização do sêmen fresco diluído na IA de bovinos, observa-se a produção mundial de 12 milhões de doses anualmente, comercializadas especialmente na Nova Zelândia e, em menor escala, na África, França, Austrália, Alemanha e Europa Oriental (VISHWANATH, 2003).

Segundo Thibier & Wagner (2002), cerca de 5% do total de doses de sêmen bovino e bubalino produzidas no mundo são processadas no estado líquido, sendo que o número de inseminações utilizando sêmen fresco ou refrigerado vem aumentando consideravelmente ao longo dos últimos anos, sobretudo na Europa, superando a marca de 2,5 milhões de doses produzidas anualmente.

Bucker et al., (2009), levantaram algumas hipóteses para explicar esse crescente interesse pelo sêmen fresco diluído. Os autores afirmaram que com o crescimento dos rebanhos e do tamanho das fazendas, os custos por unidade de peso produzido (expresso pela produção de bezerros) também aumentaram, e com isso cresceu o interesse por tecnologias que permitem diminuir os custos da inseminação artificial.

Vishwanath, (2003) aponta que as três principais variáveis que norteiam o crescimento da IA são o custo do sêmen, o custo da inseminação e o sucesso dos programas (expresso pela taxa de não retorno ao cio após o primeiro serviço). No entanto, o dado mais interessante apresentado no mesmo estudo foi que entre os maiores produtores mundiais de bovinos a Nova Zelândia, nação que tradicionalmente utiliza o sêmen fresco diluído e não possui subsídios a agropecuária em sua política governamental, apresenta o menor custo do sêmen/inseminação artificial.

7. Inseminação Artificial em Tempo-Fixo (IATF)

Impulsionados pelo maior entendimento sobre a fisiologia reprodutiva da fêmea bovina, diversos protocolos hormonais capazes de regular o crescimento dos folículos e o momento da ovulação têm sido desenvolvidos e empregados comercialmente, viabilizando a IATF e eliminando a observação de cio (THATCHER et al., 2001).

Os programas de IATF representam a forma mais prática para o aumento da utilização da IA (SÁ FILHO et al., 2010b). Segundo Madureira (2000), a real vantagem da IATF é a de que 100% das fêmeas podem ser inseminadas após os tratamentos de sincronização, enquanto que apenas 60% delas seriam IA no período de 3 semanas, em um sistema tradicional.

Inúmeros protocolos de sincronização do ciclo estral têm sido desenvolvidos e empregados comercialmente (SÁ FILHO et al., 2010b). Na América do Sul, o uso de dispositivos liberadores de progesterona ou progestágenos associados à administração de estrógenos no primeiro dia do protocolo correspondem ao tratamento mais utilizado para a IATF em bovinos (MENEGETTI et al., 2009).

A progesterona e os agentes progestágenos correspondem ao tratamento comumente utilizado para restabelecer a ciclicidade ovariana pós-parto (BARUSELLI et al., 2004b; DAY, 2004), atuando na prevenção da manifestação prematura do estro nos programas de sincronização (DEJARNETTE et al., 2001).

Os estrógenos quando administrados em presença de progesterona endógena ou exógena levam a diminuição dos níveis circulantes de FSH e LH provocando a atresia dos folículos dominantes (BARUSELLI et al., 2004; MADUREIRA, 2000), o que leva à sincronização da emergência de uma nova onda folicular (DUFFY et al., 2004).

Além da onda de crescimento folicular, a sincronização da ovulação corresponde a uma ferramenta importante para o sucesso da IATF, garantindo maior precisão no momento e nos mecanismos responsáveis pela ovulação. Fármacos indutores de ovulação, como os estrógenos ou GnRH, agem através de retroalimentação positiva sob a liberação pulsátil de LH; já os hormônios hCG, ou LH atuam diretamente nos receptores de LH presentes nas células da granulosa dos folículos ovarianos desencadeando o processo ovulatório (BARUSELLI, 2004).

A incorporação de estradiol ou eCG ao término de um tratamento de sincronização com progestágenos pode resultar em antecipação e maior sincronização do estro (DUFFY et al., 2004). O eCG ou PMSG apresenta ações biológicas de FSH e LH, contribuindo para o crescimento, maturação e ovulação do folículo dominante presente no momento das aplicações. Segundo Kastelic et al., (1999) a administração de eCG no momento da retirada dos implantes progestágenos é usualmente recomendada, especialmente se uma alta proporção dos animais sincronizados apresentarem-se em anestro. O eCG pode ser incorporado aos protocolos de sincronização para aumentar o suporte de LH e diâmetro do folículo pré-ovulatório, garantindo maiores taxas de ovulação (SÁ FILHO et al., 2010).

Apesar dos evidentes avanços nos sistemas de produção de gado de corte vinculados ao desenvolvimento comercial da IATF, a revisão de diversos trabalhos envolvendo a utilização de diferentes protocolos de sincronização em bovinos apontam índices médios de concepção ao redor de 40 a 50% (MENEGETTI et al., 2009; SÁ-FILHO et al., 2010a; SÁ-FILHO et al., 2010b), resultados aceitáveis, mas ainda distantes da performance reprodutiva ideal, tornando onerosa a biotecnologia da IATF para alguns sistemas de produção.

Inúmeras causas podem ser apontadas para a amplitude de resultados e/ou índices insatisfatórios nos programas de IATF, como a baixa condição corporal dos animais ao início do tratamento, raça, categoria animal (primíparas ou múltíparas, lactantes ou solteiras), tamanho do folículo dominante no momento da indução de ovulação, manifestação de estro ao fim do protocolo (SÁ FILHO et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010b)

Outro fator correlacionado positivamente com o sucesso dos protocolos de IATF, mas que a muito vêm sendo negligenciado, corresponde à qualidade do sêmen

empregado nos programas (Crespilho et al., 2006), justificando o desenvolvimento de novos projetos que objetivem a melhora da qualidade das amostras de sêmen produzidas e comercializadas.

8. *Análise computadorizada do movimento espermático*

Como a viabilidade do sêmen bovino exerce influencia significativa sobre a taxa de concepção dos programas de IA (CRESPILHO et al., 2009), a triagem inicial da qualidade das amostras representa uma ferramenta indispensável de manejo reprodutivo dos rebanhos.

Nas últimas décadas diversos métodos de análise foram desenvolvidos, mas apenas uma pequena parcela dessas inovações foram adotadas na rotina de avaliação da qualidade do sêmen bovino (JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS, 2002). Uma das principais técnicas para avaliação do potencial de fertilidade do sêmen corresponde à análise computadorizada do movimento espermático – CASA (MAZIERO et al., 2008).

A principal vantagem da análise computadorizada em relação à avaliação convencional do movimento espermático em microscopia de luz relaciona-se a maior repetibilidade e objetividade de CASA, gerando informações importantes a respeito das propriedades cinéticas de uma partida de sêmen baseando-se na avaliação individual das células (JANUSKAUSKA E ZILINSKAS, 2002), o que permite a identificação de diferentes subpopulações espermáticas em uma amostra (VERSTEGEN et al., 2002).

A técnica CASA utiliza um software que analisa e grava cada característica do movimento espermático, facilitando a comparação de resultados entre diferentes laboratórios e possibilitando diagnosticar as mais sutis diferenças entre reprodutores ou tratamentos (CONTRI et al., 2010). Este detalhamento da cinética celular proporcionada pela CASA reflete indiretamente a atividade metabólica espermática (GIL et al., 2000) e diretamente a qualidade dos espermatozóides presentes em uma amostra seminal (FARREL et al., 1996).

O movimento espermático corresponde a uma das características mais importantes associadas ao potencial de fertilização de uma amostra, reportando-se uma clara associação entre a ausência de movimento e os quadros de infertilidade (OLDS-CLARKE, 1996). No entanto, mesmo a avaliação computadorizada do movimento espermático proporciona inconsistente correlação com os índices de concepção animal

quando utilizada isoladamente, visto que a motilidade espermática é apenas um dos vários pré-requisitos básicos indispensáveis para que os espermatozóides concluam com êxito a fertilização do ovócito (GRAHAM & MOCÉ, 2005; MAZIERO et al., 2008).

9. Integridade de membrana plasmática

Após o surgimento da técnica CASA novas biotecnologias foram desenvolvidas visando a avaliação das diferentes estruturas que compõem os espermatozóides (ARRUDA et al., 2003), com especial destaque à membrana plasmática.

A integridade de membrana plasmática (IMP) é um pré-requisito para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização, que incluem a capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas (PAPA et al., 2000). Os diversos domínios de membrana dos espermatozóides mostram-se altamente vulneráveis à criopreservação, observando-se, frequentemente, a queda significativa da viabilidade espermática em função do processamento.

Em virtude das características intrínsecas aos espermatozóides, os quais são desprovidos de atividade biossintética, reparadora, de crescimento e divisão (YOSHIDA, 2000), observa-se uma grande vulnerabilidade celular ao processamento, resultando na ruptura e desestabilização das membranas, sobretudo após a congelação/descongelação.

Vários testes têm sido empregados para a determinação da IMP, como as colorações supra-vitais incluindo Tripán-Blue-Giensa e Eosina-Nigrosina, testes hiposmóticos e mais recentemente o uso das sondas fluorescentes que atuam através de reações com enzimas citoplasmáticas ou de ligação com o DNA espermático (ARRUDA et al., 2003; BRITO et al., 2003).

As preparações empregando a combinação de sondas fluorescentes ou fluorocromos, avaliadas através de microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, destacam-se como as mais estudadas e utilizadas na determinação da IMP dos espermatozóides, gerando dados quantitativos sobre a permeabilidade relativa das membranas, conferindo especificidade na diferenciação entre células funcionais e afuncionais (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2003).

10. Integridade de membrana acrossomal

O acrossomo é derivado do complexo de Golgi, sendo composto por enzimas hidrolíticas organizadas em um tipo de matriz (RAMALHO-SANTOS et al., 2002). A ligação do espermatozóide à zona pelúcida provoca a chamada reação acrossomal, resultando na liberação e ativação das enzimas acrossomais, que em associação ao processo de hiperativação da motilidade espermática, irão conferir a habilidade necessária para que os espermatozóides penetrem a zona pelúcida e realizam a singamia (HONDA et al., 2002).

Em virtude da grande importância para o processo de fertilização, lesões acrossomais que podem ocorrer prematuramente durante o processamento do sêmen ou durante o trânsito espermático pelo trato reprodutor feminino podem ocasionar falhas no processo de fertilização e, conseqüentemente, queda na fertilidade do sêmen (SILVA & GADELLA, 2006).

As membranas acrossomais são “pré-programadas” para sofrerem a fusão natural que resulta na reação acrossomal, característica que determina uma maior sensibilidade aos processos de refrigeração e congelamento em relação aos outros domínios da membrana dos espermatozóides (GRAHAM, 2001). Nesse sentido, a integridade do acrossomo e a capacidade das células espermáticas em reagir *in vitro* à estimulação para reação acrossomal, podem ser utilizadas para fins prognósticos no acesso a qualidade do sêmen bovino.

Para a determinação da integridade do acrossomo tem-se popularizado a combinação de sondas fluorescentes como o isotiocionato de fluoresceína (FITC) associado a aglutininas como a do *Ricinus communis* (RCA) e *Psium sativum* (PSA), que apresentam capacidade de ligação às glicoproteínas específicas da membrana acrossomal (CELEGHINI et al., 2008), permitindo, dessa forma, a visualização das estruturas sob microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo.

11. Avaliação do estresse oxidativo

Durante o processo de refrigeração os espermatozóides tornam-se susceptíveis a diversos fatores que podem comprometer a integridade da membrana plasmática, acrossomal e lesão mitocondrial, resultando na queda irreversível de motilidade e capacidade de fertilização (RAPHAEL et al., 2008). Um dos principais fatores que

contribuem para a queda na viabilidade do sêmen resfriado e congelado corresponde a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), geradas através de reações catalizadoras que ocorrem primariamente em função dos espermatozóides mortos presentes em solução (NAIR et al., 2006). No entanto, a produção de EROS também ocorre como um produto fisiológico do metabolismo espermático, sendo considerada como inevitável em condições de aerobiose ou microaerobiose comuns à conservação do sêmen (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Durante a refrigeração/criopreservação os espermatozóides são submetidos a atmosfera de aerobiose e expostos ao choque frio, condições que aumentam a susceptibilidade a peroxidação lipídica (LPO) em virtude da grande disponibilidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana espermática, afetando a efetividade dos procedimentos de conservação seminal e, em última instância, ocasionando baixa eficiência na IA (NAIR et al., 2006).

A produção excessiva de EROS determina o chamado estresse oxidativo que pode levar a danos estruturais às biomoléculas, DNA, lipídeos, carboidratos e proteínas, bem como a outros componentes celulares (NICHII et al., 2006). Dentre as EROS produzidas, destacam-se como mais deletérias os ânions superóxido (O_2^-), peróxido (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH), sendo que as reações responsáveis pela produção desses radicais são mais ativas no sêmen bovino estocado sob temperatura ambiente em relação ao sêmen congelado (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Fatores como meios diluidores e seus constituintes específicos, concentração espermática e tempo de estocagem parecem interagir determinando a viabilidade do sêmen estocado sob refrigeração. Nesse sentido, Raphael et al., (2008) observaram a queda significativa da integridade de membrana plasmática e acrossomal além de maior proporção de peroxidação dos lipídeos de membrana dos espermatozóides de garanhões ao longo do período de 48 horas de estocagem sob refrigeração a 5°C.

Crespilho et al., (2010) reportaram a queda significativa na motilidade total, progressiva e porcentagem de espermatozóides bovinos exibindo movimento rápido, independente da adição do aminoácido taurina ao meio TRIS-gema de ovo-frutose utilizado para a manutenção do sêmen por 96 horas sob refrigeração passiva. No mesmo experimento, no entanto, foi observada a redução significativa na peroxidação lipídica

ocorrida no meio confeccionado com 50 mM de taurina, demonstrando a efetividade do aminoácido como agente antioxidante.

Vishwanath & Shannon (2000), relataram que os espermatozóides bovinos estocados sob temperatura ambiente em diluidor CAPROGEN® apresentaram índices de fertilidade aceitáveis até os primeiros 3 a 5 dias da diluição, havendo uma queda acentuada e significativa nos índices de concepção até o 10º dia de estocagem (em torno de 40% de taxa de não retorno ao cio).

Como o estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a produção de EROS e os sistemas de depuração, a quantificação das espécies reativas pode ser realizada através da quantificação direta das EROS, dos antioxidantes ou pela mensuração de produtos finais do estresse oxidativo, segundo Nichi et al., (2006). Os mesmos autores afirmaram que a mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) corresponde ao método mais utilizado, quantificando indiretamente o estresse oxidativo através da mensuração indireta da concentração de malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação dos lipídeos.

Através da técnica do TBARS torna-se possível investigar não apenas a produção das EROS em determinado sistema de cultivo ou meio de manutenção celular, como também comparar diferentes tratamentos ou diluidores utilizados para preservação espermática em relação a sua capacidade “tamponante” de formação de espécies reativas.

***Trabalho científico número 1 destinado à revista Livestock Science
(Apêndice)***

**Viabilidade e fertilidade do sêmen bovino criopreservado em diluidores à base de
gema de ovo ou lecitina de soja**

A.M. Crespilho^a, M.F. Sá Filho^b, G.A. Monteiro^a, B.R. Avanzi^a, A. Martins Jr^c, J.A.
Dell'Aqua Jr^a, F.O. Papa^{a*}

^a Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

^b Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

^c Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil

*Autor para correspondência. Tel: + 55 (14) 3811-6249

Email: papa@fmvz.unesp.br

Resumo

Os meios diluidores exercem influência significativa sobre a qualidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial, havendo um grande interesse internacional pelo desenvolvimento de diluentes quimicamente definidos, livres de produtos de origem animal. O objetivo desse trabalho foi comparar a eficácia de três diluidores de criopreservação de sêmen bovino em relação à qualidade seminal pós-descongelamento e a taxa de concepção por inseminação artificial (C/IA). No Experimento 1 foram criopreservadas amostras de 20 touros da raça Nelore utilizando os diluidores Tris-frutose (TRIS, Controle) e Botu-Bov® (BB), ambos contendo 20% de gema de ovo, ou o diluidor Botu-Bov®-Lecitina de Soja (meio BB-L) composto por 1% de lecitina em substituição a gema. As amostras seminais foram avaliadas através da análise computadorizada do movimento espermático (CASA) e integridade de membrana plasmática e acrossomal. No Experimento 2 foi avaliada a C/IA através da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de 349 vacas Nelore, lactantes, sincronizadas com protocolo a base de progesterona e estradiol, utilizando um pool de sêmen proveniente de dois reprodutores. Todas as vacas foram submetidas a três exames ultrassonográficos ovarianos, realizados no momento da retirada do implante progestágeno (CIDR-B®), no dia da IATF e dois dias após para determinação da taxa de ovulação. Apenas as vacas que exibiram ovulação sincronizada foram consideradas para as análises estatísticas. Embora o diluidor BB-L tenha conferido maior retilinearidade e linearidade de movimento pós-descongelamento em relação ao meio TRIS, os meios a base de gema de ovo proporcionaram maior taxa de movimento total e progressivo, além de maior porcentagem de espermatozoides rápidos e íntegros ($P < 0.05$). A C/IA foi de 59,26^a, 63,37^a, 36,45^b, respectivamente para as amostras de sêmen criopreservadas em diluidor TRIS, BB ou BB-L. Embora a lecitina de soja represente uma alternativa para a produção de diluentes quimicamente definidos e com menor risco de contaminação biológica, os meios a base de gema são mais efetivos na preservação da viabilidade e fertilidade do sêmen bovino congelado.

Palavras chave: sêmen bovino, gema de ovo, lecitina de soja, criopreservação.

Abstract

Semen extenders play an important role in maintaining quality and fertility of bovine semen used in artificial insemination programs. For decades, researchers across the globe have worked towards the development of a chemically defined semen media composed only by substances of non-animal origin. The aim of this study was to compare extenders that contain either egg yolk or lecithin, based on the results obtained on bull frozen semen at post-thaw evaluation and conception rate after artificial insemination (C/IA). In *Experiment 1*. Ejaculates from 20 Nelore bulls were frozen using either Tris-fructose extender (TRIS, control group) or Botu-Bov® (BB), both containing 20% of egg yolk, or using the new Botu-Bov®-Lecithin extender (BB-L) in which 10% of soy lecithin has replaced the egg yolk. Semen samples were evaluated by computer assisted sperm analysis (CASA) for multiple parameters, and manually for the integrity of both the plasma and acrosomal membranes (IPMA, %). In *Experiment 2*, the C/IA was assessed through fixed-time artificial insemination (FTAI) of 349 suckled postpartum beef cows that underwent controlled intravaginal progesterone releasing device (CIDR®) and estradiol benzoate synchronization protocol, and were inseminated with pooled frozen-thawed semen samples. Transrectal ultrasonography exams were performed in all cows starting at the time of CIDR® withdrawal, again at the FTAI, and finally, 48 hours later to determine the ovulation rate. Only cows that exhibited synchronized ovulation were considered for statistical analysis. Although BB-L conferred better post-thaw values for straightness and linearity than TRIS, both egg yolk extenders provided higher total and progressive motility and higher percentage of both rapid and integral sperm cells ($P < 0.05$) than the lecithin extender. The average C/IA were 59.26^a, 63.37^a, 36.45^b respectively for TRIS, BB or BB-L. Soy lecithin is an interesting alternative source of phospholipids to be considered in the elaboration of chemically defined extenders since it allows for decreasing the risk of microbiological contamination. However, egg yolk semen extenders are still more effective in preserving the viability and fertility of frozen-thawed bovine semen.

Keywords: Bull semen, egg yolk, soy lecithin, cryopreservation.

1. Introdução

Os dois principais objetivos da indústria bovina da inseminação artificial são o controle da veiculação de patógenos através do sêmen e a gestão total de qualidade das doses produzidas (Wangtendonk-de Leeuw et al., 2000). No entanto, a seguridade biológica da produção de sêmen é influenciada por diversos fatores, como a efetividade dos antibióticos adicionados ao sêmen, qualidade dos materiais e higiene nos processos envolvidos, além da qualidade dos meios diluidores empregados (Ruigh et al., 2006).

A maioria dos diluidores apresenta gema de ovo, leite em pó ou a combinação desses dois ingredientes como fontes primárias das lipoproteínas que auxiliam na estabilização de membrana durante o processo de congelação/descongelação (Bousseau et al., 1998). Embora a gema de ovo e o leite desnatado apresentem grandes benefícios para o processo de criopreservação, esses componentes representam um risco microbiológico em potencial em virtude de sua origem animal, podendo comprometer a qualidade do sêmen criopreservado.

Por essa razão, a OIE (Organização Internacional de Epizootias) recomenda em sua normativa de 2003, que os produtos de origem animal utilizados na produção do sêmen devam ser originários de fontes livres de qualquer risco biológico ou devam sofrer o processamento necessário para garantir a seguridade dos compostos previamente a sua utilização (Marco-Jiménez et al., 2004).

Uma das alternativas aos componentes de origem animal é a lecitina de soja. As lecitinas correspondem a uma mistura natural de fosfatidilcolina com diversos ácidos graxos de cadeia simples como o esteárico, oléico e palmítico, fosfolipídeos predominantes na grande maioria das membranas biológicas de mamíferos, que atuam conferindo estabilidade estrutural às células (Oke et al., 2010). Em virtude dessa composição, trabalhos envolvendo a utilização de lecitinas como fonte primária de lipoproteínas para os meios de preservação seminal foram desenvolvidos, sobretudo a partir da metade da década de 90 para a criopreservação de espermatozóides bovinos (Aires et al., 2003; Bousseau et al., 1998; Vera-Munhoz et al., 2009), bubalinos (Akhter et al., 2010), ovinos (Gil et al., 2003) e eqüinos (Papa et al., 2010). No entanto, como os resultados obtidos com a lecitina como substituto da gema de ovo ainda permanecem

conflitantes (Leite et al., 2010), poucas inovações tecnológicas surgiram nos últimos anos, destacando-se que o meio Tris-gema de ovo-frutose ainda permanece como o mais utilizado para criopreservação do sêmen de touros.

O objetivo desse trabalho foi comparar a efetividade da lecitina de soja frente a diluidores contendo 20% de gema de ovo através da avaliação da viabilidade espermática pós-descongelamento e dos índices de concepção do sêmen bovino congelado em programas de IATF, testando-se a hipótese de que a lecitina representa um substituto em potencial ao produto de origem animal.

2. Material e Métodos

2.1. Colheita do sêmen

Foram utilizados 20 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade entre 24 e 30 meses, obtendo-se as amostras seminais através de eletroejaculação. Para o Experimento 1 foram colhidas duas amostras seminais de cada reprodutor (a primeira destinada a triagem inicial da qualidade seminal e uma segunda para execução das etapas experimentais). Foi estabelecido como critérios mínimos de qualidade para inclusão no trabalho a motilidade total do sêmen fresco superior a 70%, porcentagem de defeitos maiores inferior a 20%, menores 20% e defeitos totais inferior a 25%.

Para o Experimento 2 foram selecionados dois reprodutores, com base em características fenotípicas próprias da raça, submetendo cada animal a duas colheitas de sêmen seriadas, realizadas em um único dia através de vagina artificial. Após cada colheita foi realizada a mistura integral dos ejaculados (n=4 ejaculados) formando um “pool” de sêmen bovino.

2.2. *Processamento do sêmen*

Imediatamente após a colheita os ejaculados foram avaliados subjetivamente quanto a motilidade total e vigor espermático em microscopia de luz, e a concentração espermática total determinada através de câmara hematocitométrica de Neubauer.

Foram utilizados três diluidores para a congelação, o meio Tris-gema de ovo-frutose (TRIS; 30g Tris-[hidroximetilaminometano], 17g ácido cítrico, 12,5g de frutose, 0,20g sulfato de amikacina, 2mL de Orvum Est Pastum e 200ml de gema de ovo para 1000mL da solução) e o diluidor Botu-Bov® (BB; Botufarma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil) contendo 20% de gema de ovo cada (Controle positivo), e o meio Botu-Bov-Lecitina de Soja (BB-L; Botufarma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil), no qual a gema de ovo foi inteiramente substituída no diluidor BB por 1% de lecitina de soja. Todos os meios utilizados foram confeccionados em duas frações, sendo a fração-I isenta de crioprotetores e a fração-II contendo 14,2% de glicerol 87% (Merk Pharmaceutical, Darmstadt, Germany).

Após a colheita do sêmen cada amostra foi fracionada em três alíquotas iguais em tubos plásticos de 50 mL, pré-diluídas em meio TRIS, BB ou BB-L, de forma a atender metade da concentração necessária para 30×10^6 espermatozóides totais/palheta. Todas as amostras foram acondicionadas em balcão frigorífico a temperatura constante de 5°C por três horas. Decorrido o período inicial de refrigeração cada grupo experimental recebeu a segunda fração de meio diluidor de forma a obter a concentração final de 6,4% de glicerol. Decorrido o período de duas horas de glicerolização, as amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL (IMV® Technologies, L'Aigle Cedex, France) e criopreservadas em sistema automatizado de congelação (Digit Cool®, IMV® Technologies, L'Aigle Cedex, France), utilizando curva padrão para o sêmen bovino: de 4°C a -10°C, taxa de 5°C/minuto; de -10°C a -100°C, queda de 40°C/minuto; e de -100°C a -140°C, a 20°C/minuto (total de 8 minutos).

2.3. Experimento 1

O efeito do diluidor de criopreservação do sêmen foi avaliado laboratorialmente em duplicata através da análise computadorizada do movimento espermático (CASA, Hamilton Thorn Research IVOS-12, Beverly, USA) e avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal.

2.3.1. CASA

Após a descongelação em banho-maria a 37°C/30 segundos, o material previamente homogeneizado foi avaliado em câmara de Makler, pré-aquecida a 37°C, sendo observados cinco campos aleatórios e número mínimo de 150 espermatozóides por campo. Os parâmetros de movimento espermático avaliados corresponderam a motilidade espermática total (MOT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e velocidade rápida (Rap, %). Adicionalmente foi avaliada a proporção de partidas seminais apresentando motilidade espermática aceitável (AM, razão percentual entre o número de partidas seminais avaliadas que apresentaram resultados de MOT pós-descongelção $\geq 50\%$ sobre o número total de partidas analisadas).

2.3.2. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal

Para análise da viabilidade espermática foi utilizada a associação de sondas fluorescentes Iodeto de Propídeo (PI) e aglutinina de *Pisum sativum*, associada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA), de acordo com adaptações do protocolo proposto por Way et al., (1995) e Celeghini et al., (2008).

Uma alíquota de 50 μL de cada amostra seminal foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1.5 mL previamente aquecido a 37°C e contendo 50 μL de citrato de sódio 2.94%. Ao sêmen diluído foi adicionado 3 μL de PI (50 mg/ml em solução de PBS) e 30 μL de FITC-PSA (100 $\mu\text{g/ml}$ em solução de PBS), incubando-se as amostras

a 38°C por 10 minutos, previamente às avaliações sob lâmina e lamínula em microscopia de epifluorescência (LEICA®, Solms, Germany) através do filtro fluorescente com excitação de 540–525 nm e emissão de 605–655 nm. Para cada amostra foram avaliados 200 espermatozóides (aumento de 1000X) permitindo a identificação de 4 subpopulações espermáticas de acordo com o padrão de fluorescência emitido: IPMA: membrana plasmática e acrossomal íntegras; IPMDA: membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada; DPMIA: membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra; e DPMDA: lesão de membrana plasmática e acrossomo. Apenas a proporção de IPMA foi considerada para as análises estatísticas.

2.4. Experimento 2

As amostras seminais de cada grupo foram utilizadas para a inseminação artificial em tempo fixo de 349 vacas Nelore ou ½ Sangue Nelore, múltiparas e lactantes (60-90 dias pós-parto) mantidas exclusivamente em pastagem de *Brachiaria brizantha*, sendo oferecido sal mineral e acesso à água ad libitum. Os programas de sincronização e IATF foram realizados durante o verão do hemisfério sul (dezembro de 2007 a janeiro de 2008) em uma única fazenda comercial no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (latitude 20°14'26''; longitude 56°22'42'').

2.4.1. Protocolo de sincronização para a IATF

Em dia aleatório do ciclo estral (D0) todos os animais receberam 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin®/Farmavet, São Paulo, Brasil) associado ao dispositivo intravaginal de progesterona de 2° ou 3° uso (CIDR-B®, Pfiser Saúde Animal, São Paulo, Brasil). No “D8” os implantes foram retirados procedendo-se a administração de 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet-Schering Plough, Boxmeer, Netherlands), 25 mg de Dinoprost-Trometamina (Lutalyse®, Pfiser Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 0,6 mg de Cipionato de Estradiol (ECP®, Pfiser Saúde Animal, São Paulo, Brasil). A IATF foi realizada entre 52-56 horas após a retirada da fonte de progesterona (D10).

2.4.2 Exames ultrassonográficos

Todas as vacas foram submetidas a três exames ultrassonográficos ovarianos (Aloka-SSD 500, probe de 5 MHz, Tokyo, Japan), realizados no momento da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e no dia da IATF para determinar a taxa de sincronização ao protocolo, e dois dias após a inseminação artificial, para a constatação da ovulação, que foi definida como o desaparecimento de folículos ≥ 8.0 mm entre dois exames consecutivos (Gimenes et al., 2008). O diagnóstico de gestação foi realizado ultrassonograficamente 40 dias após a IATF, sendo considerado como positivo quando visualizada a vesícula embrionária e confirmado os batimentos cardíacos fetais.

2.5. Análise Estatística

Os resultados do Experimento 1 foram avaliados através do programa computacional Instat 5.0 (GraphPad Software Inc, USA), realizando-se a análise de variância (ANOVA) e teste “T de Student” para as variáveis que apresentaram distribuição normal, e os testes Mann-Whitney e Kruskal Wallis para as análises não paramétricas, assumindo-se $P < 0,05$ como nível de significância. Os resultados obtidos para a variável AM (%) foram avaliados através de análise de contingência utilizando-se o teste exato de Fisher ($P < 0,05$).

Os resultados de concepção gerados no Experimento 2 foram analisados através do programa computacional Proc Logistic 9.1.3 (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., 1999) realizando-se a análise de regressão logística múltipla. Foram incluídos no modelo os efeitos principais de escore de condição corporal (ECC) das vacas no primeiro dia do protocolo (escala de 1 a 5, onde 1= emaciada e 5=obesa, segundo Ayres et al., 2009) efeito do meio diluidor de criopreservação e efeito do lote de animais, além de suas interações, admitindo-se diferenças significativas quando $P < 0,05$ e tendências foram consideradas quando $0,05 < P \leq 0,10$.

3. Resultados

3.1. Experimento 1

Os resultados para a CASA e IPMA do sêmen bovino pós-descongelamento encontram-se sumarizados na Tabela.1., de acordo com o meio de criopreservação utilizado. Houve significativa variação e amplitude de resultados para os parâmetros motilidade total ($58,52 \pm 13,65^a$, $61,24 \pm 14,58^a$ e $31,43 \pm 17,73^b$, respectivamente para os meios TRIS, BB ou BB-L), progressiva (TRIS= $40,48 \pm 8,37^a$; BB= $49,24 \pm 11,43^b$; BB-L= $24,90 \pm 14,74^c$) e para o movimento rápido pós-descongelamento (TRIS= $52,57 \pm 12,53^a$; BB= $57,29 \pm 14,91^a$; e BB-L= $29,19 \pm 17,04^b$) em função do meio de criopreservação utilizado, evidenciando a superioridade de ambos os diluidores a base de 20% de gema de ovo sobre o BB-L ($P < 0,0001$). Embora os espermatozoides criopreservados em meio a base de lecitina de soja tenham apresentado maior retilinearidade e linearidade de movimento em relação às células congeladas em meio TRIS, foi observado uma menor viabilidade espermática pós-descongelamento ($P < 0,010$) em relação aos espermatozoides criopreservados em diluidores a base de gema de ovo.

3.2. Experimento 2

A taxa média de ovulação foi de 85,10% (297/349). Os índices gerais de concepção observados de acordo com o tratamento foram de 51,61% (64/124), 52,73% (58/110) e 30,43% (35/115) respectivamente, para amostras criopreservadas em diluidor TRIS, BB ou BB-L ($P < 0,05$).

Quando apenas as vacas que exibiram resposta ovulatória ao protocolo foram consideradas, os índices gerais de concepção foram de 59,26^a%, 62,57^a% e 36,46^b%, respectivamente para o pool de sêmen criopreservado em diluidor TRIS, BB ou BB-L (Tabela.2).

Tabela.1: Média e desvio padrão da média para os resultados da análise computadorizada do movimento espermático e avaliação da integridade estrutural dos espermatozoides bovinos criopreservados em meio Tris-gema de ovo-frutose (TRIS), Botu-Bov® (BB) ou Botu-Bov® à base de lecitina de soja (BB-L).

Parâmetros	TRIS	BB	BB-L	P-value
MOT (%)	58,52±13,65 ^a	61,24±14,58 ^a	31,43±17,73 ^b	<0,0001
AM (n/N)%	(16/20) ^a 80%	(16/20) ^a 80%	(4/20) ^b 20%	0,0004
MP (%)	40,8±8,37 ^a	49,24±11,43 ^b	24,90±14,74 ^c	<0,0001
VCL (µm/s)	145,37±23,80 ^a	130,31±9,56 ^a	143,42±28,21 ^a	0,0737
ALH (µm)	6,36±0,90 ^a	5,13±0,50 ^a	5,49±1,34 ^a	0,3497
STR (%)	80,76±3,46 ^a	86,62±3,17 ^b	85,95±5,07 ^b	<0,0001
LIN (%)	49,86±3,92 ^a	58,19±4,39 ^b	55,67±6,24 ^b	<0,0001
RAP (%)	52,57±12,53 ^a	57,29±14,91 ^a	29,19±17,04 ^b	<0,0001
IPMA (%)	8,21±5,52 ^a	9,88±8,11 ^a	2,53±2,00 ^b	0,0012

*MOT: motilidade espermática total; AM: motilidade espermática aceitável; MP: motilidade progressiva; VCL: velocidade curvilinear; ALH: amplitude do deslocamento lateral de cabeça; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; RAP: velocidade rápida; IPMA: integridade membrana plasmática e acrossomal.

Tabela.2: Taxa de concepção e probabilidade de prenhez após sincronização do ciclo estral e ovulação de acordo com o diluidor utilizado para criopreservação do sêmen bovino.

Diluidor	Concepção Ovuladas (%)	Probabilidade de Prenhez (95% intervalo confiança)	P-value
TRIS	59,26 ^a	---	
BB	63,37 ^a	-0,3814 a 0,8028	0,4855
BB-L	36,45 ^b	-1,4459 a -0,2784	0,0038

*TRIS: Tris-gema de ovo-frutose; BB: Botu-Bov®; BB-L: Botu-Bov® à base de lecitina de soja.

4. Discussão

A contribuição dos meios a base de lecitina de soja permanece incontestável quanto a diminuição dos riscos sanitários associados a utilização do leite de vaca e/ou gema de ovo nos diluidores de congelção de sêmen bovino, prevenindo, segundo Bousseau et al., (1998), a contaminação por bactérias ou micoplasmas.

No entanto, a efetividade dos diluidores a base de lecitina ainda permanece contraditória na literatura. Nos estudos anteriores em que foram reportados melhores resultados laboratoriais (Aires et al., 2003; Amirat et al., 2005; Hinsch et al., 1997) e índices de fertilidade similares ou superiores (Akhter et al., 2010; Bousseau et al., 1998; Gil et al., 2000) para amostras criopreservadas em meio a base de lecitina, foram empregados diluidores comerciais previamente concebidos para utilização do composto de origem vegetal como fonte primária de fosfolípidos. Como a composição dos meios diluidores exerce importante influência sobre a sobrevivência espermática (Chaveiro et al., 2006), torna-se improvável que os melhores resultados alcançados pelos diluidores comerciais a base de soja estejam vinculados unicamente ao efeito protetor do produto de origem vegetal. As formulações comerciais impossibilitam a realização de alterações específicas em sua composição (Paz et al., 2010) para que apenas o efeito da lecitina seja testado. Nesse sentido, como em nosso trabalho foram utilizadas as lipoproteínas da soja em substituição a gema de ovo convencionalmente utilizada no meio Botu-Bov®, diluidor com efetividade comprovada na congelção do sêmen bovino (Celeghini et al., 2008; Crespilho et al., 2006), foi possível a avaliação do efeito isolado do composto de origem vegetal (diluidor BB-L) sobre a viabilidade e fertilidade espermática.

Internacionalmente adota-se o valor de 50% de células móveis totais como parâmetro mínimo de qualidade espermática pós-descongelção (Zhang et al., 1999). Nesse sentido, apenas 20% das amostras seminais criopreservadas nos meios a base de gema de ovo não atingiram o limite mínimo de qualidade exigido para o sêmen bovino, enquanto que 80% das partidas criopreservadas em BB-L ($P=0,0004$) apresentaram qualidade espermática incompatível com a utilização em programas de IA, denotando o efeito significativo dos diluidores de congelção sobre a viabilidade do sêmen bovino. Os valores para a MOT, MP e RAP pós-descongelção foram em média 50%

menores para o sêmen bovino criopreservado em meio BB-L em relação às células processadas em TRIS ou BB (Tabela.1), resultados similares aos reportados por Celeghini et al., (2008), que demonstraram maior porcentagem de movimento total e progressivo para espermatozóides bovinos criopreservados em diluidor Botu-Bov® em relação às amostras congeladas em meio comercial composto por lecitina.

Os valores superiores para STR e LIN proporcionados pelo meio BB-L encontram-se em conformidade aos resultados reportados por Thun et al., (2002), que observaram uma menor viscosidade nos meios a base de lecitina em relação ao meio Tris-gema-citrato de sódio. Os glóbulos de gordura presentes nos meios a base de gema de ovo representam um segundo fator que pode interferir na progressividade do movimento, atuando como uma barreira física de colisão para os espermatozóides diluídos em TRIS, que acabam alterando sua trajetória natural. No entanto, não foram observadas diferenças para a STR e LIN quando comparados os meios BB ou BB-L, resultados que provavelmente se relacionam a origem comum dos diluidores (única diferença reside na fonte de lipoproteínas) e pelo fato do processo final de fabricação do meio Botu-Bov® incluir uma centrifugação que garante a clarificação da solução (informação pessoal da empresa fabricante).

A porcentagem de espermatozóides viáveis em uma amostra seminal pode ser definida pela quantidade de células que exibem estabilidade e integridade de membrana plasmática (Graham & Mocé, 2005, Graham, 2001) e acrossomal (Dayen et al., 2009), refletindo a efetividade e adequação dos protocolos de criopreservação. Em nosso trabalho foram observados resultados inferiores para IPMA associados à utilização do meio BB-L, demonstrando a superioridade da gema de ovo na preservação das membranas plasmáticas e acrossomais, em concordância a outros estudos desenvolvidos anteriormente (Muiño et al., 2007; Thun et al., 2002). Tais diferenças refletem a efetividade dos componentes presentes em cada diluidor, que conferem proteção durante o processamento (Celeghini et al., 2008). Os melhores índices de viabilidade pós-descongelção provavelmente se devem à ação das lipoproteínas e fosfolípidos presentes na gema de ovo que protegem as membranas espermáticas através do aumento da proporção colesterol/fosfolípidos dos espermatozóides, reduzindo a ocorrência do

choque térmico (Medeiros et al., 2002) e auxiliando na manutenção da viabilidade celular (Kulaksiz et al., 2010).

Diversos trabalhos reportaram a variabilidade marcante entre os índices de fertilidade tomados individualmente (“efeito touro”), justificando-se a utilização de “pool de sêmen” em ensaios experimentais que têm como objetivo comparar a efetividade *in vivo* de diferentes metodologias de preservação espermática. Os resultados da Tabela.2 demonstraram a superioridade dos diluidores a base de gema de ovo na obtenção de maiores índices de fertilidade, aumentando significativamente a probabilidade de C/IA do sêmen bovino congelado. Além da baixa efetividade da lecitina como fonte primária de lipoproteínas indispensáveis à proteção espermática durante a criopreservação, estudos conduzidos por Papa et al., (2010), postularam que os lipídeos da lecitina de soja podem se ligar irreversivelmente à membrana plasmática dos espermatozóides equinos, levando a déficits no processo de capacitação e, conseqüentemente, resultando em menores taxas de concepção. Essas possíveis alterações no mecanismo de incorporação dos fosfolipídeos podem explicar as diferenças apresentadas pelos diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja na preservação do sêmen bovino durante o processo de criopreservação.

Em conclusão, a lecitina de soja possui limitada ação protetora durante o processo de criopreservação, resultando em menor viabilidade espermática pós-descongelação e diminuição na C/IA quando comparada aos diluidores a base de gema de ovo. Os diluidores TRIS e Botu-Bov® foram mais efetivos para a congelação do sêmen de touros, mostrando-se mais vantajosos em relação ao meio BB-L pela produção de um maior número de amostras seminais adequadas para a utilização em programas de IA.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brasil) pelo auxílio financeiro.

***Trabalho científico número 2 destinado à revista Animal Reproduction Science
(Apêndice)***

**Fertilidade e viabilidade dos espermatozóides refrigerados a 5 °C por 48 horas:
Avaliação de diferentes diluidores para a manutenção do sêmen bovino no estado
líquido**

A.M. Crespilho^a, M.F. Sá Filho^b, M. Nichi^b, J.A. Dell'Aqua Jr^a, C.P. Freitas-
Dell'Aqua^a, P.N. Guasti^a, R.R. Maziero^a, F.O. Papa^{a*}

^a Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

^b Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

*Autor para correspondência. Tel: + 55 (14) 3811-6249

Email: papa@fmvz.unesp.br

Resumo

Foram conduzidos dois experimentos para comparar a efetividade de diferentes diluidores utilizados para a refrigeração do sêmen bovino em relação à manutenção da viabilidade espermática ao longo do processamento e aos índices de concepção na inseminação artificial em tempo-fixo (IATF). No *Experimento 1* amostras seminais de 20 touros da raça Nelore foram preservadas a 5°C por 48 horas utilizando os diluidores Tris-gema-frutose (TRIS-R) e Botu-Bov® (BB), ambos contendo 20% de gema de ovo, e Botu-Bov-Lecitina (meio BB-L), composto por 10% de lecitina de soja em substituição ao componente de origem animal. Estas amostras foram avaliadas nos momentos 6, 24 e 48 horas através da análise computadorizada do movimento espermático (CASA), integridade de membrana plasmática e acrossomal (IPMA) e índice de peroxidação lipídica (ng TBARS $\times 10^8$). No *Experimento 2* foi comparada a taxa de concepção (C/IA) proporcionada pelo sêmen bovino refrigerado por 48 horas em TRIS-R, BB ou BB-L ao sêmen convencionalmente criopreservado em TRIS-gema de ovo glicerol (TRIS-C, Grupo controle) através da IATF de 973 vacas Nelore multíparas, sincronizadas com dispositivo liberador de progesterona e estradiol. Embora nenhum dos diluidores utilizados tenha sido efetivo na manutenção da motilidade total, progressiva e integridade celular ao longo das 48 horas de refrigeração ($0,05 < P < 0,01$), o diluidor BB-L conferiu maior proteção contra o estresse oxidativo ($P < 0,05$) em relação aos meios a base de gema de ovo. A C/IA foi de 39,92^a, 25,32^b, 26,32^b e 33,33^{ab}, respectivamente para as amostras seminais preservadas em TRIS-C, TRIS-R, BB e BB-L. Conclui-se que os meios convencionalmente utilizados para criopreservação não conferem a proteção espermática necessária para manutenção do sêmen bovino refrigerado por 48 horas, embora a substituição da gema de ovo no meio a base de lecitina resulte em maior proteção espermática contra a peroxidação dos lipídica, resultando em índices de concepção comparáveis ao sêmen congelado.

Palavras chave: Sêmen bovino, gema de ovo, lecitina de soja, refrigeração espermática.

Abstract

Two experiments were conducted to compare the effectiveness of different semen extenders used for cooling bull semen, on the basis of ability to preserve sperm viability during processing, and conception rates in fixed-time artificial insemination programs (FTAI). In *Experiment 1*, ejaculates of 20 nelore bulls were cooled down to 5°C for 48 hours using either Tris-egg yolk-fructose (TRIS) or Botu-Bov® (BB), both extenders containing 20% egg yolk, or using the Botu-Bov-Lecithin extender (BB-L) in which 10% of soy lecithin has replaced the ingredient of animal origin. Semen samples were evaluated at 6, 24, and 48 hours of cooling for parameters such as sperm motility, plasma membrane and acrosomal integrity (IPMA, %) and index of lipid peroxidation (ng TBARS $\times 10^8$). In *Experiment 2*, the conception rate (CR) was assessed by utilizing either frozen-thawed semen in Tris extender (TRIS-C) or cooled semen in TRIS, BB or BB-L, to breed by FTAI a total of 973 multiparous Nelore cows that had been synchronized with insertion of intravaginal device containing progesterone. Although none of the extenders were effective in preserving total and progressive motility, and cellular integrity over the 48 hours of refrigeration ($0.05 < P < 0.01$), the extender BB-L conferred greater protection against oxidative stress ($P < 0.05$) than the egg yolk based extenders. The CR was 39.92^a, 25.32^b, 26.32^a and 33.33^{ab}, respectively, for cryopreserved semen samples (TRIS-C) and cooled samples in TRIS-R, BB and BB-L extenders. In conclusion, extenders conventionally used for bull semen cryopreservation do not confer the protection that would be required for 48 hours of colling. However, replacing egg yolk with lecithin in the cooling extenders resulted in greater protection against lipid peroxidation and also improved conception rates, which were comparable to the commonly achieved rates in FTAI programs that use frozen-thawed semen.

Key words: Bull semen, egg yolk, soy lecithin, cooled refrigeration.

1. Introdução

A despeito da grande importância e da ampla difusão do sêmen congelado para a produção de bovinos, poucos avanços surgiram nas últimas décadas em relação ao desenvolvimento de novos meios diluidores, sendo observada a queda significativa na integridade e funcionalidade dos espermatozóides quando submetidos aos protocolos convencionalmente utilizados para criopreservação (Celeghini et al., 2008). A congelação é responsável pelo decréscimo de 50% a 60% na motilidade espermática (Chaveiro et al., 2006; Gravance et al., 1998; Thomas et al., 1998), levando a diversas alterações bioquímicas e estruturais que podem abranger os diferentes compartimentos anatômicos da célula espermática, causando a morte da maior parte dos espermatozóides durante o processamento (Yoshida, 2000).

A queda na viabilidade e fertilidade dos espermatozóides relacionada à criopreservação tem motivado o desenvolvimento de novos estudos para abordar a preservação do sêmen na forma líquida em diversas espécies (bovina: Bucker et al., 2009, Nair et al., 2006; bubalina: Adeel et al., 2009; eqüina: Brinsko et al., 2003; caprina: Purdy et al., 2010; ovina: O'Hara et al., 2010). A principal vantagem desse tipo de processamento representa a prevenção das injúrias relacionadas ao processo de congelação, garantindo uma maior viabilidade espermática que por sua vez permite a redução da dose inseminante e otimização de reprodutores de alto mérito genético em programas de inseminação artificial (Bucker et al., 2009; Verberckmoes et al., 2005).

O sucesso da preservação do sêmen na forma líquida depende da diminuição reversível da motilidade e atividade metabólica dos espermatozóides que pode ser alcançada através da refrigeração (Yoshida, 2000). Considerando que o tempo de armazenagem influencia a viabilidade do sêmen refrigerado (Batellier et al., 2001), uma das principais indicações para o uso do sêmen bovino conservado sob refrigeração são os programas de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF). Como os protocolos permitem a inseminação de um grande número de animais em um curto intervalo de tempo (Bucker et al., 2009), pode-se incorporar a tecnologia de refrigeração do sêmen mesmo em detrimento a baixa longevidade destas amostras. Nesse sentido, o sêmen bovino refrigerado representa uma alternativa promissora ao sêmen criopreservado,

podendo atuar para o aumento das taxas de concepção (C/IA) e diminuição do custo final dos programas de IATF.

No entanto, como a grande maioria dos trabalhos envolvendo o sêmen bovino refrigerado são anteriores ao advento dos atuais meios diluidores e dos protocolos de sincronização do ciclo estral em bovinos (Almquist & Wickersham, 1962; Blackshaw et al., 1957; Foote, 1970; Foote et al., 1962; O'Dell et al., 1959), questões como a relação entre o tempo de estocagem e a queda na viabilidade espermática, e a efetividade dos meios adaptados da criopreservação para utilização na manutenção do sêmen refrigerado, permanecem sem uma definição clara na literatura.

Um dos principais fatores associados ao declínio na motilidade e fertilidade do sêmen estocado sob refrigeração é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), que ocorre como consequência normal do metabolismo espermático, resultando na queda irreversível na qualidade do sêmen refrigerado (Çoian et al., 2010). Considerando que os espermatozoides têm uma limitada capacidade de resistência ao estresse oxidativo (Nichi et al., 2006), torna-se imprescindível que os meios diluidores possuam componentes que minimizem o efeito deletério das EROS.

Esse estudo foi conduzido com o objetivo de testar a efetividade de diferentes diluidores utilizados para a criopreservação espermática quando empregados para a manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen bovino na forma líquida sob refrigeração, testando-se a hipótese de que a utilização do sêmen refrigerado por 48 horas pode aumentar a taxa de concepção (C/IA) dos programas de inseminação artificial em tempo-fixo de vacas de corte, sincronizadas com protocolos a base de progesterona e estradiol.

2. Material e Métodos

2.1. Colheita do sêmen

Foram utilizados 20 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade ente 24 e 30 meses, obtendo-se as amostras de sêmen através de eletroejaculação. No

Experimento 1 foram obtidas duas amostras de cada reprodutor (a primeira destinada a triagem inicial da qualidade seminal e uma segunda para execução das etapas experimentais). Foram estabelecidos como critérios mínimos de qualidade para inclusão no trabalho a motilidade total do sêmen fresco superior a 70%, porcentagem de defeitos maiores inferior a 20%, menores 20% e defeitos totais inferior a 30%.

Para o *Experimento 2* foram selecionados cinco reprodutores baseando-se em características fenotípicas próprias da raça, submetendo cada animal a colheitas seminais seriadas por eletroejaculação (intervalo de 2 dias entre cada tentativa) durante 15 dias (período de nivelamento biológico e adaptação ao novo manejo) antes do início das colheitas destinadas aos programas de inseminação artificial.

2.2. Processamento do sêmen

Imediatamente após a colheita, os ejaculados foram avaliados subjetivamente quanto à motilidade total e vigor espermático em microscopia de luz, determinando-se a concentração espermática total através de câmara hematocitométrica de Neubauer.

2.2.1. Experimento 1

Foram utilizados três diluidores para a refrigeração do sêmen, sendo estes: Tris gema de ovo frutose (TRIS; 30g Tris-[hidroximetilaminometano], 17g ácido cítrico, 12,5g de frutose, 0,20g sulfato de amikacina, 2mL de Orvum Est Pastum e 20% de gema de ovo); Botu-Bov® (BB; Botufarma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil) também contendo 20% de gema de ovo; e Botu-Bov-Lecitina de Soja (BB-L; Botufarma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil), no qual a gema de ovo foi inteiramente substituída no diluidor BB por 1% de lecitina. Todos os meios utilizados foram confeccionados em fração única isenta do crioprotetor glicerol.

Cada amostra de sêmen foi fracionada imediatamente após a colheita em três alíquotas iguais, depositadas em tubos plásticos de 50 mL, diluídas em meio TRIS, BB ou BB-L e envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL (IMV® Technologies, L'Aigle

Cedex, France), respeitando-se a concentração final de 30×10^6 espermatozóides totais/palheta. Todas as amostras foram acondicionadas em caixas de transporte modelo Botutainer® (Botufarma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil), utilizadas para a refrigeração passiva dos espermatozóides bovinos à temperatura constante de 5°C por 48 horas (Figura 1). O efeito de cada meio de refrigeração foi avaliado laboratorialmente em duplicata através da análise computadorizada do movimento espermático (CASA, Hamilton Thorn Research IVOS-12, Beverly, USA), avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (IPMA, %) e quantificação das substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (ng TBARS $\times 10^8$).

2.2.1.1. CASA

As amostras foram analisadas nos momentos 6, 24 e 48 horas do processo de refrigeração. Para cada avaliação foram utilizadas duas palhetas por grupo, depositadas em tubos plásticos de microcentrífuga de 1,5 mL, pré-aquecidas em “banho-seco” a 37°C por 10 minutos, previamente às análises.

Alíquotas de 10 μ L de sêmen homogeneizado foram avaliadas através da técnica de análise computadorizada do movimento espermático (CASA, Hamilton Thorn IVOS12, Beverly, USA) em câmara de Makler pré-aquecida a 37°C, sendo avaliado o número mínimo de cinco campos aleatórios contendo o número mínimo de 150 espermatozóides/campo.

Os parâmetros de movimento espermático gerados pela técnica CASA e avaliados no estudo corresponderam a motilidade espermática total (MOT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilinear (VCL, μ m/s), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μ m), linearidade (LIN, %) e velocidade rápida (Rap, %).

2.2.1.2. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal

Para análise da viabilidade espermática foi utilizada a associação de sondas fluorescentes Iodeto de Propídeo (PI) e aglutinina de *Pisum sativum* associada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA), de acordo com adaptações dos protocolos originalmente propostos por Way et al., (1995) e Celeghini et al., (2008).

Uma alíquota de 50 μ L de cada amostra foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, previamente aquecido a 37°C e contendo 50 μ L de citrato de sódio 2,94%. Ao sêmen diluído foi adicionado 3 μ L de PI (50 mg/ml em solução de PBS) e 30 μ L de FITC-PSA (100 μ g/ml em solução de PBS), incubando-se as amostras a 38°C por 10 minutos, previamente às avaliações sob lâmina e lamínula em microscopia de epifluorescência (LEICA®, Solms, Germany) através da utilização de filtro fluorescente com excitação de 540–525 nm e emissão de 605–655 nm. Para cada amostra foram avaliados 200 espermatozóides (aumento de 1000 $\times$) permitindo a identificação de 4 subpopulações espermáticas de acordo com o padrão de fluorescência emitido: IPMA: membrana plasmática e acrossomal íntegras; IPMDA: membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada; DPMIA: membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra; e DPMDA: lesão de membrana plasmática e acrossomo. Apenas a proporção de IPMA (%) foi considerada para as análises estatísticas.

2.2.1.3. Quantificação das substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Amostras de sêmen refrigerado foram centrifugadas a 2500 $\times$ g por 10 minutos, retirando-se 600 μ L da solução sobrenadante que foi depositada em novos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Para cada amostra foi adicionado 600 μ L (1:1) de ácido tricloroacético a 10% (TCA; 100g em 1000 mL de água) previamente confeccionado e estocado a temperatura de 5°C, utilizado para provocar a precipitação das proteínas da solução sobrenadante, segundo Nichi et al., (2007). Todas as amostras foram congeladas em freezer convencional e armazenadas a temperatura de -18°C.

Após a descongelação em temperatura ambiente as amostras foram novamente centrifugadas (2500 $\times$ g por 10 minutos), retirando-se 1 mL da solução sobrenadante que

foi depositada em tubo de vidro de 5 mL, adicionando 1mL de ácido Tiobarbitúrico 1% (diluído em 0,05M de hidróxido de sódio); a nova solução foi transferida para banho-maria a 100°C permanecendo por 20 minutos. Após a fervura, as amostras foram refrigeradas a 0°C em recipiente com gelo. As substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS) foram quantificadas usando espectrofotômetro (U-2001 Hitachi High Technologies America Inc., San Jose, CA, USA), calibrado para captação do comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram comparados a curva previamente estabelecida preparada com concentração padrão de malondialdeído, que representa uma dos principais produtos do estresse oxidativo. O índice de peroxidação lipídica foi expresso como $\text{ng de TBARS} \times 10^8$ espermatozóides.

2.2.2. Experimento 2

Cada amostra foi fracionada em quatro alíquotas que foram colocadas em tubos plásticos de 50 mL, diluídas em meio TRIS, BB ou BB-L (segundo a mesma metodologia empregada no *Experimento 1*) ou em meio Tris-gema de ovo-frutose utilizado para a criopreservação seminal (TRIS-C, Grupo Controle), apresentando a concentração final de 6,4% de glicerol, segundo Crespilho et al., (2006). Após o envase, as amostras foram refrigeradas seguindo a mesma metodologia empregada no experimento anterior. As partidas seminais do grupo TRIS-C foram resfriadas em geladeira digital (Minitube®, Tiefenbach, Germany) a temperatura constante de 5°C por 4 horas, colocadas a 5 cm da superfície do nitrogênio líquido (N_2) em caixa de isopor convencional de 40 litros por 20 minutos, congeladas por imersão direta no N_2 e mantidas em botijão criobiológico.

A viabilidade do sêmen bovino congelado e refrigerado foi estimada no dia de sua utilização no programa de IATF através da avaliação subjetiva da motilidade espermática total (>50%) e porcentagem de defeitos morfológicos totais (<20%).

2.3. Protocolo de sincronização para inseminação artificial em tempo-fixo

As partidas de cada grupo foram utilizadas para a inseminação artificial em tempo fixo de 973 vacas Nelore ou ½ Sangue Nelore, múltiparas e lactantes (60-80 dias pós-parto), mantidas exclusivamente em pastagem de *Brachiaria brizantha* ou *Brachiaria decumbens*, sendo oferecido sal mineral e acesso à água *ad libitum*. Os programas de sincronização e IATF foram realizados durante o início do verão no hemisfério sul (dezembro de 2008) em uma única fazenda comercial no Estado de Mato Grosso (latitude 13°39'50''S; longitude 59°47'31''O).

Em dia aleatório do ciclo estral (D0) todos os animais receberam 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin®/Farmavet, São Paulo, Brasil) associado ao dispositivo intravaginal de progesterona de 1° ou 2° uso (CIDR-B®, Pfiser Saúde Animal, São Paulo, Brasil). No “D7” foi realizada a aplicação de 12,5 mg de Dinoprost-Trometamina (Lutalyse®, Pfiser, Brasil). A remoção dos implantes ocorreu no “D9” junto à administração de 0,5 mg de Cipionato de Estradiol (ECP®, Pfiser Saúde Animal, São Paulo, Brasil). No mesmo dia da retirada dos implantes foi efetuada a remoção temporária dos bezerros que perdurou até o momento da IATF (“D11” do protocolo hormonal). As inseminações foram realizadas de 48 a 52 horas após a retirada dos dispositivos de progesterona, de acordo com Meneghetti et al., (2009).

2.4. Análise Estatística

Os resultados do *Experimento 1* foram avaliados através do programa computacional Instat 5.0 (GraphPad Software Inc, USA), realizando-se a análise de medidas repetidas (Two-Way ANOVA) e teste “T” de Student para avaliação das variáveis espermáticas ao longo do período de refrigeração e para comparação dos diferentes tratamentos nos momentos 6, 24 e 48 horas, respectivamente. Os dados gerados no teste de reação ao ácido Tiobarbitúrico foram previamente transformados através da conversão em Log₁₀, recebendo o mesmo tratamento estatístico das demais variáveis laboratoriais. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

Os resultados de concepção gerados no *Experimento 2* foram analisados através do programa computacional Proc Logistic 9.1.3 (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., Cary, USA), realizando-se a análise de regressão logística multivariada. No modelo inicial foram incluídos os efeitos principais de escore de condição corporal (ECC) das vacas no primeiro dia do protocolo (escala de 1 a 5, onde 1= emaciada e 5=obesa, segundo Ayres et al., 2009), efeito do tratamento/meio diluidor, influência do reprodutor doador de sêmen, efeito do lote de animais, além de suas interações. As variáveis principais foram eliminadas no modelo final de regressão (baseado no critério de Wald quando $P > 0,20$), sendo considerado apenas o efeito da metodologia de preservação seminal. Os valores ajustados para “Odds Ratio” (OR) e intervalo de confiança (95%) foram gerados através da análise de regressão logística e os resultados apresentados como probabilidade de prenhez na IATF, admitindo-se diferenças significativas quando $P < 0,05$ e tendências foram consideradas quando $0,05 < P \leq 0,1$.

3. Resultados

3.1. Experimento 1

Como as amostras seminais dos 20 reprodutores foram aprovadas na triagem inicial de qualidade, o *Experimento.1* contou com a utilização de 20 ejaculados provenientes de diferentes touros da raça Nelore, e os resultados foram expressos na *Tabela 1*, *Figura 2* e *Figura 3*. A motilidade total e a porcentagem de espermatozóides desempenhando movimento rápido não diferiram entre os diferentes tratamentos na avaliação realizada às 6 horas do período de estocagem, não sendo evidenciada interação entre a curva inicial de refrigeração do sistema Botutainer® e os meios diluidores em teste ($P = 0,1921$ e $P = 0,3001$, respectivamente). No entanto, houve a queda na MOT ao longo do processamento ($0,01 < P < 0,05$), independente do meio diluidor utilizado: TRIS = $82,9 \pm 9,0^a$, $74,7 \pm 10,1^b$, $69,5 \pm 13,4^b$; BB = $82,9 \pm 8,2^a$, $75,4 \pm 9,0^{ab}$, $73,7 \pm 12,2^b$; BB-L = $73,8 \pm 27,7^a$, $50,7 \pm 30,6^{ab}$, $46,2 \pm 32,6^b$, respectivamente para as amostras avaliadas nos momentos 6, 24 e 48 horas. A queda significativa na MOT nas primeiras 24 horas de refrigeração foi evidenciada apenas para amostras diluídas em TRIS ($P < 0,05$).

As variáveis relacionadas à progressividade de movimento (MP e LIN) diferiram entre os diferentes diluidores em todos os momentos avaliados (Tabela.1). Tais parâmetros também sofreram variação quando cada meio foi avaliado ao longo de todo o período de manutenção a frio, sendo observadas as maiores taxas de queda para as amostras de sêmen refrigeradas no diluidor TRIS (MP, $P<0,0001$; LIN, $P=0,0001$).

A integridade de membrana plasmática e acrossomal apresentou queda significativa ao longo do período de refrigeração ($P<0,0001$), sendo observado o declínio mais acentuado para todos os grupos estudados nas primeiras 24 horas de processamento ($P<0,0001$), mantendo-se estável entre 24 a 48 horas. Menores taxas de IPMA foram registradas para o sêmen preservado em BB-L em todos os momentos experimentais em comparação ao diluidor BB, e nos momentos 24 e 48 horas quando comparado ao meio TRIS.

A peroxidação de lipídeos foi menor para as amostras preservadas em BB-L em relação ao meio BB no momento 6 horas ($576,57\pm404,07^a$ vs $1014,16\pm907,15^b$, respectivamente; $P=0,0272$) e também inferior aos diluidores BB e TRIS nos momentos 24 (BB-L= $447,60\pm174,65^a$; BB= $1470,69\pm1349,88^b$; TRIS= $1589,56\pm2285,03^b$; $P=0,0023$) e 48 horas ($408,11\pm159,78^a$; $1515,29\pm1104,83^b$; $1794,80\pm1401,25^b$, respectivamente para BB-L, BB e TRIS; $P=0,0011$). O diluidor BB-L também foi mais efetivo na prevenção do estresse oxidativo ao longo das 48 horas de refrigeração, não sendo observadas diferenças para os valores de TBARS entre os momentos 6, 24 ou 48 horas quando utilizado o meio a base de lecitina de soja. Entretanto, os valores de TBARS aumentaram significativamente no decorrer do período de refrigeração quando os diluidores BB ($P=0,0403$) ou TRIS ($P=0,0171$), ambos apresentando 20% de gema de ovo em sua composição, foram empregados para manutenção do sêmen bovino na forma líquida.

TABELA.1: Efeito de diferentes diluidores (média $\pm$ desvio padrão da média) utilizados para refrigeração passiva dos espermatozoides bovinos sobre as características de movimento espermático e integridade de membrana plasmática e acrossomal (IPMA, %) ao longo de 48 horas de manutenção a 5°C.

Parâmetros	TRIS			BB			BB-L		
	6	24	48	6	24	48	6	24	48
MOT (%)	82,9 $\pm$ 9,0 ^{ab}	74,7 $\pm$ 10,1 ^{ab}	69,5 $\pm$ 13,4 ^{ab}	82,9 $\pm$ 8,2 ^{ab}	75,4 $\pm$ 9,0 ^{ab}	73,7 $\pm$ 12,2 ^{ab}	73,8 $\pm$ 27,7 ^{ab}	50,7 $\pm$ 30,6 ^{ab}	46,2 $\pm$ 32,6 ^{ab}
MP (%)	52,8 $\pm$ 11,0 ^{ab}	43,3 $\pm$ 9,6 ^{ab}	38,1 $\pm$ 9,5 ^{ab}	66,0 $\pm$ 8,2 ^{ab}	58,0 $\pm$ 10,3 ^{ab}	56,6 $\pm$ 11,7 ^{ab}	56,4 $\pm$ 22,2 ^{ab}	37,7 $\pm$ 23,9 ^{ab}	33,8 $\pm$ 25,8 ^{ab}
VCL (μ m/s)	152,8 $\pm$ 28,4 ^{ab}	170,7 $\pm$ 27,4 ^{ab}	167,8 $\pm$ 27,0 ^{ab}	116,3 $\pm$ 34,1 ^{ab}	125,1 $\pm$ 18,7 ^{ab}	135,7 $\pm$ 29,4 ^{ab}	149,5 $\pm$ 25,4 ^{ab}	153,2 $\pm$ 76,9 ^{ab}	139,3 $\pm$ 57,2 ^{ab}
ALH (μ m)	6,3 $\pm$ 1,3 ^{ab}	7,1 $\pm$ 1,0 ^{ab}	6,9 $\pm$ 0,8 ^{ab}	4,3 $\pm$ 0,8 ^{ab}	4,8 $\pm$ 0,7 ^{ab}	5,2 $\pm$ 1,1 ^{ab}	5,3 $\pm$ 0,8 ^{ab}	5,8 $\pm$ 2,9 ^{ab}	10,4 $\pm$ 7,3 ^{ab}
LIN (%)	46,5 $\pm$ 5,6 ^{ab}	42,5 $\pm$ 3,0 ^{ab}	41,5 $\pm$ 2,7 ^{ab}	61,9 $\pm$ 7,4 ^{ab}	57,6 $\pm$ 6,5 ^{ab}	56,3 $\pm$ 6,8 ^{ab}	55,8 $\pm$ 6,3 ^{ab}	49,6 $\pm$ 13,3 ^{ab}	49,6 $\pm$ 14,8 ^{ab}
RAP (%)	79,6 $\pm$ 9,6 ^{ab}	71,4 $\pm$ 10,4 ^{ab}	65,6 $\pm$ 14,5 ^{ab}	79,7 $\pm$ 8,3 ^{ab}	71,6 $\pm$ 10,1 ^{ab}	69,2 $\pm$ 12,7 ^{ab}	71,8 $\pm$ 28,2 ^{ab}	48,5 $\pm$ 30,4 ^{ab}	45,3 $\pm$ 31,8 ^{ab}
IPMA (%)	18,7 $\pm$ 9,1 ^{ab}	4,0 $\pm$ 3,2 ^{ab}	3,4 $\pm$ 3,7 ^{ab}	20,7 $\pm$ 8,0 ^{ab}	4,2 $\pm$ 2,3 ^{ab}	4,2 $\pm$ 3,8 ^{ab}	12,8 $\pm$ 8,8 ^{ab}	2,3 $\pm$ 1,6 ^{ab}	2,2 $\pm$ 2,8 ^{ab}

^{a,b} Letras minúsculas na mesma linha indicam as diferenças estatísticas entre os tratamentos para cada momento avaliado. ^{A,B} Letras maiúsculas na mesma linha comparam o desempenho de cada diluidor ao longo das 48 horas de refrigeração. MOT=Motilidade espermática total; MP=Motilidade espermática progressiva; VCL=Velocidade curvilinear; ALH=Amplitude do batimento de cabeça; LIN=Linearidade; RAP=Espermatozoides rápidos; IMPA = integridade de membrana plasmática e acrossomal.

TRIS= Tris-gema de ovo-frutose.

BB= Botu-Bov®.

BB-L= Botu-Bov® à base de lecitina de soja.

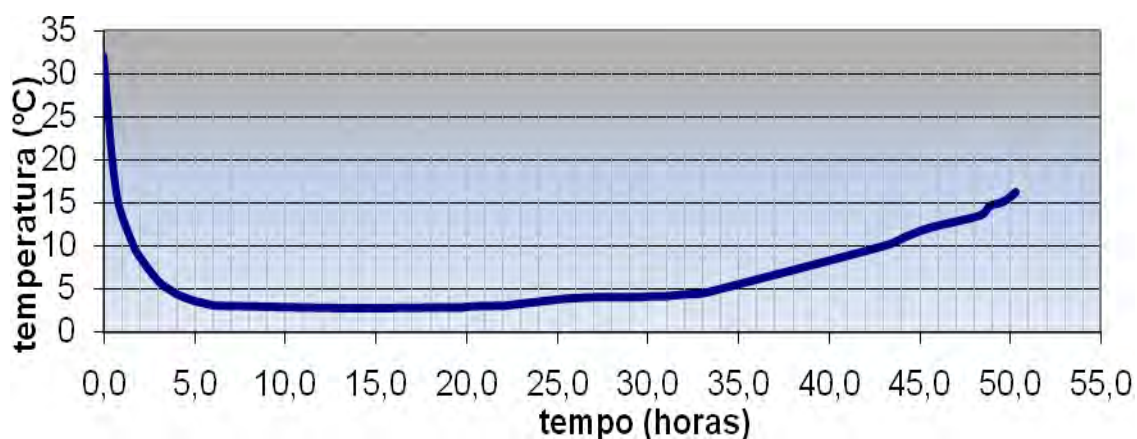


Figura.1: Curva de refrigeração da caixa Botutainer® utilizada para o transporte e manutenção do sêmen bovino.

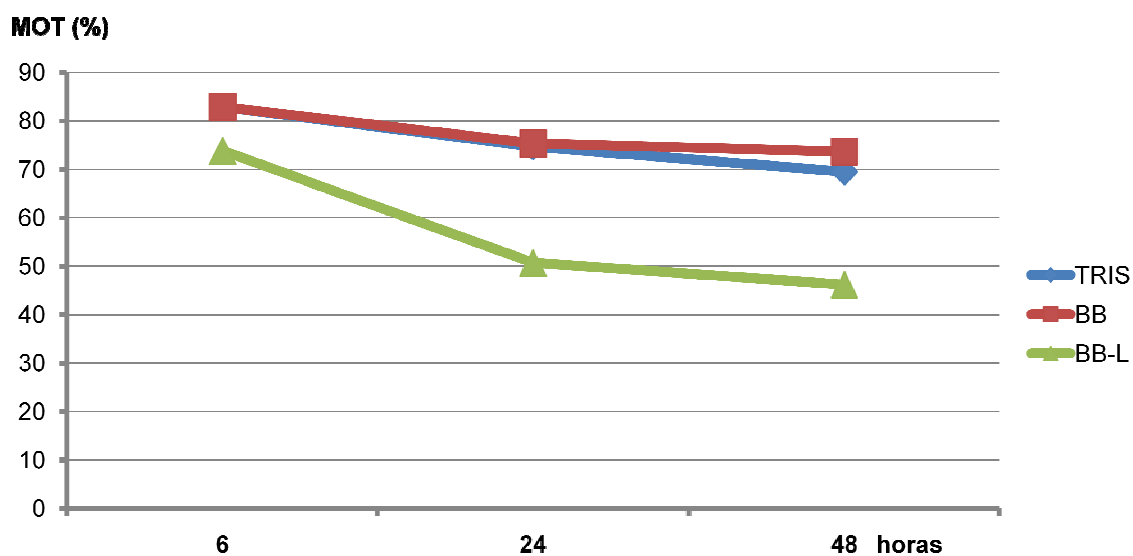


Figura.2: Efeito do meio diluidor sobre a motilidade espermática total (MOT,%) ao longo de 48 horas de refrigeração a 5°C.

TRIS= Tris-gema de ovo-frutose.

BB= Botu-Bov®.

BB-L= Botu-Bov® lecitina de soja.

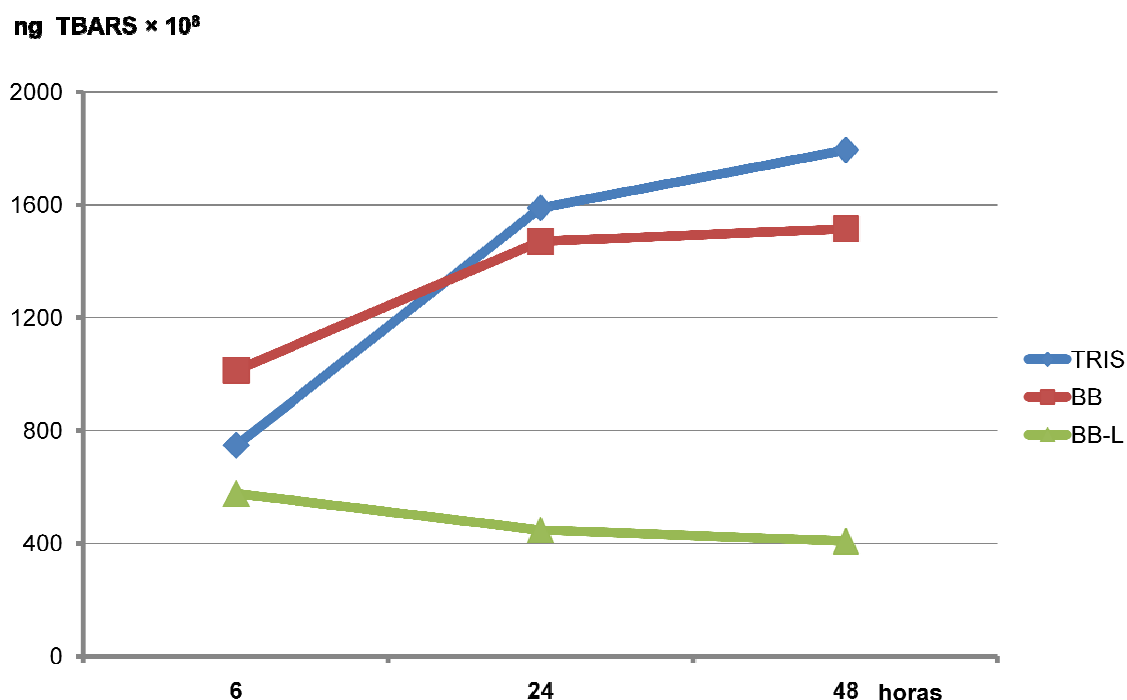


Figura.3: Efeito do tempo de preservação seminal sob refrigeração de 5°C sobre a peroxidação lipídica avaliada indiretamente através da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ng TBARS × 10⁸).

TRIS= Tris-gema de ovo-frutose.

BB= Botu-Bov®.

BB-L= Botu-Bov® lecitina de soja.

3.2. Experimento 2

No primeiro modelo estatístico proposto foi observada a influência significativa do reprodutor ($n=5$ touros utilizados, $P=0,0007$), lote dos animais na fazenda ($P<0,0001$) e meio diluidor/metodologia de preservação seminal ($P=0,0002$) sobre C/IA, não sendo observada, no entanto, interações entre os diluidores e os touros ($P=0,7967$) ou diluidor e lote de vacas ($P=0,1143$).

A avaliação do efeito isolado do meio diluidor revelou taxas de concepção de 39,92^a, 25,32^b, 26,32^b, e 33,33^{ab}, respectivamente, para as amostras seminais preservadas em diluidor TRIS-C, TRIS-R, BB e BB-L (Tabela 2), revelando maior probabilidade de prenhez associada ao meio BB-L para refrigeração seminal em relação às demais metodologias de conservação do sêmen bovino na forma líquida.

TABELA.2: Taxa de concepção e probabilidade de prenhez após sincronização do ciclo estral e ovulação em função da metodologia e do diluidor utilizado para preservação do sêmen bovino.

Diluidor	Prenhez n/n (%)	Probabilidade de Prenhez (95% intervalo confiança)	P-value
TRIS-C	101/253 (39,92) ^a	Referência	---
TRIS-R	59/233 (25,32) ^b	0.479 (0.318-0.721)	0.0004
Botu-Bov®	65/247 (26,32) ^b	0.518 (0.347-0.772)	0.0013
Botu-Bov-L	80/240 (33,33) ^{ab}	0.748 (0.506-1.106)	0.1457

Letras diferentes (^{a,b}) na mesma coluna indicam as diferenças estatísticas encontradas.
 TRIS-C= Tris-gema de ovo-frutose empregado para a criopreservação espermática.
 TRIS-R= Tris-gema de ovo-frutose utilizado na refrigeração do sêmen.
 BB= Botu-Bov®.
 BB-L= Botu-Bov® lecitina de soja.

4. Discussão

Todas as variáveis relacionadas à motilidade e progressividade de movimento do sêmen bovino apresentaram queda significativa no decorrer das 48 horas de refrigeração independente do meio diluidor utilizado, de acordo com os resultados de Verberckmoes et al. (2005). Embora a diminuição na temperatura promova a queda significativa no metabolismo espermático, reduzindo às taxas de frutólise e consumo de oxigênio (Blackshaw et al., 1957), a qualidade dos espermatozóides diminui ao longo do período de refrigeração, independentemente dos meios diluidores, taxa de diluição ou condições de estocagem, segundo O'Hara et al., (2010).

No entanto, a temperatura exerce influência significativa sobre a sobrevivência espermática ao longo do período de refrigeração (Batellier et al., 2002). A manutenção dos espermatozóides em condições sub-ótimas de temperatura leva a queda na qualidade e motilidade espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal e aumento da peroxidação de lipídeos de membrana (Purdy et al., 2010). Nesse sentido, a curva de refrigeração utilizada em nosso trabalho foi de aproximadamente

0,13°C/minuto até a temperatura de estabilização de 5°C, alcançada após 4 horas de processamento. Entretanto, o sistema Botutainer® exibe uma diminuição na velocidade de refrigeração iniciada a partir da temperatura de 15 °C até 5°C, promovendo curvas em torno de 0,05 a 0,1 °C/minuto. Como a faixa crítica de temperatura para os espermatozóides das diferentes espécies animais ocorre entre 15 °C a 5°C em função do rearranjo dos fosfolipídeos de membrana plasmática e possibilidade do “choque frio” (Watson, 2000), curvas de refrigeração mais lentas foram associadas à maior preservação da viabilidade e fertilidade do sêmen bovino (Januskauskas et al., 1999). Assim, a adequação da curva de refrigeração realizada justifica os resultados similares em termos de MOT e RAP nas primeiras 6 horas do período de estocagem, independente do diluidor empregado.

As diferenças encontradas para os parâmetros MP, VCL, ALH e LIN comparando-se os diferentes diluidores em cada momento experimental foram semelhantes a outros estudos que avaliaram os mesmos diluentes para a criopreservação do sêmen bovino. Crespilho et al., (2006), observaram maior proporção de movimento progressivo e linearidade, associados a menores índices na ALH e VCL pós-descongelção para espermatozóides bovinos criopreservados em meio Botu-Bov® em relação àqueles processados em meio Tris-gema de ovo-frutose, concluindo que tais diferenças se devem a menor viscosidade do meio Botu-Bov® associada a maior preservação da viabilidade espermática durante a congelção. Maior proporção de MOT, MP, VCL, ALH e LIN pós-descongelção também foram associados à utilização do diluidor Botu-Bov® contendo 20% de gema de ovo em relação ao meio Bioxcell® composto por lecitina de soja (Celeghini et al., 2008). Nesse sentido, constatou-se que o meio BB conferiu maior proteção espermática quando comparado ao diluente TRIS utilizado para a refrigeração, a exemplo dos resultados anteriormente observados para a criopreservação do sêmen bovino.

As amostras refrigeradas em BB-L apresentaram resultados intermediários quanto aos parâmetros de movimento avaliados, observando-se menores índices de MP nos momentos 24 e 48 horas em relação ao TRIS e, no entanto, maior preservação da linearidade espermática ($P < 0,05$) em todos os momentos experimentais. A qualidade cinética promovida pelo diluidor BB-L provavelmente se relaciona às propriedades de

seus componentes específicos que são os mesmos que constituem o meio Botu-Bov® (exceto pela substituição da gema de ovo por lecitina de soja).

Embora tenha sido observada a queda significativa na MOT, RAP e IPMA ao longo do processamento, independente do meio diluidor utilizado, tais parâmetros foram inferiores no momento 6 horas quando utilizado o meio BB-L em comparação aos demais tratamentos. A lecitina de soja tem sido utilizada como uma fonte alternativa de fosfolipídios para incorporação aos diluidores de congelamento do sêmen bovino (Amirat et al., 2005; Thun et al., 2002), ovino (Gil et al., 2003; Sharafi et al., 2009) e eqüino (Papa et al., 2009), substituindo os compostos de origem animal. No entanto, além da grande divergência entre os diferentes estudos sobre a efetividade da lecitina como substituto da gema de ovo nos diluidores de criopreservação (Leite et al., 2010), não existem trabalhos disponíveis na literatura abordando a utilização do composto vegetal para manutenção do sêmen bovino refrigerado.

Paz et al., (2010), testando diferentes fontes e concentrações de lecitina, obtiveram resultados similares de preservação do sêmen ovino a 5°C por 6 horas (baseado nos parâmetros de motilidade total e integridade de membrana plasmática) quando comparado o diluidor a base de 2% de lecitina ao grupo controle apresentando gema de ovo. Em contrapartida, Paulenz et al., (2002), observaram maior preservação da motilidade, integridade de membrana plasmática e de acrossomo para os espermatozoides ovinos armazenados na forma líquida por períodos superiores a 30 horas em meio Tris-gema de ovo em relação aos meios a base de leite ou citrato de sódio, independente da temperatura de manutenção. Resultados superiores também foram associados à utilização da gema de ovo, não apenas para a manutenção dos espermatozoides bovinos na forma líquida, como também para a criopreservação (Blackshaw et al., 1957; Foote, 1970). Nesse sentido, especula-se que os melhores resultados para a MOT, MP e IPMA observados para o sêmen bovino pós-descongelamento foram relacionados a maior qualidade das lipoproteínas presentes na gema de ovo em relação às que compõe a lecitina de soja (Leite et al., 2010), permitindo inferir que tal superioridade também poderia ser extrapolada para os meios utilizados para refrigeração do sêmen bovino.

O acúmulo de compostos tóxicos relacionados à morte celular e os produtos gerados pelo metabolismo espermático, incluindo as espécies reativas de oxigênio, representam os principais fatores que levam a inevitável redução na viabilidade espermática ao longo do período de refrigeração (Nair et al., 2006), resultando na queda irreversível da motilidade espermática do sêmen bovino refrigerado (Almqvist & Wickersham, 1962; Foote, 1970; Foote, 1962).

O estresse oxidativo foi indiretamente avaliado em nosso trabalho através da mensuração do malondialdeído (MDA), um dos principais produtos da peroxidação dos lipídeos de membrana espermática (Nichi et al., 2007). Nesse sentido, foram observados menores índices relativos (média da concentração apresentada por cada tratamento quando comparados os 3 momentos experimentais) e absolutos (ao longo das 48 horas de refrigeração, $P=0,8907$) na peroxidação lipídica associados à manutenção espermática no diluidor a base de lecitina de soja. No entanto, foi observado o aumento significativo ($P<0,05$) na produção de MDA associado à manutenção do sêmen bovino sob refrigeração nos diluidores a base de gema de ovo, resultados semelhantes aos reportados anteriormente para o sêmen bovino e bubalino refrigerado (Nair et al., 2006). Chatterjee e Gagnon, (2001), observaram o aumento de $2,4\times$ na produção de íons O^{2-} durante a refrigeração do sêmen bovino, justificando o aumento na produção total de EROS durante a manutenção a frio e a necessidade de um adequado diluidor de refrigeração para garantir uma preservação eficiente dos espermatozóides.

Kadirvel et al., (2009), observaram que a geração de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação dos lipídeos de membrana dos espermatozóides sofrem um aumento significativo e linear entre os momentos 0 e 72 horas de refrigeração para o sêmen de bubalinos, sendo que ambos os eventos apresentaram correlação negativa com motilidade espermática, potencial de membrana mitocondrial e integridade de cromatina espermática. Kumaresan et al., (2009), obtiveram os mesmos resultados para o sêmen suíno refrigerado, confirmando o aumento significativo nas concentrações de MDA ao longo do período de refrigeração. As EROS também foram apontadas como as principais causadoras da deterioração da qualidade do sêmen canino refrigerado (Michael et al., 2010).

Tendo em vista que a excessiva produção de EROS leva a diminuição na qualidade dos espermatozóides, causando a oxidação de proteínas, lesão do DNA espermático (MORTE et al., 2008) e, conseqüente, queda nos índices de fertilidade em bovinos (Waterhouse et al., 2010), torna-se plausível especular que a quantificação das EROS e/ou peroxidação lipídica pode representar uma técnica eficiente de avaliação da qualidade espermática e, portanto, explicar com maior acurácia as possíveis diferenças nos índices de fertilidade alcançados por diferentes amostras seminais. No entanto, poucos trabalhos que envolveram a avaliação do estresse oxidativo buscaram a associação dos achados laboratoriais aos índices de fertilidade dos programas de IA.

Neste estudo foi observada maior probabilidade de prenhez ($P < 0,05$) associada à utilização de amostras de sêmen diluídas em BB-L em relação ao sêmen refrigerado por 48 horas nos diluidores TRIS ou BB, resultados que, provavelmente, associam-se à menor produção de EROS no meio à base de lecitina de soja em relação aos diluidores compostos por gema de ovo. No trabalho de Stradaioli et al., (2007) foi relatada a maior capacidade de manutenção dos níveis do antioxidante glutatona no sêmen bovino criopreservado no diluidor Bioxcell® (a base de lecitina) em relação às amostras processadas em meio TRIS, sugerindo que o sêmen congelado em diluentes à base de gema de ovo apresentaram menor capacidade de neutralização das EROS. O aumento na taxa de peroxidação de lipídeos de membrana pode estar associado à ocorrência do “choque frio” durante a refrigeração, resultando em capacitação prematura dos espermatozóides bovinos (Chatterjee & Gagnon, 2001), que representa uma das principais causas para a queda nos índices de fertilidade na IA. Nesse sentido, pode-se deduzir que mesmo apresentando uma melhor preservação espermática, expressa por índices superiores de movimento e integridade de membrana plasmática e acrossomal, os meios a base de gema de ovo não promovem a proteção eficiente dos espermatozóides bovinos refrigerados contra a formação de EROS, que levam a alterações espermáticas que impactam diretamente sobre fertilidade do sêmen. Especula-se que o principal efeito das EROS em relação à queda de fertilidade do sêmen refrigerado ou armazenado por longos períodos na forma líquida esteja relacionado à atuação sobre a integridade do DNA espermático (Jackson et al., 2010).

Como a C/IA utilizando sêmen bovino refrigerado foi semelhante (BB-L) ou inferior (BB e TRIS) a utilização do sêmen criopreservado, rejeita-se a hipótese inicial levantada em nosso trabalho. Os diluidores convencionalmente utilizados para a criopreservação espermática não conferem a proteção necessária para manutenção do sêmen refrigerado por longos períodos. Segundo Vishwanath, (2000), a explicação fisiológica para esse rápido declínio na fertilidade dos espermatozóides estocados na forma líquida deve-se ao estresse oxidativo extracelular e intracelular, observações que condizem e explicam nossos resultados.

5. Conclusões

Embora os diluidores a base de gema de ovo tenham promovido maior preservação do movimento e integridade dos espermatozóides bovinos durante o processo de refrigeração, o meio a base de lecitina de soja foi mais efetivo na prevenção da peroxidação dos lipídeos de membrana espermática, garantindo taxas de concepção comparáveis às obtidas com o sêmen convencionalmente criopreservado. A substituição do sêmen bovino criopreservado por amostras seminais refrigeradas por 48 horas não foi efetiva para o aumento da C/IA dos programas de IATF, exigindo novos estudos que explorem não apenas novos meios para manutenção espermática sob refrigeração, como também a relação entre tempo de refrigeração e fertilidade do sêmen bovino na IA.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brasil) pelo auxílio financeiro, a Fazenda e Haras Braidó (Cerqueira César, São Paulo, Brasil) e a Fazenda Estrela do Guaporé (Comodoro, Mato Grosso, Brasil) por disponibilizarem os animais utilizados na pesquisa.

Trabalho científico número 3 destinado à revista Livestock Science
(Apêndice)

**Uso do sêmen bovino refrigerado como estratégia para o aumento da taxa de
concepção dos programas de inseminação artificial em tempo-fixo**

André Maciel Crespilho^a, Frederico Ozanam Papa^{a*}

^a Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

*Autor para correspondência. Tel: + 55 (14) 3811-6249

Email: papa@fmvz.unesp.br

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização do sêmen bovino refrigerado por 24 horas como estratégia para o aumento da taxa de concepção (C/IA) de vacas Nelore submetidas à inseminação artificial em tempo-fixo (IATF). Foi utilizado um único reprodutor da raça Nelore, obtendo-se 3 ejaculados através de eletroejaculação. As amostras de sêmen foram subdivididas no ato da colheita em duas alíquotas iguais, diluídas no meio Botu-Bov® contendo 6,4% de glicerol (BB-C, Grupo controle congelado) ou no mesmo diluente isento de crioprotetores, utilizado para a refrigeração espermática (BB-R, Grupo refrigerado). As amostras do grupo BB-R foram refrigeradas a 5°C em caixa de transporte modelo Botutainer®, permanecendo no sistema por 24 horas previamente a sua utilização. Para o teste de fertilidade foram utilizadas 349 vacas Nelore, sincronizadas através de dispositivo liberador de progesterona (PRIMER®) e estradiol e utilizadas para a IATF. Os índices de concepção foram de 45,71%^a e 61,49%^b, respectivamente, para o sêmen bovino criopreservado e refrigerado. A maior viabilidade espermática relacionada ao uso do sêmen na forma líquida sob refrigeração representa uma alternativa à utilização do sêmen bovino criopreservado, demonstrando que amostras refrigeradas por 24 horas aumentam a C/IA em bovinos.

Palavras-chave: sêmen bovino, refrigeração, inseminação artificial, taxa de concepção.

Abstract

The aim of this present study was to test the hypothesis that cooled bovine semen at 5°C for 24 hours improves the conception rate (C/IA) of Nelore cows submitted to fixed-time insemination programs (FTAI). In this study, three ejaculate of one Nelore bull obtained by electroejaculation was used. Each ejaculate was fractioned into two aliquots, diluted in either Botu-Bov® extender with 6.4% of glycerol (BB-frozen-thawed semen group) or Botu-Bov® extender used to cooling bull semen (BB-R, cooled group). After packing, semen samples from BB-R group were submitted to passive cooling until 5°C in isothermic box (Botutainer®, Brazil) and remained for 24 hours. The C/IA was assessed through fixed-time artificial insemination (FTAI) of 349 suckled postpartum beef cows that underwent controlled intravaginal progesterone releasing device (PRIMER®) and estradiol benzoate synchronization protocol, and were inseminated with BB-C or BB-R. The average conception rates were 45.71%^a and 61.49%^b, respectively for samples in Control Group and Cooled Group. In conclusion, cooled semen is a good alternative to frozen-thawed bull semen, resulting in an improvement of conception rates in FTAI programs.

Key words: Bull semen, cooling sperm, artificial insemination, conception rates.

1. Introdução

Diversos estudos conduzidos com diferentes espécies animais indicam que os espermatozóides criopreservados apresentam uma menor viabilidade no trato reprodutor feminino comparado ao sêmen fresco (Curry, 2000), sendo notório que a redução no número ou na qualidade dos espermatozóides inseminados determinam uma queda exponencial nos índices de fertilidade (Watson, 2000).

Nesse sentido, trabalhos desenvolvidos na Austrália e Nova Zelândia apontam para a possibilidade de utilização e comercialização do sêmen bovino na forma líquida, sob refrigeração. Dentre as principais vantagens relacionadas ao emprego do sêmen armazenado no estado líquido, além da maior viabilidade em relação às amostras criopreservadas, representa a possibilidade de redução da dose inseminante, otimização de reprodutores geneticamente superiores, menor custo de estocagem e praticidade para utilização nos trabalhos de inseminação artificial (Vishwanath & Shannon, 2000), dispensando a utilização de botijões criobiológicos, rede de energia elétrica nos currais de manejo dos animais e descongeladores de sêmen.

Segundo Bucker et al., (2009), o sêmen bovino processado na forma líquida é vantajoso em relação ao sêmen criopreservado em virtude de sua maior longevidade no trato reprodutor feminino, garantindo maiores taxas de fertilização, mesmo no caso de ovulações assíncronas em relação ao momento da inseminação.

No entanto, mesmo para amostras armazenadas sob refrigeração, ocorre uma queda significativa na motilidade (Verberckmoes et al., 2005) e fertilidade dos espermatozóides bovinos ao longo do período de armazenagem (Vishwanath, 2000). O' Hara et al., (2010), indicaram uma associação inversa entre fertilidade e tempo de refrigeração do sêmen ovino, observando a queda significativa nas taxas de concepção associadas ao uso de amostras seminais refrigeradas por período superior a 24 horas.

Como em estudo anterior foi observada a queda significativa nas taxas de concepção de vacas inseminadas com amostras de sêmen bovino refrigerado por 48 horas em comparação ao sêmen criopreservado (Crespilho et al., 2009), o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência do sêmen bovino submetido à refrigeração por 24 horas,

testando-se a hipótese de que a utilização do sêmen refrigerado pode aumentar a C/IA de vacas sincronizadas e submetidas a IATF.

2. Material e Métodos

2.1. Colheita e processamento do sêmen

Para este estudo foi utilizado um único reprodutor da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade de 8 anos e histórico de fertilidade conhecido. As amostras de sêmen foram obtidas através de eletroejaculação a partir de colheitas seriadas a cada 2 dias, iniciadas 10 dias antes do início dos programas de inseminação artificial (n=3 ejaculados para a IATF).

Todos os ejaculados foram avaliados subjetivamente no ato da colheita quanto a motilidade total, vigor e concentração espermática através de microscopia de luz. Após a constatação da qualidade espermática inicial (mínimo de 70% de células móveis e 3×10^9 células espermáticas totais), cada amostra de sêmen foi fracionada em alíquotas iguais, diluídas no meio de criopreservação Botu-Bov® (BB, Botufarma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil), contendo 6,4% de glicerol e utilizado como fração única para congelamento espermática (Grupo BB-C), ou no diluidor BB fração I, isento de crioprotetor e utilizado para a refrigeração do sêmen bovino (Grupo BB-R).

Após o envase em palhetas francesas de 0,5 mL (IMV® Technologies, L'Aigle Cedex, France), na concentração final de 30×10^6 espermatozóides/palheta, as amostras foram submetidas a dois tipos de processamento. No grupo controle criopreservado as palhetas foram resfriadas em geladeira digital (Minitübe® Tiefenbach, Germany) com temperatura constante de 5°C por 4 horas, colocadas a 5 cm da superfície do nitrogênio líquido (N₂) em caixa de isopor de 40 litros por 20 minutos e criopreservadas por imersão direta no N₂. As amostras do grupo BB-R foram submetidas à refrigeração passiva até a temperatura de 5°C em caixa isotérmica Botutainer® (Botufarma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil), permanecendo no sistema até a utilização com 24 horas de armazenagem.

Todas as amostras foram avaliadas subjetivamente no dia da utilização na inseminação artificial, sendo considerados como parâmetros mínimos de qualidade para inclusão no experimento a motilidade total superior a 50% e defeitos espermáticos maiores $\leq 20\%$, independente da metodologia de preservação do sêmen bovino.

2.2. Protocolo de sincronização do ciclo estral para a IATF

As partidas de cada grupo foram utilizadas para a inseminação artificial em tempo fixo de 349 vacas Nelore ou $\frac{1}{2}$ Sangue Nelore, multíparas e lactantes (60-90 dias pós-parto), mantidas exclusivamente em pastagem de *Brachiaria decumbens*, sendo oferecido sal mineral e acesso à água *ad libitum*. Foram realizados três programas consecutivos de sincronização, iniciados durante o final do período de verão no hemisfério sul (fevereiro de 2010), em uma única fazenda comercial no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (latitude 21°53'09''S; longitude 54°09'21''O).

Em dia aleatório do ciclo estral (D0) todos os animais receberam 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (Ric-Be®/Tecnopec, São Paulo, Brasil) associado ao dispositivo intravaginal de progesterona de 1° ou 2° uso (Primer®, Tecnopec, São Paulo, Brasil). No “D8” os implantes foram retirados, procedendo-se a administração concomitante de 10 mg de FSH (Folltropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, Canada), 0,375 mg de D-Cloprostenol (Prolise®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) e 1,0 mg de Benzoato de Estradiol (Ric-Be®/Tecnopec, São Paulo, Brasil). A IATF foi realizada entre 44-48 horas após a retirada da fonte de progesterona (D10).

Todas as vacas foram submetidas a um exame ultrassonográfico (Aloka-SSD 500, probe de 5 MHz, Tokyo, Japan) realizado 60 dias após a IATF para diagnóstico de gestação.

2.3. Análise Estatística

Como a taxa de concepção implica em uma resposta binária, foi realizada análise de regressão logística multivariada, através do programa computacional Proc Logistic 9.1.3 (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., 1999), sendo incluídos no modelo os efeitos principais de escore de condição corporal (ECC) das vacas no primeiro dia do protocolo (escala de 1 a 5, onde 1= emaciada e 5=obesa, segundo Ayres et al., 2009), efeito do protocolo e ou lote de vacas (3 programas realizados) e efeito do tratamento de preservação seminal, além de suas interações, admitindo-se diferenças significativas quando $P < 0,05$ e tendências foram consideradas quando $0,05 < P \leq 0,10$.

3. Resultados

O ECC, o lote de animais e/ou protocolo não exerceram efeito significativo sobre as taxas de concepção ($P > 0,05$) do programa de IATF. No entanto, a metodologia de preservação influenciou significativamente ($P < 0,01$) a C/IA e a probabilidade de prenhez na IATF (Tabela.1).

Tabela.1: Efeito da metodologia de preservação do sêmen bovino sobre as taxas de concepção e probabilidade de prenhez de vacas Nelore submetidas a IATF.

	n	Prenhez n (%)	Probabilidade de Prenhez (Odds ratio)	P
BB-R	174	107 (61,49 ^a)	Referência	
BB-C	175	80 (45,71 ^b)	0.537 (0.349-0.826)	0.0047

^{a,b} Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem significativamente

BB-R= Sêmen bovino refrigerado em Botu-Bov® por 24 horas.

BB-C= Sêmen bovino criopreservado em Botu-Bov® fração única.

4. Discussão

Nosso trabalho objetivou a comparação entre a C/IA proporcionada pelo sêmen refrigerado por 24 horas ou criopreservado utilizando o diluidor comercial Botu-Bov®. De maneira geral, a utilização do sêmen bovino na forma líquida e refrigerada só se justifica pelo aumento das taxas de concepção quando comparado ao sêmen congelado (Bucker et al., 2009), já que a baixa longevidade limita a ampla difusão e manutenção do sêmen por longos períodos de tempo.

Embora sejam necessários poucos espermatozóides viáveis para garantir o processo de fertilização em bovinos (Holt et al., 2000b), as possíveis falhas espermáticas em estabelecer contato com o ovócito feminino após a IA representam a origem primária dos fracassos no processo de fecundação (Hawk, 1986).

Nesse sentido, embora se observe uma baixa quantidade de células espermáticas no sítio de fertilização em relação ao número de espermatozóides inseminados (Januskauskas & Zilinskas, 2002), assume-se que o sêmen bovino refrigerado garante um maior número de células íntegras acessórias com capacidade de fertilização, justificando-se, dessa maneira, a superioridade encontrada em relação ao sêmen congelado. Garcia et al., (1999) apresentaram resultados semelhantes ao demonstrarem que a utilização do sêmen bovino refrigerado por 8 horas promove um aumento nos índices de concepção de novilhas submetidas à IATF em relação às amostras seminais refrigeradas por 32 horas ou congeladas, resultados atribuídos a maior viabilidade e qualidade do sêmen bovino estocado na forma líquida por curto período de tempo.

Bucker et al., (2009) obtiveram resultados de concepção similares comparando o sêmen bovino estocado na forma líquida por 24 horas na concentração de 3×10^6 espermatozóides totais em comparação ao sêmen criopreservado com 20×10^6 espermatozóides/palheta, demonstrando que mesmo uma redução de 85% na dose inseminante pode ser compensada pela maior qualidade dos espermatozóides. Nesse sentido, pode-se presumir que a utilização do sêmen bovino na forma líquida desempenha um papel semelhante ao aumento da concentração de espermatozóides no sêmen congelado, levando a um efeito compensatório que garante maior número de células viáveis ao processo de fertilização.

Um dos principais fatores que limita a ampla utilização do sêmen na forma líquida representa a queda inevitável na viabilidade espermática ao longo do período de manutenção. Estudos anteriores contemplando a avaliação do sêmen bovino (Crespilho et al., 2009; Bartlet e Van Demark et al., 1962), ovino (O'Hara et al., 2010), suíno (Haugan et al., 2005), eqüino (Gary et al., 2009) e de aves (Zaniboni e Cerollini, 2009) na forma líquida, convergem para resultados similares que apontam o período crítico para a armazenagem do sêmen na forma líquida a partir de 48 horas, havendo uma queda significativa na viabilidade e fertilidade das amostras estocadas por períodos maiores de tempo. Embora a amplitude e a velocidade da redução na qualidade do sêmen a fresco ou refrigerado sejam diretamente influenciados por fatores como a temperatura de manutenção, constituintes presentes nos meios diluidores utilizados, concentração espermática e variabilidade entre os diferentes reprodutores (Vishwanath, 2000), torna-se plausível supor que a manutenção do sêmen bovino na forma líquida sob refrigeração provavelmente apresenta eficiência máxima em termos de viabilidade quando armazenado por até 24 horas em diluentes convencionais a base de gema de ovo.

5. Conclusão

O sêmen refrigerado por 24 horas representa uma estratégia eficiente para o aumento da C/IA de vacas inseminadas em tempo-fixo, apresentando uma alternativa altamente viável do ponto de vista econômico e biológico em comparação ao sêmen bovino criopreservado.

6. Agradecimentos

A FAPESP (São Paulo, SP, Brasil) pelo auxílio financeiro e a fazenda Sete Voltas (Águas Claras, MS, Brasil) que gentilmente cedeu os animais para a pesquisa.

CONCLUSÕES GERAIS

Frente aos resultados obtidos nos trabalhos 1, 2 e 3 e de acordo com a metodologia utilizada nos experimentos podemos concluir que:

- ✓ Os meios diluidores a base de gema de ovo são mais efetivos em relação ao diluente que utiliza a lecitina de soja como fonte primária de fosfolipídeos, conferindo maior viabilidade e fertilidade ao sêmen bovino pós-descongelamento.
- ✓ Os meios a base de gema de ovo utilizados convencionalmente para a criopreservação do sêmen bovino não conferem proteção eficiente quando empregados para a manutenção espermática por 48 horas sob refrigeração.
- ✓ A utilização da gema de ovo como componente dos meios diluidores de refrigeração espermática foi associada a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio que causam a peroxidação dos lipídeos de membrana plasmática.
- ✓ Uma maior probabilidade de prenhez na IATF foi associada à utilização do sêmen bovino resfriado por 48 horas no meio a base de lecitina de soja em relação aos diluidores Botu-Bov® ou Tris-gema de ovo-frutose.
- ✓ O uso de amostras seminais refrigeradas por 48 horas não promove o aumento da taxa de concepção na inseminação artificial em tempo-fixado.
- ✓ A utilização do sêmen bovino refrigerado por 24 horas corresponde a uma estratégia eficiente para o aumento dos índices de concepção dos programas de inseminação artificial em tempo-fixado, representando uma ferramenta valiosa para o aumento da taxa de desfrute do rebanho aliado à diminuição dos custos de produção.

REFERÊNCIAS

- ADEEL, M.; IJAZ, A.; ALEEM, M.; REHMAN, H.; YOUSAF, M.S.; JABBAR, M.A. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. **Theriogenology**, v.71, p.1220–1225, 2009.
- AIRES, V.A.; HINSCH, K.D.; SCHLOESSER, F.M.; BOGNERA, K.; SCHLOESSER, S.M. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v.60, p.269–279, 2003.
- AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A.; ANDRABI, S.M.H.; IQBAL, S.; ULLAH, N. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. **Theriogenology**, 2010. (No prelo).
- ALMQUIST, J.O.; WICKERSHAM, E.W. Diluents for bovine semen. XII. Fertility and motility of spermatozoa in skim milk with various levels of glycerol and methods of glycerolization. **Journal of Dairy Science**, v.45, n.6, p.782-787, 1962.
- AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINURIER, D.; CHATAGNON, G.; BATTUT, I.; COURTENS, J.L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v.129, p.535-543, 2005.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea da membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae (Suplemento)**. Porto Alegre: Brasil, 2003. p.230-231.
- 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 Nellore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**, v.123, p.175–179, 2009.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.
- BARROS, C.M., ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 18, 2004. **Acta Scientiae Veterinariae (Suplemento)**. Barra Bonita: Brasil, 2004. p.23-4.
- BARTLETT JR, F.D.; VAN DEMARK, N.L. Effect of diluent composition on survival and fertility of bovine spermatozoa stored in carbonated diluents. **Journal of Dairy Science**, v.45, p.360-367, 1962.

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

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

BILODEAU, S.G.; PANICH, P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.143-155, 2002.

BLACKSHAW, A.W.; SALISBURY, G.W. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-Shock and its prevention. **Journal of Dairy Science**, v.40, n.9, p.1099-1106, 1957.

BLACKSHAW, A.W.; SALISBURY, G.W. VANDEMARK, N.L. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. I. 37, 21, and 5 °C. **Journal of Dairy Science**, v.40, n.9, p.1093-1098, 1957.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.307-326, 2003.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-Le-GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potencial of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, p.699–706, 1998.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU, S.G.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.

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.

CASSOU, R. *Instrument for artificial insemination*. EUA. Patente n. 3.507.282, 12 dez. 1966, 21 abril 1970.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; 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, p.119–131, 2008.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.451-458, 2001.

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

CHAVEIRO, A.; LIU, J.; MULLEN, S.; WOELDERS, H.; CRITSER, J.K. Determination of bull sperm membrane permeability to water and cryoprotectants using a concentration-dependent self-quenching fluorophore. **Cryobiology**, v.48, p.72-80, 2004.

CHEN, Y.; FOOTE, R.H.; TOBBACK, C.; ZHANG, L.; HOUGH, D.S. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-Tris and whole milk extenders. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.4, p.1028-1034, 1993.

ÇOIAN, K.; BASPINAR, N.; BUCAK, M.N.; AKALIN, P.P.; ATAMAN, M.B.; ÖMÜR, A.D.; GÜNGÖR, S.; KÜRÜKÜNAY, S.; ÖZKALP, B.; SARIÖZKAN, S. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. Research in Veterinary Science, 2010. **(No prelo)**.

CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.74, p.424-435, 2010.

CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; NICHI, M.; SÁ FILHO, M.F.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA Jr., J.A. Effect of adding taurine to a TRIS-based egg yolk extender on the viability of bull semen cooled at 5°C. In: International Ruminant Reproduction Symposium, 8, 2010, Anchorage, Abstract... Anchorage, USA: 2010. **(No prelo)**.

CRESPILHO, A.M., PAPA, F.O., ZAHN, F.S., GUASTI, P.N., DELL'AQUA Jr., J.A. Influence of different preservation methods on fertility of bovine semen. **Biology of Reproduction**, v.81, p.459, 2009.

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.; ALBERTI, K.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; MARTINS Jr, A.; NOVAES, J.L.C.; DELL'AQUA Jr, J.A. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **Ars Veterinaria**, v. 22, n.3, p.229-235, 2006.

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

DAY, M.L. Hormonal induction of estrous cycles in anestrus *Bos taurus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 82-3, p.487-94, 2004.

DAYEM, A.A.M.H.; MAHMOUD, K.G.H.M.; NAWITO, M.F.; AYOUB, M.M.; SCHOLKAMY, T.H. Fertility evaluation in Egyptian buffalo bulls using zona pellucida binding and in vitro fertilization assays. **Livestock Science**, v.122, p.93–198, 2009.

DEJARNETTE, J.M.; WALLACE, R.W.; HOUSE, R.B. et al. Attenuation of premature estrous behavior in postpartum beef cows synchronized to estrus using GnRH and PGF2 α . **Theriogenology**, v. 56, p. 493-501, 2001.

DEJARNETTE, J.M.; BARNES, D.A.; MARSHALL, C.E. Effects of pre-and post-thaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Theriogenology**, v.53, p.1225–1238, 2000.

DUFFY, P.; Mark A. Crowe, Edward J. Austin, Monika Mihm, Maurice P. Boland, James F. Roche. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. **Theriogenology**, v.61, p.725-734, 2004.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.

FARREL, P.B.; FOOTE, R.H. MCARDLE, M.M.; TROUERN-TREND, V.; TARDIF, A.L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analyses (CASA). **Journal of Andrology**, v.17, p.293-300, 1996.

FELÍCIO, G.B. Efeito da substituição da gema de ovo pela lecitina de soja na criopreservação do sêmen eqüino. 2008. 44f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP.

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

FOOTE, R.H. Development of reproductive biotechnologies in domestic animals from artificial insemination to cloning: A perspective. **Cloning**, v.1, n.3, p.133-142, 1999.

FOOTE, R.H. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present, and future. **Journal of Andrology**, v.3, p.85-100, 1982.

FOOTE, R.H. Fertility of bull semen at high extension rates in Tris-buffered extenders. **Journal of Dairy Science**, v.53, n.10, p.1475-1477, 1970.

FOOTE, R.H. Survival of bull sperm in milk and yolk extenders with added catalase. **Journal of Dairy Science**, v.45, n.7, p.907-910, 1962.

FORD, W.C.L. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? **Human Reproduction Update**, v.12, n.3, pp.269–274, 2006.

GALINA, C.S., ORIHUELA, A., RUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p.465-70, 1996.

GAO, D.; MAZUR, P.; CRITSER, J. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: KAROW, A.M.; CRITSER, J.K. (eds.). **Reproductive Tissue Banking**. London: Academic Press, 1997. p.263-328.

GARCIA, A.R.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; RODRIGUES, P.H.M.; MARQUES, A. Influência do uso de sêmen resfriado e da aplicação de GnRH sobre a taxa de prenhez de novilhas Nelore inseminadas em tempo-fixo. **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,p .1260–1268, 2008.

GIL, J.; LUNDHEIN, N.; SÖDERQUIST, L.; MARTÍNES-RODRÍGUEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v.59, p.1241-1255, 2003.

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.; TORRES-JUNIOR, J.R.; SOUZA, A.H.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; CARVALHO, J.B.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in Bos indicus heifers. **Theriogenology**, v.69, p.852–858, 2008.

GRAAF, S.P., EVANS, G., GILLAN, L.; GUERRA, M.M.P.; MAXWELL, W.M.C.; O'BRIEN, J.K. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.67, p.217–227, 2007.

GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.239-247, 2001.

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

GRIFFIN, E.M. **Development of an extender protocol to enhance the viability of frozen-thawed bovine spermatozoa**. 2004. 212f. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Texas A&M University, Houston/Texas, USA, 2004.

GUTHRIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J.K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 67, p.1811-1816, 2002.

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

HAWK, H.W. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.1487-1503, 1986.

HINSCH, E.; HINSCH, K.D.; BOEHM, J.G.; SCHILL, W.B.; MUELLER-SCHINESSER. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.143-149, 1997.

HOLLINSHEAD, F.K.; O'BRIEN, J.K.; GILLANA, L.; MEYERS, M.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Liquid storage of flow cytometrically sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.587-605, 2004.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1-3, p.2-22, 2000a.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.43, p.47-58, 2000b.

HONDA, A., SIRUNTAWINETI, J., BABA, T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. **Human Reproduction Update** v. 8, p. 405-12, 2002.

HURST, V. Dilution of bull semen with frozen egg yolk-sodium citrate. **Journal Dairy Science**, v.36, p. 181-184, 1953.

JACKSON, R.; BORMANN, C.L.; HASSUN, P.A.; ROCHA, A.M. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility*, 2010. (No prelo)

JANUSKAUSKAS, A., ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.39, p.1-8, 2002.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.SÖDERQUIST, L.; HÄRD, M.G.M.; HÄRD, M.C.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v. 42, p.641-658, 1999.

JAVAHERI, A.R.; ESFAHAN, M.H.N. In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. **International Journal of Fertility and Sterility**, v.3, n.3, p.149-152, 2009.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.143-172, 2000.

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

KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.125-134, 2009.

KASTELIC, J.; OLSON, W.O.; M Martinez, R B Cook, and R J Mapletoft. Synchronization of estrus in beef cattle with norgestomet and estradiol valerate. **Canadian Veterinary Journal**, v.40, p.173-178 , 1999.

KRZYZOSIAK, J.; MOLAN, P.; McGOWAN, L.; VISHWANATH, R. Effect of sperm number and oxygenation state of the storage media on in vitro fertility of bovine sperm stored at ambient temperature. **Theriogenology**, v.55, p.1401-1415, 2001.

KULAKSIZ, R.; CEBI C.; AKÇAY, E.; DASKIN, A. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. **Small Ruminant Research**, v.88, p.12-15, 2010.

KUMAR, S.; SAHNI, K.L.; MOHAN, G. Effect of different levels of glycerol and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers. **Buffalo Journal**, v.2, p.151-156, 1992.

KUMARESAN, A.; KADIRVEL, G.; BUJARBARUAH, K.M.; BARDOLOI, R.K.; DAS, A.; KUMAR, S.; NASAR, S. Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.162-171, 2009.

LEBOEUF, B.; GUILLOUETA, P.H.; BATELLIER, F.; BERNELASA, D.; BONNÉ, J.L.; FORGERITA, Y.; RENAUDA, G.; MAGISTRINIC, M. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**, v.60, p.867-877, 2003.

LEITE, T.G.; VALE FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C., EMERICK, L.L.; ZAFFALON, F.G.; MARTINS, J.A.M.; ANDRADE, V.J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.31-38, 2010.

LIU, Z.; FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. **Cryobiology**, v.37, p.219-230, 1998.

LOCKYEAR, K.M.; GOODROWE, K.L.; WADDELL, W.T.; McDONALD, S.E. Comparison of different osmolalities and egg-yolk composition in processing media for the cryopreservation of red wolf (*Canis rufus*) sperm. **Theriogenology**, v.71, p.469–479, 2009.

LOVELOCK, J.E.; BISHOP, M.W.H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. **Nature**, v.183, p.1394-1395, 1959.

LOVELOCK, J.E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and protective action of glycerol. **Biochemistry Journal**, v.58, p.618-622, 1954.

MADUREIRA, E.H. Controle farmacológico do ciclo estral com emprego de progesterona e progestágenos em bovinos. In: Simpósio sobre Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes, I, 2000, São Paulo. **Anais Palestra**. Brasil, 2000, p.90-8.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A., MÉNARD, M., 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.* v. 67, p.1250-1258.

MANN, T. Studies on the metabolism of semen. 3. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen. **Biochemistry Journal**, v.40, n.4, p. 481–491, 1946.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES, S.; MOCÉ, E.; VIUDES-de-CARTRO, M.P.; VICENTE, J.S.; RODRIGUEZ, M. Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.438-441, 2004.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.312-18, 2003.

MAZIERO, R.R.D.; CRESPILO, A.M.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA Jr., J.A.; PAPA, F.O. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, Anais ... Belo Horizonte: CBRA, 2009. p.9-14.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological system. **Science**, v.168, p.939-949, 1970.

MELO, C.M.; ZAHN, F.S.; MARTIN, I.; ORLANDI, C.; DELL'AQUA Jr., J.A.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.4, p.171-175, 2007.

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

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p.179–189, 2009.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCO, C.M. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.119–135, 2009.

MILLER, P.D. Artificial Insemination Organizations. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.1283-1287, 1981.

MIRÓ, J.; TABERNER, E.; RIVERA, M.; PEÑA, A.; MEDRANO, A.; RIGAU, T.; PEÑALBA. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. **Theriogenology**, v.72, p.1017–1022, 2009.

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

MORTE, M.I.; RODRIGUES, A.M.; SOARES, D.; RODRIGUES, A.S.; GAMBOA, S.; SANTOS, J.R. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: Seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.36–47, 2008.

MOUSSA, M.; MARTINET, V. TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins: extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p. 1695-1706, 2002.

MUIÑO, R.; FERNÁNDEZ, M.; PEÑA, A.I. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, n.3, p.305-311, 2007.

NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNES, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.80, p.225-235, 2004.

NAIR, S.J.; BRAR, A.S.; AHUJA, C.S.; SANGHA, S.P.S.; CHAUDHARY, K.C. [A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature](#) **Animal Reproduction Science**, v.96, p.21-29, 2006.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I.G.F.; CORTADA, C.N.; BARNABE, V.H. CLERCQ, J.B.P.; BOLS, P.E.J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34°C. **Theriogenology**, v.67, p.334–340, 2007.

NICHI, M.; BOLS, P.E.J.; ZÜGE, R.M., BARNABE, V.H.; GOOVAERTS, I.G.F.; BARNABE, R.C.; CORTADA, C.N.M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v.66, p.822–828, 2006.

NUNES, D.B.; ZORZATTO, J.R.; COSTA e SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system **Animal Reproduction Science**, v.104, p.434–439, 2008.

O'DELL, W.T.; ALMQUIST, J.O.; FLIPSE, R.J. Metabolism of bovine semen. VI. Effect of fructose and arabinose on the uptake and metabolic utilization of glycerol-1-C by bovine spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v.42, n.1, p.89-93, 1959.

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

OKE, M.; JACOB, J.K.; PALIYATH, G. Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. **Food Research International**, v.43, p.232–240, 2010.

OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? **Journal of Andrology**, v.17, n.3, p.183-186, 1996.

PAPA, F.O.; FELÍCIO, G.B., MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; De VITA, B.; AVANZI, B.R.; Dell'AQUA, J.A. Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.121S, p.71–72, 2010.

PAPA, F.O.; GABALDI, S.H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n.1, p.39-44, 2000.

PARKINSON, T.J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. **The Veterinary Journal**, v.168, p.215–229, 2004.

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

PAZ, C.P.; ESTESO, M.C.; ALVAREZ, M.; MATA, M.; CHAMORRO, C.A.; ANEL, L. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology*, 2010. **(No prelo)**.

PENCI, M.C.; CONSTENLA, D.T.; CARELLI, A.A. Free-fatty acid profile obtained by enzymatic solvent-free hydrolysis of sunflower and soybean lecithins. *Food Chemistry*, v.120, p.332–338, 2010.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at lower temperatures. *Nature*, v.164, p.666-667, 1949.

PURDY, P.H.; THARP, N.; STEWART, T.; SPILLER, S.F.; BLACKBURN, H.D. Implications of the pH and temperature of diluted, cooled boar semen on fresh and frozen-thawed sperm motility characteristics. *Theriogenology*, 2010. **(No prelo)**.

RAMALHO-SANTOS, J.; SCHATTEN, G.; MORENO, R.D. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1043-51, 2002.

RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J. ARRUDA, R.P. Effects of centrifugation on membrane integrity and lipid peroxidation of equine cooled spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.107, n.3-4, p.344-345, 2008.

REED, M.L.; EZEH, P.C.; HAMIC, A.; THOMPSON, D.J.; CAPERTON, C.L. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertility and Sterility*, v.92, n.5, 2009.

RUIGH, L.; BOSCH, J.C.; BRUS, M.C.; LANDMAN, B.; MERTON, J.S. Ways to improve the biosecurity of bovine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, p.268–274, 2006.

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

SÁ FILHO, M.F.; CRESPILOHO, 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, p.23–30, 2010b.

SÁ FILHO, O.G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility *Theriogenology*, v.72, p.210–218, 2009.

SAMOTO, M.; MAEBUCHI, M.; MIYAZAKI, C.; KUGITANI, H.; KOHNO, M.; HIROTSUKA, M.; KITO, M. Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. **Food Chemistry**, v.102, p.317–322, 2007.

SALISBURY, G.H.; FULLER, H.K.; WILLET, E.L. Preservation of bovine spermatozoa in yolk citrate diluent and Field results from its use. **Journal of Dairy Science**, v.14, n.11, p.905-910, 1941.

SANSONE, G.; NASTRI, M.J.F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v.62, p.55–76, 2000.

SARIÖZKAN, S.S., BUCAK, M.N., TUNCER, P.B.; ULUTAŞ, P.A.; BILGEN, A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v.58, p.134-138, 2009.

SILVA, P.F.N., GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-78, 2006.

SHARAFI, M.; FOROUZANFAR, M.; HOSSEINI, S.M.; HAJIAN, M.; OSTADHOSSEINI, S.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H.R. *In vitro* comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. **International Journal of Fertility and Sterility**, v.3, n.3, p.149-152, 2009.

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

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

THACKER, D.L.; ALMQUIST, J.O. Diluters for bovine semen. I. Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. **Journal of Dairy Science**, v.36, n.2, p.173-180, 1953.

THATCHER, W.W., MOREIRA, F.; SANTOS, J.E.P.; MATTOS, R.C.; LOPES, F.L.; PANCARCI, S.M.; RISCO, C.A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v. 55, p.75-89, 2001.

THIBIER, A.M.; WAGNER, H.G. World statistics for artificial insemination in cattle. **Livestock Production Science**, v.74, 203–212, 2002.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M. MARSHALL, C.E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.58, p.786-793, 1998.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p.1087-1094, 2002.

UYSAL, O.; BUCAK, M.N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. **Acta Veterinaria BRNO**, v.76, p.383-390, 2007.

VASCONCELOS, J.L.M; SÁ FILHO, O.G. Não adianta produzirmos um bezerro por vaca por ano precisamos produzir um bezerro de qualidade/vaca/ano. BeefPoint – Dicas de Sucesso, 05/07/2010. Disponível em: www.beefpoint.com.br. Acesso em: 14/07/2010.

VERA-MUNOZ, O.; AMIRAT-BRIAND, L.; DIAZ, T.; VÁSQUEZ, L.; SCHMIDT, E.; DESHERCES, S.; ANTON, M.; BENCHARIF, D.; TAINTURIER, D. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl1 and Bioxcell1. **Theriogenology**, v.71, p.895–900, 2009.

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

VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; PAUW, I.; 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, p.410–416, 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p. 149-179, 2002.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p. 907-919, 2000.

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

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

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

WAY, L.A., HENAULT, M.A., KILLIAN, G.J. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.43, p.1301-1316, 1995.

WANGTENDONK-de LEEUW, A.M.; HARING, R.M.; KAAL-LANSBERGEN, L.M.T.E.; Deen-DASS, J.H.G. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. **Theriogenology**, v.54, p.57-67, 2000.

WATERHOUSE, K.E.; GJELDNES, A.; TVERDAL, A.; DE ANGELIS, P.M.; FARSTAD, W.; HÅÅRD, M.; KOMMISRUUD, E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and *in vitro* incubation of bull semen. **Animal Reproduction Science**, v.117, p.34–42, 2010.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, n.2, p.481-492, 2000.

WEBB, G.W.; DEAN, M.M.; HUMES, R.A.; HEYWOOD, J.S. A comparison of the ability of three commercially available diluents to maintain the motility of cold stored stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.29, n.4, p.229 232, 2009.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular Cryobiology: Thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v.24, p.438-450, 2001

WOODS, E.J.; BENSON, J.D.; AGCA, Y.; CRITSER, J.K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v.48, p.146-156, 2004.

ZANIBONI, L.; CEROLINI, S. Liquid storage of turkey semen: Changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced *in vitro* peroxidation in control, *n*-3 fatty acids and alpha-tocopherol rich spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.51–65, 2009.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HÅÅRD, M.G.H. ; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an IA-programe. **International Journal of Andrology**, v.22, p.253-260, 1999.

APÊNDICE

Guide for Authors

Livestock Science (ISSN: 1871-1413) and Animal Reproduction Science (ISSN: 0378-4320)

Imprint: ELSEVIER

Types of paper

1. Original Research Articles (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications (only Livestock Science)
4. Position Papers (only Livestock Science)
5. Technical Notes (only Livestock Science)
6. Book Reviews

1. Original Research Articles should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. They should not occupy more than 12 Journal pages.

2. Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. Reviews will often be invited, but submitted reviews will also be considered for publication. All reviews will be subject to the same peer review

process as applies for original papers. They should not occupy more than 12 Journal pages.

3. A Short Communication is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications may be submitted to the journal as such, or may result from a request to condense a regular paper, during the peer review process. They should not occupy more than 5 journal pages (approximately 10 manuscript pages) including figures, tables and references.

4. Position Papers are informative and thought-provoking articles on key issues, often dealing with matters of public concern. These will usually be invited, but a submitted paper may also be considered for publication. They should not occupy more than 12 Journal pages.

5. A Technical Note is a report on a new method, technique or procedure falling within the scope of Livestock Science. It may involve a new algorithm, computer program (e.g. for statistical analysis or for simulation), or testing method for example. The Technical Note should be used for information that cannot adequately incorporated into an Original Research Article, but that is of sufficient value to be brought to the attention of the readers of Livestock Science. The note should describe the nature of the new method, technique or procedure and clarify how it differs from those currently in use if cannot be incorporated. They should not occupy more than 5 Journal pages.

6. Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than two years old.

Contact details for submission

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to authorsupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>); EC Directive 86/609/EEC for animal experiments (<http://ec.europa.eu/environment/chemicals>); Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published

elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a “Journal Publishing Agreement” (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a “Journal Publishing Agreement” form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retains certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to these journals proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review

process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Article structure

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Manuscripts in general should be organised in the following order:

- Title should be clear, descriptive and not too long
- Abstract
- Keywords (indexing terms)
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques

- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgment and any additional information concerning research grants
- References
- Figure captions
- Figures (separate file(s))
- Tables (separate file(s))

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the

author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not be longer than 400 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical

Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered. The use of fractional powers instead of root signs is recommended.

Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to:

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 10 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to

publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Additional Information

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.