



## Sêmen refrigerado – estado da arte em diferentes espécies *Chilled semen – state of the art in different species*

Jaci de Almeida<sup>1</sup>, Antônio de Pinho Marques Junior<sup>2</sup>, Osvaldo Almeida Resende<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário de Barra Mansa-UBM; <sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária UFMG/EV; <sup>3</sup>Embrapa Agrobiologia, RJ.  
Barra Mansa, Rio de Janeiro, Brasil. Rua Vereador Pinho de Carvalho, nº267, (Entrada)  
Rua José Maria da Cruz Centro - Barra Mansa/RJ. Cep.: 27330-550

### Resumo

Na atual conjuntura da criação artificial de bovinos e bubalinos, o material genético masculino de qualidade superior de reprodutores é explorado ao máximo possível através da inseminação artificial em tempo fixo de um grande número de fêmeas com apenas um único ejaculado. Para isso, é necessário um sêmen de boa qualidade que desempenhe um papel indispensável na melhoria das taxas de fertilidade, independente de qual tipo seja utilizado (fresco, refrigerado e congelado). Porém, o processo de congelamento/descongelamento causa uma série de injúrias aos espermatozoides, ocasionando resultados inferiores para percentuais de viabilidade espermática, motilidade, membrana plasmática e integridade acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, cinemática do esperma, quando comparado ao sêmen refrigerado. Assim, o objetivo desta revisão é disseminar o conhecimento sobre o uso sêmen refrigerado na preservação de germoplasma de reprodutores bovinos e bubalinos para melhorar as taxas de concepção em propriedades. Para isso, serão abordados comentários sobre o armazenamento do sêmen refrigerado, com ênfase nas diferenças entre curvas de refrigeração, suas vantagens e desvantagens relativas para procedimentos de uso na IATF, identificando o método mais indicado por diversos autores, o estado atual da biotécnica, seus méritos e possibilidades futuras.

**Palavras-chave:** refrigeração de sêmen, diluidores, inseminação artificial em tempo fixo.

### Abstract

*In the current conjuncture of the artificial creation of bovines and buffaloes, the male genetic material of superior quality of sires is exploited to the maximum possible through the fixed-time artificial insemination of a large number of females with only a single ejaculate. For this, a good quality semen is needed that plays an indispensable role in improving fertility rates, regardless of which type is used (fresh, chilled and frozen). However, the freezing/thawing process causes a series of injuries to spermatozoa, causing lower results for percentages of sperm viability, motility, plasma membrane and acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, sperm kinematics, when compared to refrigerated semen. Thus, the objective of this review is to disseminate knowledge about the use of chilled semen in the preservation of germplasm of bovine and buffalo breeders to improve conception rates in properties. For this, comments on the storage of refrigerated semen will be addressed, with emphasis on the differences between refrigeration curves, their relative advantages and disadvantages for procedures for use in FTAI, identifying the method most indicated by several authors, the current state of biotechnics, its future merits and possibilities.*

**Keywords:** chilled semen. extenders. fixed-time artificial insemination.

### Introdução

Desde a domesticação dos animais, ocorrida entre 10.500 a 12.000 a.C. (Dunlop e Williams, 1996), até o presente, várias transformações ocorreram na abordagem da reprodução animal. Iniciando com a prática de levar o reprodutor (touro) para cobrir as fêmeas (vacas) para realizar o acasalamento, como era comum na Europa até a década de 40, posteriormente com o descobrimento da inseminação artificial (IA) realizada pela primeira vez de forma empírica por um *sheik* árabe em 1322 e sendo realizada de forma científica em uma cadela por Lázaro Spallanzani em 1780 (Severo, 2013).

<sup>1</sup>Correspondência: jaciveterinariorj@gmail.com

Recebido: 10 de abril de 2021

Aceito: 24 de abril de 2023



Segundo Moore e Hasler (2017) foi também Lázaro Spallanzani que demonstrou em um relatório de 1803, que o esperma poderia sobreviver a baixa temperatura. Isto porque, o armazenamento de sêmen *in natura* e não diluído a 5 °C mantido em gelo, era suficiente para reduzir o metabolismo do esperma e estender sua sobrevivência, normalmente por 2 a 4 dias (Walton, 1926; Edwards et al., 1938), dando início ao uso do sêmen refrigerado nas IAs para diversas espécies de animais.

Ivanoff (1922) reportou que uma única ejaculação continha espermatozoides suficientes para até centenas de inseminações, mas apenas 10 a 20 inseminações eram possíveis com sêmen não diluído. A necessidade de otimizar o uso dos ejaculados, fez com que pesquisas buscassem encontrar maneiras de resolver o problema. Assim, em 1939 foi desenvolvido um tampão de fosfato com gema de ovo como diluidor de sêmen (Phillips, 1939). Posteriormente, Thacker e Almquist (1953) relataram que o leite fervido poderia substituir a gema de ovo como meio diluidor de sêmen, com fertilidade comparável ao tampão fosfato com gema de ovo. Os diluidores de sêmen eram diferentes dos meios utilizados anteriormente devido à sua capacidade de prolongar a motilidade e a fertilidade dos espermatozoides (Foote, 1978). No entanto, ainda na década de 1940, a descoberta da presença de microrganismos no sêmen ejaculado e suas implicações para a fertilidade aumentaram (Gunsalus et al., 1941; Prince et al., 1949) como consequência da maior incidência de crescimento de bactérias no sêmen armazenado com os nutrientes ricos da gema de ovo no meio diluidor. O efeito negativo de alguns microrganismos na fertilidade foi claramente demonstrado quando a adição de antibióticos (penicilina e estreptomicina) ao sêmen diluído com gema de ovo reduziu o crescimento bacteriano (Almquist et al., 1949) e aumentou as taxas de não retorno de 60 a 90 dias em 11 % (Foote e Bratton, 1950). A partir daí, a diluição do sêmen com adição de antibióticos tem sido a prática padrão adotada até o presente.

### Diferentes métodos de coleta de sêmen

Moore e Hasler (2017) reportaram que conforme a demanda por touros para IA começava a superar a oferta durante a década de 1940, os métodos para maximizar a coleta de sêmen receberam maior foco, ficando claro que a exposição dos touros a vários estímulos positivos era importante. Por exemplo, demonstrou-se que induzindo a excitação sexual em touros, permitindo longos períodos de tempo com o animal de montaria e algumas montas falsas antes da ejaculação, aumentava a concentração e a motilidade dos espermatozoides (Collins et al., 1951; Almeida et al., 2020a).

Segundo Bratton e Foote (1954) e Hafs et al. (1959) se tornou prática comum que o sêmen fosse coletado 2 a 3 vezes por dia em intervalos de 3 a 4 dias, notando-se que essa mudança tinha como principal efeito aumentar a produção de esperma. Por exemplo, o número de espermatozoides móveis coletados por semana era 60% maior sem perda de fertilidade, quando a coleta de sêmen aumentou de uma para duas vezes por período de oito dias. Assim, 30 bilhões de espermatozoides poderiam ser coletados por semana de touros Holandeses, “o suficiente para inseminar 3.000 vacas com 10 milhões de espermatozoides cada” (Moore e Hasler, 2017).

Dentre os vários métodos de coleta de sêmen, cronologicamente utilizados, tem-se o da coleta direta na vagina da fêmea, no qual segundo Ivanoff (1922) e Perry (1945), o sêmen era retirado da vagina em uma esponja ou bolsa já *in situ*, com uma colher ou seringa. Em seguida, tornou-se mais comum outro método alternativo, a coleta do ejaculado de touros após massagem transretal das ampolas e vesículas seminais, mas neste método contaminações das amostras com urina e baixas concentrações de esperma são problemas comuns (Case, 1925; Miller e Evans, 1934; Syllaa et al., 2015). Posteriormente, foi desenvolvida a vagina artificial (VA) para coleta de sêmen em cães, por Amantea em 1914, a qual foi modificada para uso com touros por pesquisadores na Rússia, na década de 1930. Esse método, muito eficiente e amplamente utilizado por longo tempo, possui a vantagem de manter os ejaculados com baixas taxas de contaminação e condições próximas à do ejaculado quando na cópula natural.

Um dos últimos métodos de coleta de sêmen desenvolvidos no final da década de 30, foi o da eletroejaculação (Gunn, 1936), sendo seu uso com touros relatado pela primeira vez em 1948 por Laplaud e Cassou, que obtiveram sêmen de touros através de um eletrodo bipolar retal, quando aplicaram corrente alternada de 30 volts e 700 miliampères (Severo, 2013). Esta técnica é usada, principalmente, com touros que não se adaptavam adequadamente à coleta de sêmen por monta natural, por não aceitarem a VA, em Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) e principalmente nas coletas à campo, devido a falta de tempo para realizar o condicionamento dos touros para coleta com VA.

No Brasil, a eletroejaculação é o método mais utilizado, especialmete, para touros *Bos indicus*, criados extensivamente a campo e que não estão condicionados à coleta por VA.



## Diluentes para armazenamento de sêmen a temperaturas refrigeradas

Moore e Hasler (2017) relataram que a capacidade de preservar a viabilidade do espermatozoide até a inseminação foi um grande avanço no estabelecimento da IA organizada, devido à difícil logística criada pela natureza das atividades em fazendas, principalmente nas de grande porte. Na atualidade a preservação do sêmen está bem definida em seus diferentes tipos (fresco, refrigerado e criopreservado) para a maioria das espécies de animais de produção. No entanto, as condições de fazenda, principalmente para as espécies bovina e bubalina, em algumas regiões ainda são bastante precárias em relação à estrutura física de currais e troncos para contenção, manejo e realização de biotécnicas reprodutivas, o que pode comprometer e/ou até mesmo impedir o seu uso.

Segundo Phillips (1939), os primeiros diluentes para armazenamento do sêmen em temperaturas refrigeradas foram significativamente influenciados pela descoberta da gema de ovo como um aditivo eficiente, aliado ao fosfato, principal componente tampão desses diluentes. Posteriormente, descobriu-se que também o citrato possuía capacidade tampão adequada, além de um período prolongado de sobrevivência de espermatozoides armazenados a 5 °C (Willett e Salisbury, 1942). A partir de então, o citrato tornou-se o sal de escolha para o diluidor, pois suas propriedades quelantes melhoravam a solubilidade das frações proteicas da gema do ovo. A gema de ovo tem sido o aditivo mais comum nos diluidores para preservar a fertilidade de espermatozoides bovinos (Melrose, 1962; Norman *et al.*, 1962) e bubalinos (Akhter *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2016b; 2020b). A fração fosfolipídica da LDL fornece proteção contra choque frio (Pace e Graham, 1974). Segundo Sahni e Mohan (1990) o uso de 1 e 2,5% de gema de ovo em diluente à base de TRIS para preservação de sêmen de búfalo a 5 °C mostrou melhor taxa de sobrevivência espermática durante o período de 72 horas.

Como resultado de experiências acumuladas, a partir da década de 1960 vários diluidores foram desenvolvidos para a refrigeração e criopreservação de sêmen dos animais de produção, principalmente ruminantes. Dentre eles citam-se para a refrigeração: o diluidor da Cornell University desenvolvido por Foote *et al.* (1960); Caprogen, à base de gema de ovo desenvolvido em 1965 (Shannon, 1965; Shannon *et al.*, 1984); INRA96® (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, França) à base de leite (Murphy *et al.*, 2018); Biociphos®, Optixcell®, Nutrixcell® e Bioexcell® (IMV, L'Aigle, France, diluidor à base de lecitina de soja), que tem sido rotineiramente usado para a criopreservação e preservação de sêmen bovino sob refrigeração (Stradaioli *et al.*, 2007), bubalinos (Akhter *et al.*, 2010, 2011 e Almeida, 2018) e ovinos (Kulaksiz *et al.*, 2012); AndroMed®, BoviFree® e Triladyl®, entre outros (Minitub, Berlim, Alemanha) e Bullexcell tem sido testados em várias espécies animais (Murphy *et al.*, 2017), entre outros.

No Brasil, nas últimas décadas, também foram desenvolvidos diluidores com alto padrão para sêmen refrigerado e congelado de várias espécies animais, como os produtos do laboratório BotuPharma Ltda (Botucatu, São Paulo, Brasil), para as espécies equina BotuSemen® (transporte), BotuSemen especial® (refrigeração), BotuSemen Gold® (refrigeração e transporte), BotuCrio® (congelamento) e BotuTurbo® (sêmen fresco e transporte); ruminantes: BotuBov® (resfriamento e congelamento, Borges-Silva *et al.*, 2019). Este último também pode ser uma alternativa eficiente para a criopreservação de sêmen da espécie bubalina, conforme resultados dos trabalhos realizados para esta espécie (Zorzetto, 2013, 2017; Almeida *et al.*, 2015, 2016a, 2017, 2018, 2020), mesmo não havendo indicação de bula pelo fabricante.

A água de coco tem sido utilizada como um bom diluente de sêmen para várias espécies, quais sejam: suínos (Aires e Toniolli, 2005), caprinos (Azevedo e Toniolli, 1999; Nunes e Salgueiro, 1999), ovinos (Braz *et al.*, 2003), bovinos (Alberti, 2004), caninos (Cardoso *et al.*, 2005), felinos (Silva *et al.*, 2007), macacos (Araújo *et al.*, 2007), humanos (Nunes, 1998) e bubalinos (Zorzetto *et al.*, 2013, 2017). Dessa forma, bons resultados têm sido obtidos com os diluidores desenvolvidos no Brasil por diferentes empresas, levando-se em conta o clima tropical e as raças de produção predominantes para cada espécie.

Outro resultado importante é o fato de o diluidor poder conter glicerol (em diferentes concentrações), sem afetar as taxas de prenhez (Papa *et al.*, 2015; Borges-Silva *et al.*, 2016; 2017). Isto é bastante significativo, uma vez que os diluidores comerciais utilizados para a criopreservação possuem o glicerol. Assim, médicos veterinários podem utilizar o diluidor comercial, que contém glicerol em sua composição, evitando o trabalho de preparo do meio na véspera das coletas e/ou necessidade de retirada do glicerol para a utilização em meios de refrigeração (Borges-Silva *et al.*, 2019). No entanto, geralmente se preconiza o uso de diluidores sem glicerol para a manipulação do sêmen refrigerado.

## Uso do sêmen para inseminação artificial



A primeira inseminação artificial bem-sucedida foi realizada por Spallanzani (1784) em um cão, que gerou três filhotes 62 dias depois (Foote, 2002). Mais de um século depois deste feito, em 1899, o cientista russo Ilya Ivanovich Ivanov desenvolveu métodos práticos de IA de caráter técnico-econômico, para espécies de produção (equina 1900, ovina 1901, bovina 1902 e aves 1902) realizadas em Moscou (Ivanoff, 1922). Durante este período os estudos eram voltados para o uso do sêmen *in natura* e produção de diluidores para transporte e armazenamento do sêmen refrigerado (Philips, 1939). Ainda segundo o autor, o sêmen *in natura* antes do seu uso era diluído em substâncias que poderiam ser desde simples soluções salinas aos mais complexos meios tamponantes, formulados para manter por um período de tempo determinado, os espermatozoides com potencial de fertilização. Porém o sucesso significativo com aplicação generalizada da técnica só foi possível após a descoberta da gema de ovo como protetor dos espermatozoides, contra o choque frio, durante o resfriamento (Philips, 1939).

Salisbury et al. (1941) melhoraram ainda mais o uso da gema de ovo como diluidor, suplementando-o com citrato de sódio e usando-o como um tampão para preservar ainda mais os espermatozoides a baixa temperatura. A gema de ovo quando adicionada a outras soluções como os fosfatos e citratos, catalase e até nitrogênio na forma de gás reduz o metabolismo espermático (Philips, 1939; Verberckmoes et al., 2005). E passados mais de oito décadas, desde a descoberta deste componente, a gema ainda é o componente mais utilizada na preparação de meios diluidores para sêmen.

Outro marco importante ocorreu quando Polge et al. (1949), descobriram o papel crioprotetor do glicerol para espermatozoides, tanto em baixas temperaturas quanto durante o processo de congelamento. Segundo Walters et al. (2009) outros avanços se seguiram na década de 1950 com a descoberta de diferentes diluidores, métodos de embalagem e outros procedimentos que melhoraram ainda mais o uso mundial da IA. No entanto, apesar de oferecer muitas vantagens e aplicações, a criopreservação induz danos às células, os quais ocorrem predominantemente na membrana plasmática e no acrossoma (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 1995 e Kardivel et al., 2009), com redução do metabolismo espermático para produção de energia e da motilidade progressiva, prejudicando o tempo de sobrevivência e a capacidade fecundante dos espermatozoides no sistema reprodutor feminino (Watson, 2000). Adicionalmente, a rápida passagem de água para dentro da célula pode causar ruptura da membrana (Watson, 1995; Holt, 2000), fato este minimizado no uso do sêmen refrigerado, por este não ser submetido ao processo de congelamento e descongelamento e, assim, sofrer menos lesões, resultando em uma maior viabilidade e um aumento da capacidade de fertilizar (Borges-Silva et al., 2015; Almeida et al., 2018, 2020a,b).

A IA foi a primeira tecnologia reprodutiva amplamente aplicada ao bovino, inicialmente na Rússia e na Dinamarca, no início dos anos 1900 (Ivanoff, 1922; Perry, 1945). A principal força motriz por trás da IA foi seu potencial para aumentar a taxa de ganho genético em populações de animais pelo uso difundido de touros com mérito genético de elite (Moore e Hasler, 2017). Ainda, na atualidade é a biotécnica reprodutiva mais utilizada para a reprodução de animais de produção em larga escala.

### Sêmen refrigerado

Segundo Bicudo et al. (2003), o sêmen refrigerado é aquele coletado, analisado, diluído e refrigerado, com a finalidade de proteger os espermatozoides durante a redução da temperatura a 5 °C, além de ter o diluidor acrescentado atuando para aumentar o volume seminal e facilitar seu fracionamento para maximização do número de doses por coleta.

A redução da temperatura a 5 °C também reduz o metabolismo espermático, o que contribui para a sobrevivência dos espermatozoides. Para ser economicamente útil na IA, o sêmen diluído deve ter um prazo de validade mínimo de 2 a 5 dias (Salisbury e Van Demark, 1961; Raheja et al., 2018), 2,5 a 3 dias (Vishwanath e Shannon, 2000; Dhami et al., 1994, Singh et al., 2012; Almeida et al., 2016b; Becerra, 2017; Almeida et al., 2020b; Cavalcante et al., 2020), 48 horas (Thacker e Almquist, 1953; Pinto et al., 2012; Severo, 2013; Almeida et al., 2018; Borges-Silva et al., 2019), 24 horas (Squires et al., 1999; Crespilho et al., 2012; Resende, Almeida, 2013; Papa et al., 2015; Resende et al., 2018a; Murphy et al., 2018; Borges-Silva et al., 2015; 2017; 2019; Almeida et al., 2015; 2016a; 2017; 2018; 2020a,b; 2021) e 3 a 5 dias (Yoshida, 2000; Raheja et al., 2018) para facilitar o transporte e o uso em locais distantes, mantendo a fertilidade espermática, sendo esse princípio orientador que levou à temperatura inicial de armazenamento de 5 °C para várias espécies, como a bovina (Salisbury e Vandemark, 1961; Shannon et al., 1984; Bucher et al., 2009; Crespilho et al., 2012; Resende, Almeida, 2013; Saha et al., 2014; Papa et al., 2015; Resende et al., 2018b; Borges-Silva et al., 2015; 2017; 2019; Pereira et al., 2019), bubalina (Dhami et al., 1994; Akhter et al., 2011; Singh et al., 2012; Becerra, 2017; Almeida et al., 2016b; 2018; 2020a; 2021), equina (Squires et al., 1999; Ball et al., 2001; Love et al., 2001; Aurich, 2008, Crespilho et al., 2013), caprina



(Salomon et al., 1979; Singh e Purbey, 1996; Pinto et al., 2012), ovina (O'Hara et al., 2010; Gil et al., 2011) e canina (Linde-Forsberg et al., 1991; Hori et al., 2017; Pignataro et al., 2020), entre outras.

Assim o sêmen refrigerado a 5 °C vem sendo utilizado para a IA em animais de produção (principalmente bovinos) em países como Nova Zelândia, Austrália e Irlanda (Borchardt et al. (2018). Todavia, nesses países existe o uso do sêmen refrigerado de bovino na rotina e de forma comercial. Assim, nos últimos anos, os trabalhos com sêmen refrigerado aumentaram em função da maior eficiência dos programas de IA direcionando para melhores índices de prenhez do gado leiteiro nesses países (Yang et al., 2018). Isto ocorreu principalmente pelas vantagens atribuídas a este tipo de sêmen, entre elas: possibilidade do uso de doses inseminantes com concentração reduzida (Bratton e Foote, 1954; Hafs et al., 1959; Brandão et al., 2003; Ball, 2005; Crespilho et al., 2009; Al Naib et al., 2011; Murphy et al., 2013 e Xu, 2014), otimização de touros de alto mérito genético, menor custo de armazenamento e praticidade para uso em IA (Vishwanath e Shannon, 2000; Verberckmoes et al., 2005 e Bucher et al., 2009), menos danos causados aos espermatozoides (Borges-Silva et al., 2015).

Um bom exemplo desse sucesso foi obtido pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), que possuía uma bem instalada Central de IA com prestação de serviço pioneiro na produção e distribuição do semen refrigerado para criadores paulistas. No entanto, em 1958 foi desativada, transferindo suas atividades para o Instituto de Zootecnia e Indústria Pecuária da FMVZ/USP, em Pirassununga, onde posteriormente foi extinta (Grunert et al., 2005).

### Diferenças entre equipamentos e curvas de refrigeração para sêmen

Diferentes sistemas de refrigeração (caixas térmicas com gelo ou geladeiras domésticas, e caixas de poliestireno), com taxas de refrigeração variáveis são usados para manipular o sêmen de touros bovinos (De Lima et al., 2010) e bubalinos no campo (Almeida et al., 2016b; 2018; 2020b), resultando em taxas de sucesso variáveis.

Abud et al. (2014) reportaram que apesar do baixo custo, o problema desses métodos é a falta de padronização da curva de resfriamento devido à grande variação no tamanho e espessura, tempo de uso, marca, modelo e condições de uso da caixa de isopor e geladeira, o que resulta em variações nos resultados. Diante desse fato, Dias et al. (2018) realizaram um estudo para comparar diferentes sistemas de congelamento do sêmen de touro a campo, no qual foi possível testar cinco diferentes métodos de refrigeração de sêmen. Para isso, foram utilizados ejaculados diluídos em BotuBov<sup>®</sup> até a concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL em palhetas de 0,5 mL. Após a diluição, as palhetas foram resfriadas a 5 °C em cinco sistemas de resfriamento: TK 4000<sup>®</sup> (Uberaba, Brasil) a uma taxa de resfriamento de - 0,25 °C/min (R1); TK 4000<sup>®</sup> a uma taxa de -0,5 °C/min (R2); refrigerador Minitube<sup>®</sup> (Minitube<sup>®</sup>, Tiefenbach, Alemanha), a uma taxa de -2,8 °C/min (R3); Botutainer<sup>®</sup> (Botutainer<sup>®</sup>, Botucatu, Brasil) em que os procedimentos foram realizados conforme indicação do fabricante (manter o gelo reciclável no freezer por pelo menos 24 h antes do uso e transferi-lo para o Botutainer<sup>®</sup> uma hora antes de inserir o sêmen nas palhetas), a uma taxa de -0,65 °C (R4), e refrigerador doméstico (Electrolux<sup>®</sup>, DC 45, 436 litros) regulado à temperatura de 5 °C, com os palhetas colocadas no terço proximal do refrigerador, taxa de resfriamento de -2,0 °C/min (R5). Ainda de acordo com os autores, após atingir 5 °C, as palhetas foram mantidas nesta temperatura por 4 h em todos os sistemas (tempo de equilíbrio). Os resultados evidenciaram uma preservação da viabilidade espermática, integridade da membrana e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular mais eficientes para os sistemas de refrigeração R1, R2 e R4.

Existem diversos outros modelos de recipientes refrigerados para o transporte de sêmen, nacionais e internacionais, com diferentes taxas de refrigeração, temperatura final e tempo máximo de armazenamento.

Dentre os modelos internacionais, pode-se citar: Equitainer I<sup>®</sup> e II<sup>®</sup> (Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA, USA); Expecta Foal<sup>®</sup> (Expecta, Parker, CO, USA); Bio Flite<sup>®</sup>; Lane STS<sup>®</sup>; Equine Express<sup>®</sup> (MP&J Associates, DeMoines, IA, USA); Foal Flight<sup>®</sup>; Celle<sup>®</sup> (Valle et al., 1999); Sarstedt<sup>®</sup>; Salsbro Box<sup>®</sup> (Raphael, 2007).

Entre os modelos nacionais, pode-se citar: Botu-Box<sup>®</sup>, Botutainer<sup>®</sup> e BotuFLEX<sup>®</sup>, fabricados pela Botupharma Biotecnologia Animal; Max Sêmen Express<sup>®</sup>, que é revendido pela E.H.G. Agrofarma. O Botu-Box<sup>®</sup> e Max Sêmen Express<sup>®</sup> têm temperatura final de aproximadamente 15 °C e tempo máximo de armazenamento de 24 h, enquanto o Botutainer<sup>®</sup> tem temperatura final de aproximadamente 5 °C e tempo máximo de armazenamento de 48 h. (Raphael, 2007), e o BotuFLEX<sup>®</sup> tem temperatura final tanto de 15 °C como 5 °C.



O Botutainer® é um dos sistemas de refrigeração mais conhecido no Brasil. Sua taxa de refrigeração inicial é de aproximadamente  $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ , mantendo uma temperatura final de aproximadamente  $4 - 6^{\circ}\text{C}$ , por período superior a 24 horas. De acordo com Monteiro *et al.* (2013), Crespilho *et al.* (2014), Moscardini *et al.* (2014) e Borges-Silva *et al.* (2016) esta caixa de transporte para sêmen refrigerado é eficiente para manutenção do sêmen viável após o resfriamento. No entanto, mesmo sendo muito resistente e poder ser reutilizado, seu alto custo de aquisição e a necessidade de retorno a fazenda de origem, podem dificultar sua utilização (Brinsko *et al.*, 2000).

Segundo Dias *et al.* (2018), é possível realizar a refrigeração e posteriormente congelamento com alta eficiência. No entanto, é necessário que sejam seguidas as recomendações andrológicas para cada espécie (CBRA, 2013) e que seja praticada por profissionais qualificados e comprometidos com um trabalho de boa qualidade.

### **Biotécnicas reprodutivas**

Desde a domesticação dos animais até a arrojada pecuária dos dias atuais (Pecuária de precisão ou 4.0), muitas técnicas de reprodução foram desenvolvidas, cronologicamente, IA, transferência de embriões (TE), produção *in vitro* de embriões (PIVE), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sexagem de gametas, transgenia, clonagem, desenvolvimento de marcadores moleculares para caracteres produtivos e transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) vêm sendo utilizadas nas diversas espécies de produção. No entanto, a IA ainda é a biotecnica reprodutiva mais utilizada no mundo e sua aplicação traz grandes benefícios aos rebanhos, quando comparada ao uso do serviço natural (Lima *et al.*, 2010; Lamb e Mercadante, 2016; Baruselli *et al.*, 2018), em razão da IA possibilitar o uso do sêmen de reprodutores geneticamente superiores (Oliveira *et al.*, 2013), acelerando o ganho genético e resultando em crias mais produtivas, que geram maior retorno econômico ao produtor de carne e de leite.

Outrossim, a IA impede a transmissão de doenças venéreas (Vishwanath, 2003) e possibilita melhor controle do rebanho, aumentando a uniformidade dos produtos quando comparados ao serviço natural (Rodgers *et al.*, 2015; Baruselli *et al.*, 2017). Dentre as biotécnicas reprodutivas já desenvolvidas, a IA é a que possui maior acessibilidade aos produtores, por ter valor mais baixo, ser de fácil execução e não necessitar de uma estrutura complexa e tão tecnificada como as demais (envolvendo laboratórios e profissionais com diversas expertises no campo da reprodução).

### **Fertilidade com o uso do sêmen refrigerado**

Demonstrações do potencial de preservar a viabilidade dos espermatozoides foram realizadas por Walton (1926), avaliando gestação em coelhas, em Edimburgo, Escócia, após inseminação com sêmen coletado 48 horas antes em Cambridge, Inglaterra. Também Edwards *et al.* (1938) avaliou gestação em vacas na Holanda após inseminação com sêmen coletado 57 horas antes na Inglaterra. Posteriormente, Phillips (1939) demonstrou que altos níveis de motilidade espermática foram mantidos por mais de 150 horas após a adição de uma mistura de igual volume de gema de ovo e solução tampão de fosfato ao sêmen armazenado de  $5$  a  $10^{\circ}\text{C}$ , com a taxa de gestação alcançada similar a aquela com o sêmen diluído e armazenado por até 180 horas. A substituição subsequente do tampão de fosfato por tampão de citrato alcançou a mesma capacidade de preservação, mas com o benefício adicional de dispersar glóbulos de gordura da gema de ovo (Salisbury *et al.*, 1941, Almeida, 2018). Ainda segundo os autores, esta característica melhorou muito a translucidez do sêmen armazenado e a capacidade de examinar os espermatozoides microscopicamente e principalmente no atual sistema CASA.

Inicialmente a substituição do sêmen refrigerado pelo sêmen congelado foi um grande avanço, pois permitiu o armazeneto por vários anos, utilizar material de animais que já morreram, programar a utilização do sEmen no caso da IATF e acesso a material genético superior por produtores com menor poder aquisitivo. Embora o processo de congelação tenha se tornado rotina na indústria de IA (Chen *et al.*, 1993), os espermatozoides não conseguem sobreviver neste processo em número considerável (Nagy *et al.*, 2004). Em geral, os resultados de criopreservação demonstram um decréscimo de 50 a 60% na viabilidade da população espermática pós-descongelamento (Gravance *et al.* 1998; Yoshida, 2000) por causa de diversas alterações bioquímicas e estruturais ocorridas nestas células e uma redução substancial do número e da qualidade dos espermatozoides (Schuh, 1988; Watson, 1995; Den Daas e De-Jong, 1998; Gravance *et al.*, 1998; Yoshida, 2000; Watson, 2000; Rasul *et al.*, 2001; Carneiro *et al.*, 2007; Celeghini *et al.*, 2008). Observa-se, ainda, que pode ocorrer uma redução drástica na fertilidade dos espermatozoides da maioria das espécies mamíferas (Vidament, 2005; Borges-Silva *et al.*; 2017; Almeida *et al.*, 2015; 2016a; 2020a).



Luz *et al.* (2000), em trabalho a campo, observaram que os índices de gestação obtidos estão relacionados com a motilidade espermática pós-descongelamento. Os autores ressaltaram que, após a descongelamento, o índice de motilidade espermática deve ser superior a 40% visando obter taxa de gestação superior a 50%, enquanto motilidade espermática inferior a 40% reduz para 15% o percentual de fêmeas ovinas gestantes.

Diversos trabalhos têm demonstrado uma expressiva parcela de reprodutores em que os ejaculados se mostram intolerantes ao processo de criopreservação, apresentando significativa queda na fertilidade espermática após o processamento, com especial destaque para a espécie equina (Ball, 1998; Batellier *et al.*, 2001; Backman *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2015), suína (Gil *et al.*, 2008); caprina (Carneiro *et al.*, 2007) e bubalina (Oba *et al.*, 1993; Wall e Foote, 1999; Sansone *et al.*, 2000; Rasul *et al.*, 2000 e 2001, Lamirande e O'Flaherty, 2008; Adeel *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2020a). Por outro lado, a congelamento representa um processo mais oneroso em relação à IA utilizando sêmen refrigerado, que pode ser utilizado como método adicional para propagação de material genético em bovinos (Crespilho *et al.*, 2012; Resende e Almeida, 2013; Borges-Silva *et al.*, 2015; 2017 e 2019; Borchardth *et al.*, 2018 e Resende *et al.*, 2018), bubalinos (Sing *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2015; 2016; 2017; 2020a; 2021), Caprinos (Salomon *et al.*, 1979; Singh e Purbey, 1996; Pinto *et al.*, 2012).

A explicação mais plausível para a redução de fertilidade se deve ao fato dos espermatozoides de diferentes espécies possuírem propriedades criobiológicas específicas e graus de sensibilidade variados para manipulação experimental, choque térmico (transições da fase lipídica), congelamento e tolerância osmótica (Ladha, 1998; Watson, 2000; Purdy, 2006; Henry e Echeverri, 2013; Sieme *et al.*, 2016). Além de diferenças espécies-específicas, são observadas variações entre indivíduos (Nogueira *et al.*, 2019), ejaculados de um mesmo indivíduo e dentro de um mesmo ejaculado, variações entre subpopulações espermáticas (Rodríguez-Martínez, 2003; Mendonza *et al.*, 2012; Ferraz *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2017) o que pode explicar as respostas diversificadas à criopreservação do sêmen de um mesmo reprodutor (Petrunkina, 2007).

Segundo Salisbury *et al.* (1978) e Rycroft e Bean (1992) outras condições que comprometem o percentual de fertilidade do espermatozoide são: o método de coleta de sêmen, técnicas de processamento, embalagem do espermatozoide, transporte e envelhecimento antes do uso, a habilidade do inseminador e fatores ligados ao manejo relacionados à fêmea e ao rebanho.

Na última década houve uma necessidade de aumentar as taxas de fertilidade a fim de tornar a pecuária eficiente e competitiva frente ao aumento no custo dos insumos e a queda na fertilidade das fêmeas em produção (principalmente as de alta produção leiteira). Neste contexto, diversos pesquisadores retomaram os estudos com o sêmen refrigerado, principalmente com o crescimento da utilização dos protocolos de IATF para bovinos (Resende e Almeida, 2013; Papa *et al.*, 2015; Borges-Silva *et al.*, 2015; 2017; Resende *et al.*, 2018) e bubalinos (Almeida *et al.*, 2015; 2016b; 2017; 2020a), entre outras, uma vez mais comprovando sua eficácia e obtendo aumento do percentual de gestações quando comparado com o sêmen congelado.

### **Resultados do uso de sêmen refrigerado vs. congelado na IATF**

Segundo Lamb *et al.* (2010) e Wiltbank *et al.* (2010) o uso da IA em unidades produtivas de bovino tem aumentado nos últimos anos, principalmente por causa do desenvolvimento de protocolos que satisfatoriamente sincronizam a onda folicular ovariana em desenvolvimento e a ovulação, o que possibilita a IATF. Neste contexto, o principal limitante no uso da IA que seria a detecção de estro fica resolvido. No entanto, apesar dos evidentes avanços na produção de bovinos de corte e de leite conferidos pelo desenvolvimento comercial da IATF, a taxa de gestação média esperada é estimada entre 40 a 50%. Segundo Nogueira *et al.* (2019) diversos fatores podem estar relacionados a esses resultados, destacando-se aqueles inerentes à fêmea, como o anestro pós-parto e a baixa condição corporal no início dos protocolos (Almeida, 2018), além de outros fatores inerentes à qualidade do sêmen utilizado nos programas, tais como os padrões de mobilidade espermática, integridade de membrana plasmática e dose inseminante utilizada.

Para a obtenção de índices reprodutivos elevados e economicamente satisfatórios, além de uma boa rentabilidade na produção para o emprego das biotécnicas da reprodução é fundamental conhecer a fisiologia reprodutiva da espécie animal que está se trabalhando (bovino, bubalino, ovino, caprino, suíno, canino, etc). Entretanto, no tocante às fêmeas, a dificuldade de identificação do estro e a determinação do melhor momento para a realização da IA devido a períodos variáveis de aceitação da monta (Baruselli *et al.*, 2009; Porto-Filho *et al.*, 2014), somadas ao balanço energético negativo (expresso através do escore de condição corporal, Almeida, 2018), sobretudo no período pós-parto, são condições que confluem na



determinação dos quadros de anestro, comumente observados em vários rebanhos. O anestro pós-parto determina o aumento do intervalo de partos, 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 fêmeas é inseminada a cada ano (Crespilho, 2010; Almeida, 2018). Esta situação torna-se ainda mais grave quando se trabalha com a espécie bubalina, que além de todas as dificuldades e limitações para realização da IA mostradas para a espécie bovina, possui ainda a questão da sazonalidade (Hafez, 1954; Gill et al., 1973; Vale, 1988; Beg e Totey, 1999; Zicarelli e Vale, 2002; Almeida et al., 2015; 2017; 2020c).

Nesse contexto, a instauração da IATF, utilizando sêmen refrigerado de bovinos (Crespilho et al., 2012; Resende e Almeida, 2013; Borges-Silva et al., 2015; 2016; 2017; Resende et al., 2018ab; Borges - Silva et al., 2019; 2020) e bubalinos (Almeida et al., 2015; Almeida et al., 2016a; Almeida et al., 2017; Almeida, 2018; Almeida et al., 2020c; 2021), representa uma alternativa viável e promissora para melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos porque não há necessidade de detecção de estro. Desta forma, o tempo de coleta e momento da inseminação podem ser agendados, aproximadamente, em conjunto com a expectativa de ovulação. Nos crescentes programas de IATF é substancialmente possível inseminar um grande número de vacas e novilhas no mesmo dia, o que possibilita o armazenamento do sêmen refrigerado por período mais curto e ainda aumenta a utilização de um único ejaculado. Nesse caso, a preservação da viabilidade espermática durante o período de 24 a 48 horas seria suficiente para o transporte e utilização em fazendas longe de onde os touros são mantidos (Crespilho et al., 2012; Almeida et al., 2018). Tal procedimento pode ser empregado com sucesso, pois é sabido a mais de quatro décadas que o sêmen fresco ou refrigerado, envolvendo várias espécies animais, possui uma maior viabilidade no trato reprodutivo feminino em comparação com o sêmen criopreservado (New Zealand Dairy Board, 1977; Curry, 2000; Borchardt et al., 2018), proporcionando melhores taxas de fertilidade e de gestação (Almeida et al., 2015; 2016a; 2017).

Diversos trabalhos, utilizando o sêmen refrigerado a 5 °C na IATF por 24 horas para bovinos, verificaram aumento significativo nas taxas de gestação, comparado ao sêmen criopreservado, respectivamente [(61,49% vs. 45,71%) Crespilho et al., 2012; (68,0% vs. 45,3%) Resende e Almeida, 2013; (51,0% vs. 41,0%) Papa et al., 2015; (59,9% vs. 49,4%) Borges-Silva et al., 2016; (64,5% vs. 44,7%) Resende et al., 2018b].

Resultados também promissores foram encontrados para a espécie bubalina, quando do uso do sêmen refrigerado a 5 °C vs. sêmen congelado (54,5% vs. 31,7%) Almeida et al., 2016a; (55,6% vs. 44,4%) Almeida et al., 2017; (57,8% vs. 31,1% - período cíclico) Almeida et al., 2020c e (48,2 vs. 34,6% - período acíclico) Almeida et al., 2021. No entanto, há trabalhos com resultados similares como o estudo envolvendo novilhas Nelore sincronizadas para IATF e inseminadas com sêmen resfriado e congelado, onde obtiveram-se taxas de 48,9 e 46,9%, respectivamente (Fujita et al., 2013) e o trabalho de Silva et al. (2013) que obteve resultado superior para taxa de concepção em vacas Nelore lactantes quando utilizou-se o sêmen congelado em relação ao refrigerado, obtendo 42,1 e 40,0%, respectivamente.

Mais recentemente Almeida et al. (2020a) reportaram em estudo para avaliar a fertilidade do sêmen de búfalos para produção de embriões *in vitro* (PIVE), comparando a eficácia do sêmen refrigerado a 5 °C/24 horas *versus* congelado, utilizando o mesmo ejaculado fracionado para os dois tratamentos, uma taxa de embriões produzidos de 30 vs. 17%, para os tipos de sêmen refrigerado e congelado, respectivamente. Mais uma vez o sêmen refrigerado se apresenta como uma alternativa promissora para aumentar a eficiência reprodutiva, ainda mais em uma espécie em que os resultados de PIVE são inferiores aos obtidos com bovinos (Salzano et al., 2018; Baruselli et al., 2020).

Mas é importante frizar que esses resultados são difíceis de comparar, uma vez que utilizaram diferentes protocolos de IATF, categorias animais diversas (nulíparas, primíparas e múltíparas), escore de condição corporal (ECC), tamanho de lote, inseminadores e qualidade de sêmen (Silva et al., 2017b). Adicionalmente, concentrações espermáticas diversas, diluidores, épocas do ano (inverno e verão), raças diversas de uma mesma espécie seja ela bovina ou bubalina, e no caso da espécie bubalina (animais em período reprodutivo favorável “ciclando” e período reprodutivo desfavorável “anestro”), o que demanda protocolos hormonais com fármacos diferentes, isto sem falar na região ou estado onde os estudos foram realizados, e as diversas equipes envolvidas.

### **Impacto econômico do uso do sêmen refrigerado**

O Brasil possui grande relevância mundial, por ser o quinto maior país em extensão territorial e possuir o maior rebanho bovino comercial do mundo, com 221,81 milhões de cabeças (IBGE, 2018) atingindo em 2018 a marca de 15,4 milhões de doses de sêmen comercializadas (ASBIA, 2019). Em relação



à população bubalina, existem no mundo mais ou menos 200 milhões de cabeças (Pirondi et al., 2019), sendo que no Brasil existem aproximadamente 1.434.141 cabeças (IBGE, 2019).

Segundo Saud (2019) as estatísticas do mercado de material genético de bovinos sinalizam uma mudança positiva, mesmo que em uma intensidade menor que a desejada, para uso da IA na pecuária brasileira. Ainda de acordo com o autor, nos principais estados produtores de leite, a técnica de IA é aplicada entre 9 e 15% das fêmeas em idade reprodutiva, sendo 7,3% a média nacional conforme apontou a ASBIA (2019). Já para a espécie bubalina apenas 1% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas (IBGE, 2016). Porém com o aumento das IATFs realizadas na espécie nos últimos anos, acredita-se que esse percentual chegue a pelo menos 2%.

Nos últimos anos, estudos têm indicado que os métodos tradicionais de detecção de estro raramente conseguem índices de eficácia acima de 50 a 70%, com isso, muitas das vacas em estro não são inseminadas. Quando se utilizam protocolos de IATF intensivamente em rebanhos leiteiros é observada diminuição dos intervalos de partos (IEP) e a primeira IA, e entre o parto e concepção (Baruselli et al., 2017). Com isso, reduz-se a média de intervalo de partos (atualmente a média nacional é de um bezerro a cada um ano e meio), conseguindo, assim, atingir a condição ideal de um bezerro por ano. Numa propriedade onde o IEP é reduzido para 12 meses, temos uma lactação a mais a cada período de 3 anos, ou seja, 50% de aumento de produção leiteira por ano. Ter mais bezerras produzidos significando mais animais para venda ou para reposição no rebanho. Outro ganho financeiro pode vir da concentração dos partos nos períodos de entressafra leiteira e de corte, época quando estes produtos atingem melhor preço de mercado.

Neste contexto, estudos realizados com sêmen bovino na Austrália e Nova Zelândia (Verberckmoes et al., 2005), Alemanha (Borchardt et al., 2018), Brasil (Borges-Silva et al., 2015; 2017), têm indicado a possibilidade do uso e comercialização de sêmen bovino na forma líquida “fresco ou sob refrigeração”. Isso porque o uso desta biotécnica tem aumentado as taxas médias de gestação, sendo cada vez mais satisfatórias, comparada ao uso do sêmen congelado. Neste contexto, face aos resultados obtidos em pesquisas com a espécie bubalina, este tipo de sêmen também poderia contribuir bastante para a melhoria dos índices reprodutivos dos rebanhos e, conseqüentemente, tornar as propriedades e produtores mais competitivos.

Murphy et al. (2013) relataram que o sêmen refrigerado possui a vantagem distinta sobre o sêmen congelado-descongelado, pois a diluição ou redução da concentração espermática por dose (aproximadamente 3-5 milhões de espermatozoides “resfriado” vs. 15-20 milhões “congelado convencional”) possibilita quadruplicar o número de doses de sêmen por ejaculados a serem produzidas. Portanto, o uso do sêmen refrigerado maximizaria o número de palhetas de inseminação produzidas por ejaculado em comparação com o sêmen congelado (Murphy et al., 2018).

Borchardt et al. (2018) reportaram que o sêmen refrigerado representa apenas 5% da IA mundial, predominantemente em sistemas de criação de leite sazonais, como Nova Zelândia, Austrália e Irlanda. No entanto, aqui no Brasil, seu uso em grande escala terá um grande impacto nas fazendas de gado de corte, onde estas por já utilizarem reprodutores melhoradores e de genética superior, podem ainda com o uso do sêmen refrigerado reduzir custos de produção, intervalos de partos e outros, conforme já mencionados por Borges-Silva et al. (2017).

O custo do processo de produção do sêmen refrigerado não foi ainda reportado em nenhum trabalho referente ao tema. No entanto, o valor praticado para o sêmen congelado nas propriedades pelos veterinários em média é R\$ 5,00/dose, sem contabilizar nesse valor o custo com nitrogênio, raques, palhetas, deslocamento, alimentação e o valor diário dos serviços veterinários que variam muito de acordo com a região onde o serviço será realizado. No entanto, com apenas 13-15% e 1-2% das fêmeas em idade reprodutiva (bovinas e bubalinas, respectivamente) sendo inseminadas no Brasil, adicionalmente com taxas de 10 a 20% ou mais de gestação utilizando o sêmen refrigerado comparado ao congelado, espera-se que haja um grande mercado a ser explorado. Essa situação, além de trazer lucros para os produtores de bovinos bubalinos, também poderá demandar um grande efetivo de profissionais veterinários capacitados e especializados em reprodução animal. Todavia, para que essa técnica seja eficiente, além do “know-how” do profissional, é necessário trabalhar com animais de genética superior e comprovada, livres das doenças da esfera reprodutiva, seguir as recomendações do CBRA (2013) e com fazendas que possuam estrutura e funcionários qualificados e empenhados em fazer um bom trabalho em prol da reprodução cada vez mais eficiente. E, por último, mas não menos importante, lembrar que o sêmen refrigerado, assim como o congelado em fazendas não podem ser comercializados, conforme normas estabelecidas pelo MAPA. Neste contexto, essa condição *sine qua non* é necessária para uma viabilidade sanitária e econômico-financeira da pecuária.



Baruselli (2019a) reportou que no ano de 2018, a IATF gerou aproximadamente R\$ 3,5 bilhões de ganhos para a cadeia de produção de corte e de leite brasileira. Em outro estudo, Baruselli (2019b) informou que a IATF movimentou R\$ 796 milhões para a sua execução no Brasil no ano de 2018, com a prestação de serviço médico veterinário correspondendo a 33% do valor para execução da IATF (R\$ 265,2 milhões), considerando o custo de R\$ 20 por animal sincronizado. Ainda segundo o autor, as empresas de venda de sêmen e fármacos representam 66% (R\$ 796 milhões) do valor total, considerando 13,3 milhões de IATFs efetuadas no ano a preço médio de R\$ 20 para os fármacos de sincronização e R\$ 20 para dose de sêmen congelado.

Até o momento não há estudos sobre o custo final do uso do sêmen refrigerado na IATF. No entanto, com a redução de custos de armazenamento, de intervalo de partos, antecipação e concentração da concepção no início da estação de monta, facilidade de uso por veterinários de campo que trabalham com reprodução, somado ao aumento de 20% ou mais nas taxas de gestação, é promissor que será de grande valia para tornar as propriedades mais eficientes no quesito produtividade, reprodutividade e competitividade. Isto porque, a principal diferença não está no custo entre os dois tipos de sêmen (refrigerado e congelado), mas sim nos resultados de aumento de taxa de prenhez observado na maioria dos trabalhos realizados para as espécies bovinas e bubalinas.

### **Perspectivas futuras**

É possível considerar como reflexão, algumas áreas nas quais focar a pesquisa e a discussão no futuro, entre elas: a palheta específica (PE) para acondicionamento do sêmen refrigerado, a qual segundo Borges-Silva *et al.* (2020) é confeccionada com um material que não possibilita a troca de oxigênio com o meio externo, podendo, em teoria, melhorar a qualidade espermática, por evitar a produção de espécies reativas de oxigênio o que comprometeria a membrana espermática e a viabilidade celular. No entanto, os autores reportaram que em um teste de campo utilizando sêmen refrigerado a 5 °C por 24 horas (envasado em palhetas comuns e PE para sêmen refrigerado), não observaram diferença estatística ao inseminar 196 matrizes (98 para cada tipo de palheta). Mas os autores ressaltam que, eventualmente, com maior número de animais inseminados a diferença estatística possa ocorrer.

Pesquisas envolvendo métodos adicionais de armazenamento prolongado de espermatozoides, como a liofilização; metodologia adicional para separar células espermáticas por sexo para uso também com o sêmen refrigerado; melhor compreensão do microbioma no ambiente uterino no desenvolvimento embrionário, e verificar o custo-benefício do uso do sêmen refrigerado utilizado na IATF em diferentes condições de uso, entre outras, vindo tudo em associação com as contínuas descobertas e aplicação da genômica, nanômica e proteômica, certamente trará melhores índices reprodutivos para a pecuária.

### **Considerações finais**

Assim como reportado por Shannon em 1968, na atualidade, o uso do sêmen congelado possui características que o tornam menos competitivo em relação ao sêmen refrigerado, sendo elas: menores taxas de concepção e investimento muito maior em equipamentos de laboratório. Considera-se que mesmo sendo o sêmen de reprodutores geneticamente superiores, nem todo sêmen pode ser congelado, além de que o congelamento e armazenamento de sêmen a baixas temperaturas aumenta consideravelmente os custos de manutenção de máquinas e instrumentos.

Especula-se que havendo uma rede de distribuição quase diária confiável do sêmen refrigerado e, com essa rede estabelecida, o modelo de sêmen refrigerado pode ser muito valioso para a IATF nas fazendas principalmente de gado de corte, uma vez que estas já possuem touros melhoradores. Se a distribuição do sêmen refrigerado funcionava satisfatoriamente a mais de cinco décadas atrás, quando os meios de transporte e comunicação eram bem precários e em algumas regiões inexistentes, porque não funcionaria na atualidade com todas as possibilidades de transporte existentes (correio, empresas de entrega, transporte terrestre, aéreo, motoboys, etc), e comunicação em tempo real (via telefones, aplicativos, sites, mensagens, vídeo chamadas, etc).

Com esta revisão não se teve a pretensão de sugerir a substituição do sêmen congelado pelo refrigerado, pois ambos têm suas características e espaço onde ser utilizado. Buscou-se, principalmente, apenas considerar uma outra alternativa para melhorar os índices zootécnicos das propriedades que utilizam a IA. Observa-se que em condições de fazenda de multiplicação de proteína animal de alta qualidade, um incremento nas taxas de gestação de 20% ou mais, podem gerar maior lucro, tornar a propriedade mais



competitiva e o simples incremento na taxa de gestação poderia, dependendo do número de animais utilizados na IATF, pagar todos os custos com os protocolos hormonais.

Mas é importante mencionar que segundo a Instrução Normativa MAPA Nº 36, de 27 de outubro de 2015 (MAPA, 2015), somente poderá ser distribuído no Brasil o sêmen bovino ou bubalino coletado em centros de coleta e processamento de sêmen - CCPS, registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que cumprem os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no país. Isto significa que o sêmen coletado e processado em fazendas particulares, somente poderá ser utilizado pelo produtor e não é permitida sua comercialização. Cabe ressaltar que as coletas de sêmen realizadas em fazendas, sem fins comerciais, apenas para uso particular, devem ser realizadas somente por médicos veterinários. Isto porque, o veterinário é o profissional qualificado para realizar as avaliações do reprodutor, seu material genético e ainda realizar exames sanitários e coleta de material a ser enviado aos laboratórios, com o intuito de impedir a propagação de doenças da esfera reprodutiva e zoonoses. Dentre os exames sanitários das principais doenças a serem realizados, tem-se: brucelose, tuberculose, tricomonose, compilobacteriose, leptospirose, diarreia viral bovina e rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, que podem comprometer a reprodução ou a saúde humana. Adicionalmente, podem ser realizados exames bacteriológicos e virológicos no sêmen antes da sua utilização. Consequentemente, diferentemente da monta natural, o uso da IA reduz consideravelmente o risco da transmissão de doenças reprodutivas nos rebanhos.

### Referências

- Abud COG, Abud LJ, Neto JCO, Dode MAN, Sereno JRB, Martins CF.** Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de semen bovino. *Ciência Anim Bras*, v.15, p.32-37, 2014.
- Adeel M, Ijaz A, Aleem M, Rehman H, Yousaf MS, Jabbar MA.** 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 FP, Tonioli R.** Congelamento/descongelação e conservação de semen suíno. In: Reunião Anual da SBPC, 57, 2005, Fortaleza, CE. Anais... São Paulo: SBPC/UECE, 2005.
- Akhter S, M, Ansari B, Rakha S, Andrabi S, Ullah N.** Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology*, v.74, p.951-955, 2010.
- Akhter S, Ansari MS, Rakha BA, Ullah N, Andrabi S M H, Khalid M.** *In vitro* evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5°C diluted in soya-lecithin based extender (Bioxcell®), Tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. *Reprod Dom Anim*, v.46, p.45-49, 2011.
- Alberti K.** Congelamento do semen bovino: novos enfoques em meios diluentes. 2004. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual de São Paulo, FMVZ, Botucatu, SP, 2004.
- Almeida J.** Semen refrigerado e seu potencial de uso na inseminação artificial de búfalas (*Bubalus bubalis*). 195f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2018.
- Almeida J, Brito MF, Becerra VAB, Neves BP, Auler PA, Haddad JP, Henry M.** Effectiveness of testis or tris association with low density lipoprotein on in vitro longevity of refrigerated buffalo semen. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.72, n.3, p.729-736, 2020b.
- Almeida J, Brito MF, Auler PA, Moraes CML, Andrade GO, Neves BP, Baruselli PS, Henry M.** Avaliação das taxas de prenhez em búfalas com o uso de semen refrigerado vs. congelado em programas de IATF durante a estação reprodutiva desfavorável. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 21, p.99, 2015, Belo Horizonte, MG. Anais...Belo Horizonte: CBRA, 2015.
- Almeida J, Brito MF, Neves BP, Becerra VAB, Auler PA, Baruselli PS, Henry M.** Evaluation of pregnancy rates in milk buffaloes submitted to FTAI with Ovsynch or P4/E2 and eCG based protocols with refrigerated or frozen semen during favorable or unfavorable breeding season. Abstracts, In: 34<sup>th</sup> ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE), *Anim Reprod*, v.17, n.3, 2020c.
- Almeida J, Brito MF, Neves BP, Becerra VAB, Auler PA, Hadad JP, Baruselli PS, Henry M.** Use of cooled buffalo semen as a strategy to increase conception rates in fixed-time artificial insemination programs during unfavorable reproductive periods. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.73, n.03, May-Jun, 2021.
- Almeida J, Brito MF, Neves BP, Auler PA, Dutra P, Silva DF, Cunha LB, Oviedo PA, Baruselli PS, Henry M.** Avaliação das taxas de prenhez em búfalas primíparas submetidas a IATF com semen refrigerado vs. congelado durante a estação reprodutiva desfavorável. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Recife, PB, 2017.



- Almeida J, Neves BP, Brito MF, Freitas RF, Lacerda LG, Grapiuna LS, Haddad JP, Auler PA, Henry M.** Impact of *in vitro* fertilization by refrigerated versus frozen buffalo semen on developmental competence of buffalo embryos. *Anim Reprod*, v.17, n.4, p.1-11, 2020a.
- Almeida J, Neves BP, Brito MF, Auler PA, Becerra VAB, Baruselli PS, Henry M.** Pregnancy rates of buffaloes (*Bubalus bubalis*) using cooled or frozen semen at fixed time artificial insemination (FTAI) - Preliminary results. In: XI Congresso Mundial de Búfalos - Cartagena - Colômbia, Med Vet y Zootec, Septiembre/Diciembre, 2016a.
- Almeida J, Becerra VAB, Neves BP, Auler PA, Andrade GO, Brito MF, Henry M.** Refrigeração de semen bubalino (*Bubalus bubalis*) frente a diferentes extensores e avaliação da motilidade espermática no CASA. Proceedings of the 30th Annual of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), Foz do Iguaçu, PR, Brazil. August 25th to 27th, 2016, and 32th Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE), Barcelona, Spain, Septiembre 9th and 10th, 2016. Abstracts. *Anim Reprod*, v.13, n.3, p.557, Jul./Sept., 2016b.
- Almeida J, Neves BP, Brito MF, Becerra VAB, Auler PA, Henry M.** Avaliação da longevidade espermática em semen de búfalos (*Bubalus bubalis*) refrigerado à 5°C. *Anais da III Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal*. 1ªed., Editora UFMS, p.72-76, 2018.
- Almquist JO, Glantz PJ, Shaffer HE.** The effect of a combination of penicillin and streptomycin upon the livability and bacterial content of bovine semen. *J Dairy Sci*, v.32, p.183-190, 1949.
- Al Naib A, Ward F, Kelly AK, Wade M, Marti JI, Lonergan P.** Effect of duration of storage at ambient temperature on fertilizing ability and mucus penetration ability of fresh bovine sperm. *Theriogenology*, v.76, p.1070-1075, 2011.
- Araújo LL, Oliveira KG, Lima JS, Pantoja PSP, Araújo JB, Domingues SFS.** Preservação de semen de *Cebus apela* (macaco-prego) em diluidor à base de água de coco a 37°C. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2007.
- Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA).** Index ASBIA Mercado, 2019. Disponível em: <https://www.lancerural.com.br/vendas-de-semen-bovino-crecem-no-1o-semester-de-2018/presidente-da-asbiasergio-saud-anuncia-aumento-nas-vendas-de-semen/>. Acesso em: 20/03/2019.
- Aurich, C.** Recent advances in cooled-semen technology. *Anim Reprod Sci*, v.107, p.268-275, 2008.
- Azevedo DMMR, Toniolli R.** Água de coco estabilizada suplementada com antibióticos e ácido 3-indol acético na conservação de semen de caprinos marota. *Ciênc Anim*, v.9, p.37-42, 1999.
- Backman T, Bruemmer JE, Graham JK, Squires EL.** Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *J Anim Sci*, v.82, p.690-694, 2004.
- Ball BA.** Hysteroscopic and low-dose insemination techniques. In: Congresso Nazionale Multisala Sive, 11, 2005, Pisa. *Proceedings...* Pisa, 3p., 2005.
- Ball BA.** An introduction to the use and application of cryopreserved equine semen. In: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, 1998, Davis. *Proceedings...*Davis: [s.n.], p.25-41, 1998.
- Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumbe J.** Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C degrees. *Theriogenology*, v.56, p.577-589, 2001.
- Baruselli PS.** Avaliação do mercado de IATF no Brasil. *Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP*, 1. ed., 2019a.
- Baruselli PS.** IATF gera ganhos que superam R\$ 3,5 bilhões nas cadeias de produção de carne e de leite. *Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP*, 2.ed., 2019b.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Jacomini JO.** Eficiência uso da inseminação artificial em búfalos. *Rev Bras Reprod Anim, Suplemento*, Belo Horizonte, n.6, p.104-110, dez., 2009.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Colli MHA, Elliff FM, Freitas BG.** Timed artificial insemination: current challenges and recent conquests for improving the efficiency in the field. *Anim Reprod*, v.14, p.558-571, 2017.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Vieira LM, Souza AH, Bó GA, Rodrigues CA.** Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology*, v.155, p.1-11, 2020.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Sá Filho MF, Bó GA.** Revisão: Uso de inseminação artificial versus serviço natural em rebanhos bovinos. *Animal*, v.12, p.45-52, 2018.
- Baruselli PS, Marques MO, Borges A, Penteado L.** Impactos econômicos do uso de tecnologia reprodutiva na fazenda. In: Encontro dos Encontros da Scot Consultoria, 4, 2017. *Anais ...* Ribeirão Preto: Suprema Gráfica e Editora, 2017.



- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bo GA.** The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.479-486, 2004.
- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon J, Magistrini M.** Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.181-190, 2001.
- Becerra VAB.** Efeito da adição de Aniba canelilla, blueberry e polifenol de chá verde sobre a viabilidade *in vitro* de espermatozoides de búfalo (*Bubalus bubalis*) resfriados a 5°C. 2017. 69f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Beg MA, Totey SM.** The oestrus cycle, behaviour and endocrinology of the estrous cycle in the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Breed, Abstract*, v.67, p.239-337, 1999.
- Bicudo SD, Sousa DB, Takada L.** Possibilidades e limitações da inseminação com semen ovino refrigerado e técnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.120-127, 2003.
- Borges-Silva JC, Silva MR, SILVA RG, Massoneto JF, Loro, PS, Alves IAC, Nogueira E, Nicacio AC, Oliveira LOF, Abreu UGP, Marinho DB.** Semen refrigerado bovino em protocolos de IATF, o que sabemos até o momento? Documentos Embrapa Pantana, n.166, 18p., 2020.
- Borges-Silva JC, Silva MR, Silva RG, Nogueira E, Oliveira LOF, Abreu UGP, Nicacio AC, Rodrigues, WB.** Uso de semen refrigerado bovino: quebrando paradigmas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.43, n.2, p.284-288, abr./jun. 2019.
- Borges-Silva JC, Silva MR, Marinho DB, Nogueira E, Sampaio DC, Oliveira LOF, Abreu UGP, Mourão GB, Sartori R.** Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Reprod Fertil Dev*, v.28 n.7, p.1004-1008, 2015.
- Borges-Silva JC, Silva MR, Oliveira LOF, Abreu UGP, Marinho DB, Sartori R.** Semen bovino refrigerado utilizado na IATF contendo ou não glicerol no diluidor. In: Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society, Anais... 30, p.209, 2016, Foz do Iguaçu. Proceedings... Foz do Iguaçu: SBTE, 2016.
- Borges-Silva JC, Silva MR, Resende AO, Sampaio DC, Nogueira E, Abreu UGP, Oliveira LOF, Rodrigues WB, Sartori R.** Semen bovino refrigerado e aumento de prenhez de vacas de corte submetidas à IATF. Embrapa, Corumbá, MS, Circ Téc, 114, 8p, 2017.
- Borchardt S, Schüller L, Wolf L, Wesenauer C, Heuwieser, W.** Comparison of pregnancy outcomes using either an Ovsynch or a Cosynch protocol for the first timed AI with liquid or frozen semen in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.107, p.21-26, 2018.
- Brandão FZ, Silva Filho JM, Palhares MS, Saturnino HM, Viana WS, Dantas MS, Oliveira HN.** Efeito da concentração espermática e do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com semen fresco diluído. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.55, p.61-67, 2003.
- Bratton R W, Foote RH.** Semen production and fertility of dairy bulls ejaculated either once or twice at intervals of either four or eight days. *J Dairy Sci*, v.37, p.1439-1443, 1954.
- Braz VB, Araújo AA, Nunes JF, Machado VP, Moura AAA, Oliveira KPL.** Viabilidade do semen ovino diluído em água de coco em pó. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.99-107, 2003.
- Brinsko S, Varner D, Blanchard T.** Transporte de semen equino. Department of large animal medicine and surgery. Texas: Texas A&M. 2000.
- Bucher A, Kasimanickam R, Hall JB, Dejarnette JM, Whittier WD, Kahn W, Xu Z.** Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. *Theriogenology*, v.71, n.7, p.1180-1185, 2009.
- Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM.** Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Anim Reprod*, v.2, p.257-262, 2005.
- Case CH.** Handling cases of sterility in practice. *Cornell Vet*, v.15, p.37-45, 1925.
- Carneiro GF, Silva SV, Medeiros LRD, Gomes Neto O, Procópio OCS.** Utilização prática de semen congelado. In: ASSIST (Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos), 1, 2007. Anais..., Gravata, PE: ASSIST, 2007. CD-ROM
- Cavalcanti PR, Motti ACL, Reis WVA, Silva LG, Nicacio AC, Dias FRT, Nogueira E, Silva JCB.** Avaliação do semen refrigerado bovino durante quinze dias, comparando três diluidores comerciais. Corumbá: Embrapa Pantanal, 8p., 2019.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.** Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal. 3ª ed., Belo Horizonte, 2013.



- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM.** Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.119-131, 2008.
- Chen Y, Foote RH, Tobback C, Zhang L, Hough S.** Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-Tris and whole-milk extenders. *J Dairy Sci*, v.76, p.1028-1034, 1993.
- Crespilho AM, Nichi M, Guasti PN, Dell'Aqua, CPF, Sá Filho MF, Maziero RR, Dell'Aqua Jr, JA, Papa FO.** Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Anim Reprod Sci*, v.146, p.126-133, 2014.
- Crespilho AM, Papa FO, Nichi M, Sá Filho MF, Zahn FS, Dell'Aqua Jr., JA.** 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.
- Crespilho AM, Papa FO, Santos MP, Sá Filho MF.** Use of cooled bull semen as a strategy to increase the pregnancy rate in fixed-time artificial insemination programs-Case report. *Am J Anim Vet Sci*, v.7, n.4, p.175-179, 2012.
- Crespilho AM, Papa FO, Zahn FS, Guasti PN, Dell'Aqua Jr. JÁ.** Influence of different preservation methods on fertility of bovine semen. *Biol Reprod*, v.81, p.459-459, 2009.
- Crespilho AM, Spizziri BE, Meyers M, Graham JK.** The Effect of Cholesterol Addition, Buffer, and pH on Equine Sperm Stored at 5°C. *J of Equine Vet Sci*, v.33, p.663-666, 2013.
- Collins WJ, Bratton RW, Henderson CR.** The relationship of semen production to sexual excitement of dairy bulls. *J Dairy Sci*, v.34, p.224-227, 1951.
- Curry MR.** Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod*, v.5, p.46-52, 2000.
- De Lima LF, Moura P, Passos PIB, Leal DR, Rumpf R, Neves JP.** Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do semen ovino criopreservado em palhetas. *Ciência Anim Bras*, v.11, p.835-844, 2010.
- Den Daas JHG, De-Jong LMTE.** The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *J Dairy Sci*, v.81, p.1714-1723, 1998.
- Dhami AJ, Jani VR, Mohan G, Sahni KL.** Effect of extenders and additives on freezability, post-thaw thermoresistance and fertility of frozen Murrah buffalo semen under tropical climate. *Buffalo J*, v.10, p.35-45, 1994.
- Dias RAR, Campanholi SP, Rossi GF, Dell'Aqua CPF, Dell'Aqua Jr., JA, Papa FO, Zorzetto, MF, Paz CCP, Oliveira, LZ, Mercadante MEZ, Monteiro FM.** Evaluation of cooling and freezing systems of bovine semen. *Anim Reprod Sci*, v.195, p.102-111, 2018.
- Dunlop RH, Williams DJ.** *Veterinary Medicine. An Illustrated History.* St. Louis, Mosby-Year Book, Inc., 1996.
- Edwards J, Walton A, Siebenga J.** On the exchange of bull semen between England and Holland. *J Agric Sci*, v.28, p.503-508, 1938.
- Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, Hidalgo CO, Muiño R, Mogas T.** Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology*, v.81, p.1067-1072, 2014.
- Foote RH.** The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci*, v.80, p.1-10, 2002.
- Foote RH.** Extenders and extension of unfrozen semen. Pages 442-493 in *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. 2nd ed. Salisbury GW, Van Demark NL and Lodge JR, ed. Freeman, New York, NY, 1978.
- Foote RH, Bratton RW.** The fertility of bovine semen in extenders containing sulfanilamide, penicillin, streptomycin and polymyxin. *J Dairy Sci*, v.33, p.544-547, 1950.
- Foote RH, Gray LC, Young DC, Dunn HO.** Fertility of bull semen stored up to four days at 5°C in 20% egg yolk extenders. *J Dairy Sci*, v.43, p.1330-1334, 1960.
- Fujita AS, Weiss RR, Junior PR, Kozicki LE, Greselle FVN, Bertol MAF.** Taxa de gestação em novilhas nelore sincronizadas para IATF e inseminadas com semen resfriado e congelado. *Archives of Veterinary Science*, v.18, n.3, p.13-21, 2013.
- Gil MA, Almiñana C, Roca J, Vázquez JM, Martínez EA.** Boar semen variability and its effects on IVF efficiency. *Theriogenology*, v.70, p.1260-1268, 2008.
- Gil J, Fierro S, Bentancur O, Olivera-Muzante, J.** Chilled storage of ram semen improves with the addition of egg yolk and glycerol to milk-based extenders. *Reprod Dom Anim*, v.46, p.503-507, 2011.
- Gill RC, Gangwar PC, Kooner DS.** Studies on the oestrus behaviour in buffaloes. *Indian J Anim Sci*, v.43, p.472-475, 1973.



- Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ.** Effects of cryopreservation on bull sperm-head morphometry. *J Androl*, v.19, n.6, p.704-709, 1998.
- Grunert E, Birgel EH, Vale WG.** Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: Ginecologia. São Paulo, Livraria Varela, 551p, 2005.
- Gunn RMC.** Artificial production of seminal ejaculation and the characters of the spermatozoa therein. *Counc Sci Ind Res Bul*, 94. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Melbourne, Australia, 1936.
- Gunsalus, IC, Salisbury GW, Willett EL.** The bacteriology of bull semen. *J Dairy Sci*, v.24, p.911-919, 1941.
- Hafez ESE.** Oestrus and some related phenomena in the buffalo. *J Agric Sci*, v.44, p.165-172, 1954.
- Hafs HD, Hoyt RS, Bratton RW.** Libido, sperm characteristics, sperm output, and fertility of mature dairy bulls ejaculated daily or weekly for thirty-two weeks. *J Dairy Sci*, v.42, p.626-636, 1959.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP.** Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl*, v.11, n.1, p.73-88, 1990.
- Henry M, Echeverri AML.** Andrologia Veterinária Básica: Criopreservação espermática, EV/UFMG, Belo Horizonte, Brasil, cap.12, v.1, p.170-183, 2013.
- Holt WV.** Basic aspects of frozen storage semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, n.1-3, p.2-22, 2000.
- Hori T, Masuda T, Kobayashi M, Kawakami E.** Role of prostatic fluid in cooled canine epididymal sperm. *Reprod Dom Anim*, p.1-6, 2017.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).** 2019. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/29163-ppm-2019-apos-dois-anos-de-queda-rebanho-bovino-cresce-0-4;2019>>. Acessado em: 10 de novembro de 2020.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).** 2018. Sistema de Recuperação Automática (SIDRA). Efetivo do rebanho brasileiro. Available on: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>. Acessado em: 02/04/2019.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).** 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>>. Acessado em: 21 de fevereiro de 2016.
- Ivanoff EI.** On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *J Agric Sci*, v.12, p.244-256, 1922.
- Kardivel 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. *Anim Reprod Sci*, v.114, p.125-134, 2009.
- Kulaksiz R, Çebi Ç, Akçay E.** The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4°C. *Turk J Vet Anim Sci*, v.36, p.177-182, 2012.
- Ladha S.** Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J Membr Biol*, v.165, p.1-10, 1998.
- Lamb GC, Dahlen CR, Larson JE, Marquezini G, Stevenson JS.** Control of the oestrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. *J Anim Sci*, v.88, p.181-192, 2010.
- Lamb GC, Mercadante VRG.** Estratégias de sincronização e inseminação artificial em bovinos de corte. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, v.32, p.335-334, 2016.
- Lamirande E, O'Flaherty C.** Spermactivation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta*, v.1784, p.106-115, 2008.
- Lima FS, Vries ADE, Risco CA, Santos JEP, Thatcher W.** Comparação econômica de serviços naturais e programas cronometrados de criação de inseminação artificial em gado leiteiro. *J Dairy Sci*, v.93, p.4404-4413, 2010.
- Linde-Forsberg C.** Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v.21, p.467-485, 1991.
- Luz SLN, Neves JP, Gonçalves PBD.** Parâmetros utilizados na avaliação do semen congelado ovino para inseminação laparoscópica. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.37, p.141-145, 2000.
- Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD.** The relationship between chromatin quality and fertility of chilled stallion sperm. In: *American Association Equine Practitioners*, 47, 2001, San Diego. Proceedings... San Diego. p.229-231, 2001.



- MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa MAPA N° 36, de 27.10.2015 - DOU de 28.10.2015 - Centro de Coleta e Processamento de Semen (CCPS), acesso link <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=305345>. Acessado em 10 de junho de 2018.
- Martins MIM, Souza AK, Trautwein LGC.** Subpopulações Espermáticas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.243-247, jan./mar. 2017.
- Melrose DR.** Artificial insemination in cattle. In: Maule JP. Ed. *The Semen of Animals and Artificial Insemination*. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Bucks, England, p.1-181, 1962.
- Mendoza N, Casao A, Del Valle I, Serrano E, Nicolau S, Assumpção MEOA, Muño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Pérez-Pé R.** Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v.880, p.74-81, 2012.
- Miller FW, Evans EI.** Technic for obtaining spermatozoa for physiological dairy studies and artificial insemination. *J Agric Res*, v.48, p.941-947, 1934.
- Monteiro GA, Guasti PN, Rocha AS, Martin I, Sancler-Silva YFR, Dell'Aqua CPF, Dell'Aqua Jr JA, Papa FO.** Effect of storage time and temperature of equine epididymis on the viability, motion parameters, and freezability of epididymal sperm. *J Equine Vet Sci*, v.33, p.169-173, 2013.
- Moore SG, Hasler JF.** A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy Science. *J Dairy Sci*, v.100, p.10314-10331, 2017.
- Moscardini MM, Scott C, Moura DS, Lourenço TT, Helena V, Aristizábal V, De Souza FF.** Viabilidad de espermatozoides ovinos mantenidos a 5° y 15°C en diferentes sistemas de refrigeración. *Rev Bras Ciências Vet*, v.21, p.122-126, 2014.
- Murphy EM, O'Meara C, Eivers B, Lonergan P, Fair S.** Optimizing storage temperature of liquid bovine semen dilutes in INRA96. *J of Dairy Sci*, v.101, p.5549-5558, 2018.
- Murphy EM, Murphy C, O'Meara C, Dunne G, Eivers B, Lonergan P, Fair S.** A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. *J Dairy Sci*, v.100, p.1-14, 2017.
- Murphy C, Fahey A, Shafat A, Fair S.** Reducing sperm concentration is critical to limiting the oxidative stress challenge in liquid bull semen. *J Dairy Sci*, v.96, p.4447-4454, 2013.
- Nagy S, Hallap T, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H.** Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during 4°C incubation as measured by multicolour flow cytometry. *Anim Reprod Sci*, v.80, p.225-235, 2004.
- New Zealand Dairy Board.** Seasonal trends in fertility and in the distribution of return intervals: differences between deep-frozen and liquid semen. *Farm Prod Rep*, Wellington, NZDB, v.52, p.16, 1977.
- Nogueira E, Sanches C, Borges-Silva JC, Garcia WR, Anache NA, Silva KC, Potiens JR, Costa e Silva EV.** Qualidade do semen e resultados em programas de IATF em bovinos. In: IV REUNIÃO BRASILEIRA DA ABRAA, 2019, Goiânia. *Anais da IV Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal*. Campo Grande: UFMS, v.1. p.28-37, 2019.
- Norman C, Johnson CE, Porterfield ID, Goldberg E, Dunbar RS, Min HS, Dunn HO.** Survival of bovine sperm left at variable temperature in coconut milk extender. *J Agric Sci, Camb*, v.59, p.33-39, 1962.
- Nunes JF.** Utilização da água de coco como diluidor do semen de animais domésticos e do homem. *Rev Bras Reprod Anim*, v.22, p.109-112, 1998.
- Nunes JF, Salgueiro CCM.** Utilização da água de coco como diluidor de semen de caprinos e ovinos. *Rev Cient Prod Anim*, v.1, p.17-26, 1999.
- Oba E, Fuck EJ, Bicudo SD, Papa FO, Ohashi OM.** Estudo preliminar de diferentes meios para congelamento de semen de búfalo. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. *Anais...Belo Horizonte: CBRA*, p.337, 1993.
- O'Hara L, Hanrahan J, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans A, Lonergan P.** Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, v.73, p.541-549, 2010.
- Oliveira LZ, Celeghini ECC, Monteiro FM, Arruda RP.** The importance of semen quality in AI programs and advances in laboratory analyses for semen characteristics assessment. *INTECH Open Access Publisher*. p.1-16, 2013.
- Pace MM, Graham EF.** Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*, v.39, n.6, p.1144-1149, 1974.
- Papa MP, Maziero RM, Guasti PN, Junqueira CR, Freitas-Dell'Aqua CP, Papa FO, Viana FP, Alvarenga MA, Crespilho AM, Dell'Aqua Jr. JA.** Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*, v.83, n.8, p.107-113, 2015.



- Pereira RR, Barbosa FB, Costa Filho L, Acacio BR, Reis WVA, Silva MCC, Sampaio BFB.** Avaliação do uso de três diluidores comerciais no processo de refrigeração do semen bovino. In: Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal, 4, 2019, Goiânia, GO. Anais...Goiânia: Editora UFMS, 2019. p.146-150, 2019.
- Perry EJ.** The Artificial Insemination of Farm Animals. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ, 1945.
- Petrunkina AM.** Fundamental aspects of gamete cryobiology. *J Reproduktionsmed Endokrinol*, v.4, p.78-91, 2007.
- Phillips PH.** The preservation of bull semen. *J Biol Chem*, 130, 415p, 1939.
- Pignataro TA, Araújo JM, Silva AB, Freitas ML, Teixeira HCA, Pivato I, Oliveira RA.** Comparison of extenders and storage temperature in chilling canine semen. *Cienc Anim Bras*, v.21, p.1-8, 2020.
- Pinto PHN, Freitas JA, Brandão FZ, Souza VL, Fonseca JF.** Inseminação artificial em caprinos leiteiros com semen resfriado por 24 ou 48 horas. *Synergismus scyentifica UTFPR, Pato Branco*, v.07, n.1, 2012.
- Pirondi AN, Teixeira CMC, Lima ES, Valente TNP, Deminicis BB, Bezerra FC, Nery VLH.** Reproductive Characteristics of Buffaloes: A Review. *J Agricultural Sci*, v.11, n13, p.167-177, 2019.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v.164, p.666, 1949.
- Porto-Filho RM, Gimenes LU, Monteiro BM, Carvalho NAT, Ghuman SPS, MadureiraEH, Baruselli PS.** Detection of estrous behavior in buffalo heifers by radiotelemetry following PGF2 $\alpha$  administration during the early or late luteal phase. *Anim Reprod Sci*, v.144, p. 90-94, 2014.
- Prince PW, Almquist JW, Reid JJ.** Bacteriological studies of bovine semen. II. The incidence of specific types of bacteria and the relation to fertility. *J Dairy Sci*, v.32, p.849-855, 1949.
- Raheja N, Choudhary S, Sonika S, Neha Sharma N, Kumar N.** A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *J. of Entomol and Zoo Stud*, v.6, n.3, p.239-245, 2018.
- Raphael CF.** Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide equino refrigerado. 2007. 111f. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- Rasul Z, Ahmad N, Anzar M.** Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome, morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl*, v.22, n.2, p.278-283, 2001.
- Rasul Z, Anzar M, Jalali S, Ahmad N.** Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.59, p.31-41, 2000.
- Resende OA, Almeida J.** Efeito do método de conservação do semen (congelado vs. refrigerado) nas taxas de concepção de vacas Brahman inseminadas em tempo fixo. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 20, 2013, Uberlândia, MG. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- Resende OA, Alves PAMP, Fajardo RSL, Almeida J, Silva OR, Mello MRB.** Utilização de semen refrigerado em programas de inseminação artificial em tempo fixo. *Informação Tecnológica on-line, PESAGRO-RIO*, n.122, maio, 2018a.
- Resende OA, Alves PAMP, Fajardo RSL, Almeida J, Silva OR, Mello MRB.** Eficiência do semen refrigerado na IATF de vacas Girolando. In: Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society, 32, Florianópolis. Proceedings... Florianópolis: SBTE, p.209, 2018b.
- Rodgers JC, Bird SL, Larson JE, DiLorenzo N, Dahlen CR, DiCostanzo A, Lam GC.** Uma avaliação econômica da sincronização do estro e inseminação artificial cronometrada em vacas amamentadas. *J Anim Sci*, v.10, p.1297-1308, 2015.
- Rodríguez-Martínez H.** Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim*, v.38, n.4, p.312-318, 2003.
- Rycroft H, Bean B.** Factors influencing non-return data. In: Proceedings of the 14th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. Milwaukee, Wis: National Association of Animal Breeders; 1992, p. 43-46.
- Saha R, Ashraf A, Rahman Z.** Comparative study on conception rate of cow in using frozen and liquid semen. *J Anim Sci, Adv*, v.4, p.749-772, 2014.
- Sahni KL, Mohan G.** Effect of various levels of yolk on viability of buffalo semen at 37 °C, 5 °C and -196



- °C. In Proceedings of II World Buffalo Congress held in India during 12-16 December 1988 (volume III). Physiology and reproduction. Indian Society of Buffalo Development and Indian Council of Agricultural Research, p.63-65, 1990.
- Salamon S, Maxwell WMC, Firth JH.** Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Anim Reprod Sci*, v.2, n.4, p.373-385, 1979.
- Salisbury GW, Fuller HK, Willett EL.** Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. *J Dairy Sci*, v.24, p.905-910, 1941.
- Salisbury GW, VanDemark NL.** Diluents and extension of semen. In: Salisbury GW, Van Demark NL, editors. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. San Francisco: Freeman, p.412-435, 1961.
- Salisbury GW, VanDemark NL, Lodge JR.** Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. 2nd ed. WH Freeman Co, 1978.
- Salzano A, De Canditiis C, Della Ragione F, Prandi A, Zullo G, Neglia G, Campanile G, Gasparri B.** Evaluation of factors involved in the failure of ovum capture in superovulated buffaloes. *Theriogenology*, v.122, p.102-108, 2018.
- Sansone G, Nastri MJF, Fabbrocini A.** Storage of buffalo (*Bubalis bubalis*) semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.55-76, 2000.
- Santos MAM, Gradela A, Moraes EA, Souza WL, Alves NG, Costa JMS, Matos WCG.** Características do semen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. *Pesq Vet Bras*, v.35, n.11, p.925-932, 2015.
- Severo NC.** História ilustrada da inseminação artificial. 1ª ed., Edit. Livre Expressão, 408p., 2013.
- Saud SBP.** Número e perspectivas do mercado de semen no Brasil. In: IV Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal - ABRAA, Anais...p.12-14, 2019.
- Schuh H.** Comparison between liquid and deep-frozen semen for artificial insemination in developing and developed countries. *Stöckacher Weg* v.6, Birkenfeld, D8530, 1988.
- Shannon P.** Contribution of seminal plasma, sperm numbers, and gas phase to dilution effects of bovine spermatozoa. *J Dairy Sci*, v.48, p.1357-1361, 1965.
- Shannon P, Curson B, Rhodes AP.** Relationship between total spermatozoa per insemination and fertility of bovine semen stored in Caprogen at ambient temperature. *New Zealand J Agr Res*, v.27, p.35-41, jan. 1984.
- Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF.** Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci*, v.169, p.2-5, 2016.
- Silva NC, Leão KM, Marques TC, Silva RP, Rodrigues MC.** Uso de semen fresco e refrigerado em programas de inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas bovinas. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v.9, n.17; p.2537-2551, 2013.
- Silva TFP, Ackermann CL, Pinheiro FTS, Silva LDM.** Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de semen de gato doméstico. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2007.
- Singh LP, Purbey LN.** Preservability of goat spermatozoa in Tris and Citrate extenders at -196°C and 5°C. *Indian J Anim Sci*, v.66, n.11, p.1139-1141, 1996.
- Singh AK, Singh VK, Narwade BM, Mohanty T, Atreja SK.** Comparative quality assessment of buffalo (*Bubalis bubalis*) semen chilled (5°C) in egg yolk and soya milk-based extenders. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.596-600, 2012.
- Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer, JE.** Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, p.1-38, 1999.
- Stradaioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M.** Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology*, v.67, p.1249-1255, 2007.
- Syllaa L, Palombia C, Stradaioli G, Vagnilucac A, Monac M.** Effect of semen collection by transrectal massage of accessory sexual glands or artificial vagina on the outcome of breeding soundness examinations of Italian yearling beef bulls. *Theriogenology*, v.83, p.779-785, 2015.
- Thacker DL, Almquist JO.** Diluters for bovine semen. I. Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. *J Dairy Sci*, v.36, n.2, p.173-180, 1953.
- Vale WG.** Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução. Campinas: Fundação Cargil, 86p., 1988. **Valle GR., Silva Filho JM, Palhares MS, Melo MA, Magnano LGP.** Utilização de um contêiner modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de semen equino. *Arq Bras Med Vet Zootec.* v.51, n.5, p.505-514, 1999.



- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, De kruif A.** Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*, v.63, n.3, p.912-922, 2005.
- Vidament M.** French field results on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.115-136, 2005.
- Vishwanath R.** Inseminação artificial: o estado da arte. *Theriogenology*, v.59, p.571-584, 2003.
- Vishwanath R, Shannon P.** Armazenamento de semen bovino no estado líquido e congelado *Anim Reprod Sci*, v.62, p.23-53, 2000.
- Wall RJ, Foote RH.** Fertility of bulls perm frozen and stored in clarified egg yolk-tris-glycerol extender. *J Dairy Sci*, v.82, p.817-821, 1999.
- Walters EM, Benson JD, Woods EJ, Critser JK.** The history of sperm cryopreservation. 2009.
- Walton A.** Preservation of mammalian spermatozoa. *Nature*, v.118, p.265, 1926.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.481-492, 2000.
- Watson PF.** Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.
- Willett EL, Salisbury GW.** The effect of various dilutors, cooling rate, temperature of storage, and some other factors on the livability of spermatozoa in stored samples of bull semen. *Mem Cornell Univ Agric, Exp Stn*, v.249, 45p, 1942.
- Wiltbank MC, Sartori R, Vasconcelos JL, Nascimento AB, Souza AH, Cunha AP, Gumen A, Sangsritavong S, Guenther JN, Lopez H, Pursley JR.** Managing the dominant follicle in high-producing dairy cows. *Soc Reprod Fertil, Suppl*, v.67, p.231-245, 2010.
- Xu ZZ.** Application of liquid semen technology improves conception rate of sex-sorted semen in lacting dairy cows. *J Dairy Sci*, v.97, p.7298-7304, 2014.
- Yang DH, Standley NT, Xu ZZ.** Application of liquid semen technology under the seasonal dairy production system in New Zealand. *Anim Reprod Sci*, v.194, p.2-10, 2018.
- Yoshida M.** Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.349-355, 2000.
- Zicarelli L, Vale WG.** Patrones reproductivos estacionales y no estacionales en el búfalo doméstico. In: Berdugo JA, Vale WG. (Ed.). *Memorias del Curso Internacional de Reproducción Bufalina*, 2002, Medellín, Colombia. Medellín: CATI, p.33-58, 2002.
- Zorzetto MF.** Avaliação do semen de búfalos em três meios de criopreservação. Botucatu, 2013. 100p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2013.
- Zorzetto MF, Martín I, Sancler-Silva YFR, Zoca S, Freitas-Dell'Aqua CP, Papa FO, Ramos AA, Nunes JF, Salgueiro CCM, Oba E.** Comparison of three different extenders on Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) semen freezability. *Andrologia*, v.50, n.1, p.1-6, 2017.
-