

Impacto da qualidade de sêmen sobre os resultados da IATF

Impact of sperm quality on IATF results

Tatiana Issa Uherara Berton^{1*}, Maurício de Faria Silva¹, Milens Marcelo Frasca Belonci¹,
Bruno de Almeida Barbosa¹, Simone dos Reis Paulucci¹, Fernanda Nobre Bandeira Monteiro²

¹Tairana Central de Congelamento de Sêmen Ltda. – Presidente Prudente, SP

²Unoeste – Universidade do Oeste Paulista – Presidente Prudente, SP

Resumo

O Brasil vive um cenário de grande demanda pelo produto carne, tanto para o mercado interno quanto para o mercado externo. Para atender a esta demanda, há o envolvimento de toda a cadeia da carne, desde os programas de melhoramento genético com o fornecimento de touros melhoradores para tais características, como as centrais de colheita de sêmen desses animais para uso em massa por meio da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Para que haja sucesso no uso desta biotécnica, é de vital importância a qualidade do produto sêmen aliado às outras características como ambiência e nutrição.

Palavras-chave: IATF, qualidade de sêmen, análise de sêmen

Abstract

Brazil is now with a great demand of beef products, for the domestic and exportation markets. To delivery the demand, the entire meat chain must be involved, included genetics programs to provide and separate superior bulls, and the collection centers that collect this superior genetics bulls to be used in the Fixed Timed Artificial Insemination (FTAI) biotechnology in a large scale. In order to be successful using this biotechnology, the quality of the semen combined with other characteristics such as ambience and nutrition are extremely important.

Keywords: Fixed Timed Artificial Insemination (FTAI), semen quality, semen analysis

Introdução

O Brasil é um país de vocação para o Agronegócio, com extensas áreas para cultivo e pecuária, além de clima favorável para o desenvolvimento de variadas culturas e criação. Possui o maior rebanho de gado bovino, sendo contabilizados 187,55 milhões de cabeça de gado e outros números que também chamam a atenção: 41,5 milhões de cabeças abatidas, 10,32 milhões de toneladas de carne (TEC) produzidas, desse volume, 7,6 milhões de toneladas de carne bovina (TEC) ficam no mercado interno e 2,69 milhões são exportadas (ABIEC, 2022).

Assim, para atender este mercado cada vez mais exigente, com uma demanda crescente, a busca pela eficiência se faz necessária, sendo a missão do Brasil a de produzir mais, em menor área, com maior sustentabilidade. Dentro das estratégias utilizadas para este aumento de produção, está a biotécnica da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), que continua ocupando seu lugar de relevância e destaque nesse cenário promissor. Verificou-se crescimento de 24,6% no mercado de IATF em relação ao ano de 2020. E segundo Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 93,3% das Inseminações no Brasil foram realizadas por IATF (Braruselli, 2022).

Os números expressivos disponibilizados pela Associação Brasileira de Inseminação Artificial também expressam a realidade deste mercado, foram mais de 28 milhões de doses no mercado em 2021, 20% maior em comparação à 2020 (ASBIA, 2022).

Este impacto do uso da IATF, se reflete diretamente a ganhos na propriedade, com mais bezerros produzidos por matriz, com redução de intervalo entre partos e bezerros com ganho genético da característica desejada, seja corte ou leite (Baruselli, 2019).

Os Programas de Melhoramento Genético e as Centrais de Colheita de Sêmen trabalham para atender a demanda da cadeia da carne, as Centrais disponibilizando através da colheita de sêmen, doses de touros avaliados geneticamente com características superiores de produção, apresentados em sumários democratizando esse incremento para diversos criadores.

Diante desse cenário, é certo dizer que existe uma preocupação latente das centrais de sêmen para produzir sêmen de melhor qualidade possível para que, em conjunto com os demais fatores que

*Correspondência: tatiana@tairana.com.br

Recebido: 15 de maio de 2022

Aceito: 17 de maio de 2022

compõe a fertilidade em uma fazenda, possam dar um bom resultado de índice de prenhez no campo.

O objetivo desta revisão é repassar algumas técnicas de avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen, de forma a entender a necessidade de aliar algumas a fim de conseguir uma predição do potencial de fertilidade de uma partida de sêmen de modo mais assertivo.

Qualidade do Sêmen

A influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade tem motivado o desenvolvimento de inúmeras pesquisas de avaliação da morfologia e da função espermática (Santos et al., 2018). A qualidade de sêmen depende da manutenção da integridade e função de todas as estruturas que compõe a célula espermática, como a membrana plasmática, flagelo, mitocôndria, cromatina entre outras. (Santos, 2016). Ela assume um importante papel nas taxas de prenhez a campo, uma vez que a má qualidade do mesmo pode prejudicar os resultados de todo o programa de inseminação artificial e por a perder os investimentos no preparo do rebanho, hormônios, mão de obra, etc. (Severo, 2009).

Colheita e Processamento do Sêmen

Quando se pensa em qualidade seminal e colheita de sêmen bovino, geralmente associa-se apenas ao processo interno do laboratório após a colheita de sêmen do reprodutor, porém, este trabalho inicia-se até mesmo antes da entrada do reprodutor à central, levando em consideração que a espermatogênese é um processo contínuo.

O escore corporal, a alimentação ingerida previamente, o estado de saúde e o comportamento exercem influência, portanto o que podemos encontrar em relação à qualidade seminal ainda pode ser reflexo da vida prévia do touro. As centrais recebem animais de diferentes locais e de diferentes objetivos, portanto, o histórico da vida do touro sempre auxilia para o entendimento da condição do animal naquele momento, diferentes ações podem levar a diferentes padrões seminais.

Durante a quarentena, amostras de lavado prepucial e sangue geralmente são coletados para análise de diferentes doenças, especialmente as de caráter reprodutivo que podem ser transmitidas pelo sêmen. Importante ressaltar que as Centrais devidamente inscritas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento seguem Instruções Normativas, relativa aos exames sanitários obrigatórios, sanidade do rebanho, estruturas obrigatórias, isolamento do centro, fluxo de pessoas, veículos, biossegurança, etc., assim como se utilizam de diferentes protocolos sanitários de países diversos para atender aos requisitos sanitários próprios do país importador.

Colheita de Sêmen

A colheita de sêmen pode ser realizada por diferentes métodos, sendo eles eletroejaculação, vagina artificial e a massagem dos órgãos genitais internos. A determinação do método de colheita deve levar em consideração alguns pontos como temperamento e condição de contenção do touro, condição de higiene, habilidade de mão de obra para execução do serviço sem risco para o animal e o homem, etc.

Rigorosos cuidados de higiene do touro, fêmea, coletador e materiais devem ser seguidos para que não haja contaminação da ejaculado no momento da colheita. Da mesma forma, os controles de temperaturas dos equipamentos devem ser realizados para que não haja discrepâncias grandes entre a temperatura do ejaculado e dos materiais que serão utilizados no processo, evitando-se choque térmico.

Refrigeração e Congelação

O desenvolvimento da biotecnologia para congelar e armazenar sêmen foi de extrema importância para o aumento de produtividade, pois permitiu o uso de sêmen dos reprodutores melhoradores genéticos em grande escala.

A presença de membranas espermáticas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão do oolema possam ocorrer (Arruda et al., 2004).

O desafio se dá pelo fato da criopreservação ocasionar danos celulares devido à mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações da membrana do espermatozoide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (Watson, 2000).

Mesmo tendo tido um aumento crescente da demanda de doses de sêmen congeladas nesses

últimos anos, ainda ocorrem perdas do potencial de fertilização provocadas pelo processo de criopreservação espermática (Celeghini et al., 2008).

Considera-se que exista perda de aproximadamente 50% de motilidade espermática quando da refrigeração e congelamento do sêmen bovino. Foi comprovado ainda, através de teste utilizando sondas fluorescentes para diversas estruturas celulares, incluindo a avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, que em algumas situações, cerca de 85% das células sofrem injúrias quando criopreservadas (Forero-Gonzalez et al., 2012).

O dano causado pela redução da temperatura durante a refrigeração até 4° a 5° C é denominado choque térmico e ocasiona perda irreversível da viabilidade dos espermatozoides, pela rápida diminuição da motilidade ou surgimento do padrão anormal da mesma, que pode alterar para circular ou retrógrada (Leite et al., 2011).

O espermatozoide em condição anaeróbica produz espécies reativas ao oxigênio, e o balanço entre a produção de ROS e a degradação das mesmas pode ser alterado, aumentando a presença de ROS que induz a peroxidação lipídica das membranas espermáticas comprometendo a viabilidade espermática (Arruda et al., 2004).

Métodos de avaliação do sêmen pós-criopreservação

A qualidade de sêmen está relacionada à integridade da estrutura do espermatozoide e suas funções. Apesar do desenvolvimento de diferentes métodos de análise laboratorial, nenhuma técnica de avaliação executada isoladamente apresenta sensibilidade suficiente para predizer fertilidade, mas sim a combinação de vários métodos de análises (Celeghini et al., 2017).

Atualmente os métodos de avaliação utilizados pelas centrais de colheita de sêmen incluem a análise subjetivas de motilidade, concentração, morfologia e integridade das membranas plasmáticas e acrossomal (Crespilho et al., 2009). Os resultados após a própria Inseminação Artificial ou a Fertilização *in vitro* representam os testes de maior sensibilidade para entender o potencial de fertilidade de amostras seminais (Crespilho et al., 2009); porém, o alto custo e o tempo prolongado torna-os impraticáveis a adoção de tais métodos na rotina. Por esta razão, diversos estudos têm sido conduzidos no sentido de estabelecer a correlação dos testes laboratoriais ou associações com os índices de fertilidade *in vivo* (Freitas-Dell'Aqua et al., 2009).

As avaliações comumente adotadas nos laboratórios com objetivo de estimar o potencial de fertilidade do sêmen são: motilidade espermática dada em porcentagem, o vigor avaliado numa escala de 1-5, concentração espermática determinada em milhões de espermatozoides/mL (com auxílio de Câmara de Neubauer ou espectrofotômetro), morfologia espermática e o teste de termo resistência lento ou rápido. Usualmente são seguidos os padrões mínimos sugeridos pelo CBRA (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal).

Motilidade e Vigor

É usual que a análise de motilidade espermática seja realizada de forma subjetiva, visualizando-se uma gota de sêmen com auxílio de microscópio ótico, estimando-se a porcentagem de células móveis da amostra. Por ser subjetiva, este tipo de análise não permite repetibilidade e pode apresentar alta variação entre os avaliadores (Arruda et al., 2000). A repetibilidade pode ser vista em poucas situações específicas, em rotinas de centrais ou com veterinários de campo que trabalham diariamente, assiduamente com essa rotina de análise de motilidade. É comum nas centrais que os técnicos de uma mesma empresa estejam mais alinhados entre eles na visão subjetiva, uma vez que geralmente recebem o mesmo treinamento e são colocados diariamente numa rotina intensa de motilidade e vigor.

Morfologia espermática

A análise da morfologia espermática é essencial no conjunto de análises realizadas para predição do potencial de fertilidade, pois apenas espermatozoides viáveis são capazes de interagir com o ovócito e iniciar o processo de fertilização (Freitas-Dell'Aqua et al., 2009). Ainda assim, a análise da morfologia espermática nos permitem contabilizar o percentual de espermatozoides normais, ou nos dar indicio de algum problema que efetivamente esteja ocorrendo, em determinado estágio de formação, armazenamento ou até mesmo após ejaculação. Mudanças da morfologia espermática podem indicar leve ou grave alteração do epitélio seminífero. Após a ejaculação ou descongelamento, se os

espermatozoides forem expostos ao meio hipotônico ou ao frio, há indução de dobras nas caudas (Arruda et al., 2015).

Os defeitos morfológicos são hoje classificados como Defeitos Maiores, sendo esses quaisquer tipos de anormalidades correlacionada com prejuízos de fertilidade ou por uma condição patológica do testículo ou epidídimo e Defeitos Menores, que são aqueles com menor importância como cabeça delgada ou normal destacada (Arruda et al., 2015).

Outras técnicas

Para dirimir esta condição de subjetividade nas análises, diversas técnicas estão sendo desenvolvidas e pesquisadas para a avaliação seminal, das quais é possível citar sistemas de avaliação computadorizada, uso de sondas fluorescentes, para a avaliação das estruturas espermática, entre outras (Arruda et al., 2004).

Análise Computadorizada do Movimento Espermático

O CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) é um sistema automático (*hardware e software*) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (Matos et al., 2009).

O sistema CASA fornece alguns parâmetros como Motilidade Total (%), Motilidade Progressiva (%), Velocidade do Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), Velocidade Curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, μm), Frequência de Batimentos (BCF, Hz), Retilinearidade (STR, %), Linearidade (LIN, %) e outras (Matos et al., 2009). Apesar de todos esses parâmetros apresentados, ainda não está claro qual característica do movimento espermático determinada pelo CASA é capaz de prever a fertilidade (Arruda et al., 2004). Ainda existe espaço para pesquisas correlacionando os diversos parâmetros fornecidos pelo CASA com os resultados de fertilidade no campo ou ainda a interação dos parâmetros do CASA com os demais parâmetros que compõem o resultado de prenhez no campo.

Avaliação Funcional – Uso de sondas fluorescentes

Durante a criopreservação a membrana sofre danos, com queda significativa da viabilidade espermática (Freitas-Dell'Aqua, et al, 2009). A integridade da membrana plasmática é essencial para que ocorram eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização. O uso das sondas fluorescentes aumentou a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides. Elas vêm sendo utilizadas isoladas ou em combinação para determinar integridade e viabilidade celular (Martins et al, 2016). A funcionalidade de organelas dos espermatozoides ou seus compartimentos tem sido monitorados por procedimentos específicos de coloração, conhecidos como sondas fluorescentes (Arruda et al., 2004).

Celeghini et al. (2008) observaram que a associação de sondas fluorescentes para avaliar simultaneamente a integridade de membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial permitia detectar com mais precisão as lesões celulares oriundas do processo de criopreservação.

Oliveira et al. (2014) realizaram estudo com objetivo de demonstrar a relação entre a avaliação seminal por sondas fluorescentes e as taxas de prenhez, verificando se a avaliação simultânea de várias estruturas do espermatozoide por meio das sondas fluorescentes era suficiente para prever a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen. No estudo foram adquiridas partidas de sêmen de touros da raça Nelores de uma empresa que comercializa sêmen, portanto partidas aprovadas para venda e foram analisadas quanto à sua motilidade total e progressiva (CASA), concentração (contagem em câmara de Neubauer), análise morfológica (Microscopia de contraste de interferência de fase, aumento de 1000) e integridade de membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial, avaliadas usando-se sondas fluorescentes, segundo metodologia de Celeghini et al. (2008). Células que apresentam integridade da membrana plasmática, integridade do acrossoma e alta função mitocondrial são designadas IPIAH. Assim, foram separados 3 grupos com diferentes percentuais de IPIAH: sêmen de alta qualidade - Grupo G com 44,5% de espermatozoides IPIAH, sêmen de qualidade intermediária - Grupo M com 23% de espermatozoides IPIAH, e sêmen de qualidade regular - Grupo R com 8,5% de espermatozoide IPIAH, como demonstrado na Tabela 1 retirado do trabalho publicado de Oliveira et al. (2014).

Table 1

Total motility (%), progressive motility (%), concentration (number of sperm/mL), plasma membrane integrity (PMI, %), acrosome integrity (AI, %), high mitochondrial function (HMF, %), percentage of cells with intact plasma membrane, intact acrosome, and high mitochondrial function (IPIAH, %), and total of abnormal sperm (%) of 20 batches of semen evaluated.

Bull	Batch	Total motility (%)	Progressive motility (%)	Concentration (n. spztz/mL)	PMI (%)	AI (%)	HMF (%)	IPIAH (%)	Abnormal sperm (%)
A	1	45.3	37.2	45.0	8.5	47.0	5.5	5.0	19
A	2	60.4	52.2	50.0	9.5	50.0	12.0	8.5	12
A	3	58.4	53.2	55.0	28.5	54.0	26.5	23.0	6
A	4	63.7	56.3	77.5	32.5	51.0	41.0	31.5	12
A	5	63.3	50.7	65.0	33.0	75.0	39.0	32.0	13
A	6	59.8	51.9	80.0	33.0	57.5	38.5	33.0	17
A	7	68.9	60.2	42.5	34.0	69.0	33.0	33.0	12
A	8	50.2	44.5	62.5	35.0	61.5	37.5	34.0	8
A	9	62.8	57.1	42.5	39.0	67.5	34.5	34.5	15
A	10	47.6	40.8	72.5	35.5	52.0	36.5	34.5	13
A	11	62.4	57.3	50.0	39.0	58.5	39.0	35.5	12
A	12	61.7	56.8	65.0	43.5	70.5	42.5	40.0	8
A	13	63.4	58.4	50.0	41.5	63.5	40.5	40.5	10
A	14	65.3	57.1	87.5	45.0	68.5	50.0	42.5	9
A	15	67.5	61.6	55.0	45.0	71.0	61.5	44.5	11
B	1	64.2	54.7	55.0	58.5	77.0	61.5	57.5	11
C	1	38.7	29.9	50.0	41.5	67.0	43.0	41.5	15
C	2	72.6	67.8	52.5	45.0	75.5	51.5	44.5	13
C	3	39.1	32.4	56.0	35.5	66.0	39.5	35.5	19
C	4	32.4	26.3	42.5	31.0	64.0	31.0	31.0	19

Fonte: Oliveira et al. (2014)

Foram inseminadas 182 vacas nelores avaliadas ginecologicamente e submetidas a um protocolo de sincronização, e os animais foram distribuídos para serem inseminados entre os grupos G – 68 animais inseminados, grupo M – 56 animais inseminados e grupo R com 58 animais inseminados. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a gestação por ultrassonografia. O resultado demonstrou que houve diferenças de taxas de prenhez, sendo que o índice de prenhez no grupo G foi maior comparado ao grupo R. Não houve diferenças estatísticas se comparado ao grupo M. Figura 1 retirada do trabalho publicado de Oliveira et al. (2014).

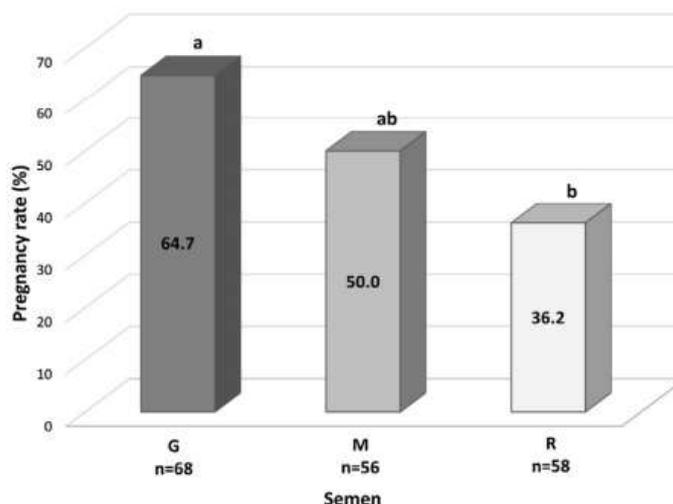


Fig. 1. Pregnancy rate (%) according to semen quality used in artificial insemination: semen G = 44.5%, semen M = 23.0%, and semen R = 8.5% of sperm IPIAH*/straw. ^{a,b}Different letters over the bars indicate statistical difference (P < 0.05). *IPIAH, intact plasma membrane, intact acrosome, and high mitochondrial function.

Fonte: Oliveira et al. (2014)

Esse trabalho conseguiu demonstrar que o sucesso da fertilização depende da integridade e função das estruturas, e que a combinação de vários parâmetros torna mais confiável para explicar possíveis diferenças de fertilidade entre touros ou partidas, o que faz sentido já que o potencial de fertilidade depende da correta função das células com seus diversos componentes.

A análise simultânea da membrana plasmática, integridade do acrossoma e função mitocondrial desenvolvida por Celeghini et al. (2007) é uma técnica que permitiu avaliar várias estruturas e contribuiu para prever a capacidade fecundante.

Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo possibilita a contagem, classificação e isolamento da célula espermática que, após serem marcadas com um corante fluorescente específico, são individualmente movidas por um sistema detector óptico em fluxo laminar e então contadas (Maziero et al., 2009). A técnica de análise por citometria de fluxo nos permite avaliar a integridade de membrana plasmática e acrossomal, viabilidade e função celular, contagem, classificação e o isolamento das células espermáticas, após serem marcadas por um corante específico (Freitas-Dell'Aqua et al., 2009).

E embora o uso de sondas fluorescentes por microscopia de fluorescência seja um método para avaliação dos diversos compartimentos espermáticos, o número de espermatozoides analisados não excede 200, enquanto a citometria de fluxo tem a capacidade de examinar 10.000 a 30.000 espermatozoides em menos de um minuto (Arruda et al., 2004).

Considerações Finais

O espermatozoide é uma célula complexa que depende da funcionalidade de múltiplos atributos para exercerem seu papel na reprodução (Freitas-Dell'Aqua et al., 2009). Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática rotineira, como motilidade progressiva, morfologia tem se mostrado limitados quanto à capacidade de prever o potencial de fertilidade do sêmen (Martins et al, 2016).

A combinação de vários parâmetros e formas de análise funcional e estrutural do espermatozoide torna-se o procedimento mais confiável em relação à busca da predição do potencial de fertilidade de uma partida de sêmen.

O mercado consumidor das doses de sêmen para uso em IATF tem sido cada vez mais exigente e tem buscado de forma rotineira informações quanto à fertilidade dos touros de interesse de compra. É sabido que apenas os parâmetros comumente analisados nos laboratórios de colheita de sêmen não são suficientes para predição de fertilidade e por isso, as empresas de comércio de sêmen iniciaram trabalhos buscando a comprovação de fertilidade de um touro. A validação do touro sendo “bom” de fertilidade se dá com a estatística, através da inclusão de outros parâmetros que influenciam no resultado de prenhez e são inerentes à fazenda, como por exemplo sobre a idade da vaca, o número de serviço, o protocolo de IATF utilizado, o escore corporal da fêmea, a época do ano, o inseminador, o touro a ser utilizado e outros.

Muitas vezes é a fertilidade ou o selo de fertilidade provado na IATF (touros geralmente com resultados acima de 50% de prenhez na IATF) que determina a aquisição ou a escolha de um dado reprodutor para uso em escala na IATF. Essa decisão fica muito clara por conta de alguns fatores. Hoje existem muitas opções de touros geneticamente bons, genomicamente classificados, touros com mesma genealogia e/ou mesma performance de progênie, assim a decisão da escolha pelo que “deixa mais bezerras” na fazenda, acaba sendo a opção de escolha. Além disso, quanto mais assertivos em relação aos resultados de IATF, menores gastos com protocolos, manejo etc. Infelizmente, pela dificuldade de aquisição dos dados de partida de sêmen nas fazendas, no momento da Inseminação propriamente dita, muitas captações, senão a maioria delas, chegam sem essas informações. A captação dos dados de resultado de prenhez, com todas as informações de campo, correlacionadas com as partidas e suas análises multifatoriais (parâmetros usuais, CASA, sondas fluorescentes, citometria de fluxo, etc.) discutidas aqui, numa escala grande, seria de valiosa ajuda para auxiliar a correlacionar e/ou prever a fertilidade.

Referências

Arruda RP, Celeghini ECC, Andrade AFC, Garcia AR, Nascimento J, Raphael CF, Souza LWO. Importância da Qualidade do Sêmen em Programas de IATF e TETF. Anais 1 Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, PR 14 a 16 de outubro, de 2004, p.166-179.

Arruda RP, Celeghini ECC, Andrade AFC, Raphael CF, Peres KR, Neves LC. Influência da Qualidade do Sêmen nos Resultados de Prenhez em Programas de IATF e TETF. Anais 2 Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2004, p.1157-164

Arruda, RP, Celeghini ECC, Garcia AR, Santos GC, Leite TG, Oliveira LZ, Lançoni R, Rodrigues MP. Morfologia espermática de touros: Interpretação e impacto na fertilidade. *Rev Bras Reprod Anim.* Belo Horizonte, v.39, n1, p.47-60, Jan/Mar 2015

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC). Disponível em: <http://abiec.com.br/> Acesso em: 05/05/2022.

- Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA).** Index ASBIA Mercado, 2021. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2022/02/Index-Asbia-2021-M%C3%ADdia-3.pdf>
- 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. ed. Ribeirão Preto: Suprema Gráfica e Editora, p.45-56, 2017b.
- Baruselli PS.** Avaliação do mercado de IATF no Brasil. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 1. ed., 2019a. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>
- Baruselli PS.** IATF bate mais um recorde e supera 26 milhões de procedimentos em 2021. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 6a ed., 2022. Acesso <<http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>>
- Baruselli PS.** IATF gera ganhos que superam R\$ 3,0 bilhões nas cadeias de carne e de leite. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 2. ed., 2019. Acesso <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF.** Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.479-488, 2007.
- 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. *Animal Reproduction Science*, v.104, p.119-131, 2008.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Florez-Rodriguez AS, Santos FB, Alves MBR, Oliveira BMM.** Impacto da qualidade de sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte – MG, v.41, n.1, p.40-45, 2017.
- Crespihlo AM, Landim-Alvarenga FC, Martins Junior A, Dell’Aqua Junior JA.** Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? *Vet Zootec*, v.16, p.335-342, 2009.
- Forero-Gonzalez RA, Celeghini ECC, Raphael CF, Andrade AFC, Bressan FF, Arruda RP.** Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia* (Berlin), v.44, p.154-159, 2012.
- Freitas-Dell’Aqua CP, Crespihlo AM, Papa JÁ, Dell’Aqua Junior.** Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* Belo Horizonte, v.33, n4, p.213-222, 2009.
- Santos JFD, Santos KJG, Santos APP, Backes C, Ferro RAC, Ferro DAC, Peixer PF.** Qualidade do sêmen bovino criopreservado. *Revista Espacios*, v34, n.14, p.18-33, 2018.
- Martins CF, Dode MAN, Silva AEDF.** Atlas de Morfologia Espermiática Bovina. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Brasília –DF, 1Ed, 2016.
- Matos DI, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R.** Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de Literatura. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, out./dez. 2008
- Maziero RRD, Crespihlo AM, Freitas-Dell’Aqua CP, Dell’Aqua Júnior JA, Papa FO.** Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. *Rev Bras Reprod Anim Supl*, Belo Horizonte, n.6, p.5-10, 2009
- Nogueira CS.** Impacto da IATF (inseminação artificial em tempo fixo) sobre características de importância econômica em bovinos nelore. Jaboticabal, 2017 iii, 34 p.
- Oliveira BMM; Arruda RP, Thome HE, Maturana Filho M, Oliveira GC, Guimarães CF, Nichi M, Silva LA, Celeghini ECC.** Fertility and uterine hemodynamic in cows after Artificial Insemination with semen assessed by fluorescent probes. *Theriogenology*, 82, p.767-772, 2014
- Baruselli PS, Catussi BLC, Abreu LA, Elliff FM, Silva LG, Batista ES, Crepaldi GA.** Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019); Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.
- Santos FB.** Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte. Dissertação Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, p.62, 2016.
- Severo NC.** Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. *A hora Veterinária*, Porto-Alegre-RS, v.28, n.167, p.36-39, 2009.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60/61, p.481-492, 2000.