



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
E RECURSOS PESQUEIROS



**USO DE SÊMEN BOVINO INCUBADO A DIFERENTES TEMPERATURAS APÓS O
DESCONGELAMENTO EM PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM
TEMPO FIXO**

NELMA PINHEIRO FRAGATA BELTRÃO

Manaus - Amazonas

Setembro, 2025

NELMA PINHEIRO FRAGATA BELTRÃO

**USO DE SÊMEN BOVINO INCUBADO A DIFERENTES TEMPERATURAS APÓS O
DESCONGELAMENTO EM PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM
TEMPO FIXO**

Orientador(a): Dr. Marcos Vinicius de Castro Ferraz Junior

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas como requisito final para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração Produção Animal.

Manaus - Amazonas

Setembro, 2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- B453u Beltrão, Nelma Pinheiro Fragata
 Uso de sêmen bovino incubado a diferentes temperaturas após o
 descongelamento em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo /
 Nelma Pinheiro Fragata Beltrão. - 2025.
 45 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Marcos Vinicius de Castro Ferraz Junior.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de
 Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Manaus, 2025.
1. Amazônia. 2. Membrana plasmática. 3. Nitrogênio Líquido. 4.
 Qualidade espermática. 5. Taxa de prenhez. I. Ferraz Junior, Marcos
 Vinicius de Castro. II. Universidade Federal do Amazonas. Programa de
 Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros. III. Título
-

A Deus, por ser minha fonte de força e inspiração.
Ao meu esposo Noédson Beltrão e aos meus filhos Júlio e Felipe.

Dedico

AGRADECIMENTOS

De maneira especial, agradeço a Deus e à minha família, meu esposo Noédson Beltrão pelo amor, compreensão e apoio incondicional nos momentos de maior desafio. Aos meus filhos, Júlio e Felipe, minha maior razão de perseverança. Aos meus pais, Júlio e Hizaulina, pelo incentivo desde o início da minha trajetória escolar e acadêmica e pela rede de apoio que se tornaram ao longo dos anos. À minha sogra Edinéia, por me acolher como filha e cuidar tão bem dos meus filhos quando precisei.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros (PPGCARP/UFAM) pela oportunidade e pelo suporte acadêmico e científico que possibilitaram a realização desta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pelo apoio financeiro que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho, por meio dos editais Nº 018/2021 – PDPG/CAPES-FAPEAM e Nº 008/2022 – KUNHÃ/FAPEAM, sem os quais esta pesquisa não teria sido possível.

Expresso minha sincera gratidão ao meu orientador Marcos Vinicius de Castro Ferraz Junior, pelo apoio, amizade, paciência e confiança ao longo deste período. Aos colegas e professores do PPGCARP, pela troca de conhecimentos que muito enriqueceram minha formação.

Aos parceiros de campo, técnicos e estudantes que contribuíram de forma direta ou indireta com a coleta de dados e execução deste trabalho, registro meu profundo reconhecimento.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, estiveram presentes nesta caminhada, contribuindo para que este sonho se tornasse realidade.

Não eu, mas Deus.

São Carlo Acutis

RESUMO

Esta tese teve como objetivo avaliar a viabilidade do uso de sêmen bovino descongelado e posteriormente refrigerado em diferentes temperaturas, visando sua aplicação em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em regiões remotas da Amazônia. No Capítulo II, foi conduzida uma revisão de literatura sobre os lipídios na reprodução de touros, ressaltando a função dos ácidos graxos poli-insaturados, colesterol e fosfolipídios na fluidez e integridade das membranas espermáticas, na motilidade e na resistência ao estresse oxidativo. Essa revisão evidenciou que a composição lipídica do sêmen é um determinante-chave da fertilidade. A alimentação de touros com diferentes tipos de ácidos graxos pode influenciar positivamente os parâmetros de qualidade do sêmen, no entanto, os resultados variam de acordo com o tipo de ácido graxo utilizado, a forma de administração e sua qualidade. No Capítulo III foi avaliado a viabilidade do sêmen bovino comercial descongelado e mantido em refrigeração a 5 °C ou 15 °C. Foram analisadas motilidade, vigor e morfologia espermática ao longo de 48 h de incubação, além da longevidade determinada por teste de termorresistência lento a 38 °C por 5 h. Em campo, 100 vacas foram inseminadas com doses mantidas a 5 °C por 10 h ou com sêmen congelado convencional. Os resultados laboratoriais indicaram redução progressiva da motilidade e do vigor ao longo do tempo ($P < 0,0001$), embora dentro de limites aceitáveis para uso em inseminação artificial (IA). Não foram observadas diferenças significativas entre 5 °C e 15 °C ($P = 0,9927$). Nos ensaios de campo, as taxas de prenhez também não diferiram entre os grupos ($P = 0,8760$). Dessa forma, a refrigeração pós-descongelamento entre 5 °C e 15 °C preserva a qualidade espermática por tempo suficiente para utilização em IATF, sem prejuízo da fertilidade. Essa abordagem representa alternativa custo-efetiva e logisticamente viável para sistemas de produção com acesso limitado à infraestrutura criogênica. Ao integrar fundamentos bioquímicos da fisiologia espermática com soluções aplicadas à pecuária tropical, esta tese contribui para o avanço científico e para a melhoria da eficiência produtiva em regiões de relevância estratégica para a segurança alimentar e o desenvolvimento sustentável.

Palavras-chave: Amazônia; Membrana plasmática; Nitrogênio líquido; Qualidade espermática; Taxa de prenhez.

ABSTRACT

This thesis aimed to evaluate the feasibility of using thawed bovine semen subsequently refrigerated at different temperatures, with a view to its application in fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols in remote regions of the Amazon. In Chapter II, a literature review on lipids in bull reproduction was conducted, highlighting the role of polyunsaturated fatty acids, cholesterol, and phospholipids in sperm membrane fluidity and integrity, motility, and resistance to oxidative stress. This review evidenced that semen lipid composition is a key determinant of fertility. Feeding bulls with different types of fatty acids can positively influence semen quality parameters; however, results vary according to the type of fatty acid used, the route of administration, and its quality. In Chapter III, the viability of thawed commercial bovine semen stored under refrigeration at 5 °C or 15 °C was evaluated. Sperm motility, vigor, and morphology were assessed over 48 h of incubation, in addition to longevity determined by the slow thermoresistance test at 38 °C for 5 h. In the field, 100 cows were inseminated with doses maintained at 5 °C for 10 h or with conventionally frozen semen. Laboratory results indicated a progressive reduction in motility and vigor over time ($P < 0.0001$), although within acceptable limits for use in artificial insemination (AI). No significant differences were observed between 5 °C and 15 °C ($P = 0.9927$). In field trials, pregnancy rates also did not differ between groups ($P = 0.8760$). Thus, post-thaw refrigeration between 5 °C and 15 °C preserves sperm quality for sufficient time to allow its use in FTAI, without impairing fertility. This approach represents a cost-effective and logistically feasible alternative for production systems with limited access to cryogenic infrastructure. By integrating biochemical foundations of sperm physiology with applied solutions for tropical livestock, this thesis contributes to scientific advancement and to the improvement of productive efficiency in regions of strategic relevance for food security and sustainable development.

Keywords: Amazon; Plasma membrane; Liquid nitrogen; Sperm quality; Pregnancy rate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Motilidade Progressiva (A) e Vigor Espermático (B) de sêmen bovino descongelado e refrigerado às temperaturas (T) de 5 °C e 15 °C por até 48 horas.....	39
Figura 2. Teste de Termorresistência Lento (38 °C por 5 h) sobre a motilidade progressiva (A) e o vigor espermático (B) de sêmen bovino descongelado	40
Figura 3. Tamanho do Folículo e Taxa de Prenhez de vacas inseminadas com sêmen congelado e com sêmen descongelado-refrigerado a 5 °C	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais ácidos graxos poli-insaturados utilizados na qualidade espermática em bovinos	25
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Avaliação de sêmen descongelado bovino	4
3.2 Influência do processo de refrigeração, congelamento e descongelamento na qualidade do sêmen.....	5
3.3 Uso de sêmen descongelado-refrigerado em protocolos de IATF e suas implicações logísticas em regiões remotas	8
4. REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO II – LIPÍDIOS NA REPRODUÇÃO DE TOUROS.....	16
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
6. RESULTADOS	17
6.1 Lipídios e suas classificações	17
6.2 Digestão e absorção de lipídios em ruminantes.....	18
6.3 Influência dos ácidos graxos poli-insaturados na qualidade espermática	19
6.4 Efeitos das prostaglandinas na qualidade espermática	22
6.5 Efeito do ácido linoleico conjugado (cla) na qualidade espermática	23
6.6 Efeitos de diferentes fontes de ácidos graxos poli-insaturados na qualidade espermática em bovinos: dados e resultados	24
6.7 Efeitos dos fosfolipídios e do colesterol na qualidade espermática	25
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
8. REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO III - SÊMEN BOVINO DESCONGELADO E REFRIGERADO MANTÉM A FERTILIDADE: UMA ESTRATÉGIA PRÁTICA PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO PARA REGIÕES REMOTAS.....	36
9. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
9.1 Local do Estudo e Comitê de Ética	36
9.2 Ensaio 1 - Qualidade Espermática.....	36
9.3 Ensaio 2 - Teste de Longevidade Espermática.....	37

9.4 Ensaio 3 – Taxa de Prenhez.....	37
9.5 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	38
10. RESULTADOS	39
11. DISCUSSÃO	42
12. CONCLUSÃO.....	44
13. REFERÊNCIAS	45

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que determinam a competitividade da bovinocultura de corte e leite, além de representar um indicador relevante para a sustentabilidade ambiental. Essa eficiência é modulada por múltiplos fatores, entre os quais se destacam a qualidade do sêmen, o estado fisiológico das fêmeas e as condições de manejo reprodutivo, elementos que influenciam diretamente as taxas de concepção, o intervalo entre partos e o avanço genético do rebanho (Hernández et al., 2012; Diskin e Kenny, 2016; Tran et al., 2017).

Do ponto de vista biológico, a composição lipídica dos espermatozoides exerce papel fundamental na integridade da membrana plasmática, na motilidade, na resistência ao estresse oxidativo e na fertilização (Argov-Argaman et al., 2013). Esse tema é aprofundado no Capítulo II, por meio de revisão de literatura sobre lipídios na reprodução de touros, a qual evidencia o papel dos ácidos graxos poli-insaturados, do colesterol e dos fosfolipídios na funcionalidade espermática e mostra que a composição lipídica do sêmen é um determinante da fertilidade. Também aponta que a suplementação com diferentes fontes de ácidos graxos pode alterar parâmetros espermáticos, com resultados dependentes do tipo de ácido graxo, da via de administração e de sua qualidade (Beltrão e Ferraz Junior, 2023). Esses fundamentos bioquímicos se articulam, na prática, com o estado fisiológico das fêmeas e com o manejo reprodutivo, compondo um quadro multifatorial da eficiência reprodutiva.

Nesse contexto, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) destaca-se como uma das principais biotécnicas para intensificação reprodutiva e disseminação genética em bovinos. Ao eliminar a necessidade de detecção de estro e sincronizar a ovulação, a IATF promove ganhos expressivos de eficiência e contribui para o melhoramento genético em larga escala (Ferraz Junior et al., 2016). O avanço e a consolidação dessa técnica no Brasil são evidentes. Em 2018, estimou-se que mais de 13 milhões de vacas foram inseminadas por IATF no Brasil, correspondendo a 86% de todas as inseminações realizadas, com impacto econômico superior a R\$ 3,5 bilhões (Baruselli et al., 2019). Apesar desse crescimento, a adoção técnica por pequenos e médios produtores ainda enfrenta entraves de custos operacionais e limitações logísticas.

O uso de sêmen criopreservado em nitrogênio líquido (-196 °C) é a prática padrão para a IATF, mas a dependência desse insumo impõe barreiras em regiões com infraestrutura precária. No interior da Amazônia, por exemplo, a escassez de estradas, a sazonalidade das

cheias e as longas distâncias tornam o transporte de nitrogênio líquido oneroso e logisticamente complexo. Além disso, a evaporação acelerada em climas quentes eleva a frequência de reabastecimento, aumentando custos e limitando o acesso regular de pequenos e médios produtores à biotecnologia (CNA, 2020; Fernandes et al., 2021).

Diante disso, alternativas mais simples e custo-efetivas de manejo seminal ganham relevância. A refrigeração do sêmen, em substituição ao armazenamento contínuo em nitrogênio líquido, surge como estratégia operacionalmente viável, com estudos reportando taxas de fertilidade *in vitro* comparáveis às obtidas com sêmen congelado em protocolos de IATF. Evidências recentes sugerem que manter o sêmen descongelado em baixas temperaturas preserva parâmetros funcionais por curtos períodos, podendo ampliar a janela temporal de utilização do sêmen, ao passo que temperaturas fisiológicas aceleram perdas espermáticas. (Underwood et al., 2009, 2010a; Faria et al., 2022). Apesar do potencial, faltam ensaios de campo que avaliem a fertilidade real do sêmen descongelado-refrigerado sob condições práticas, principalmente em áreas com limitações logísticas, como o interior da Amazônia.

Dessa forma, esta tese buscou avançar no conhecimento sobre o manejo pós-descongelamento e investigar a refrigeração como alternativa prática para reduzir a dependência do nitrogênio líquido, ampliando a aplicabilidade da IATF em sistemas de produção localizados em regiões remotas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade do uso de sêmen bovino descongelado submetido à refrigeração em diferentes temperaturas, visando sua aplicação em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar revisão bibliográfica sobre o papel dos lipídios na qualidade espermática, sua relação com criopreservação e estratégias de suplementação nutricional;
- Comparar a motilidade, o vigor e morfologia espermática do sêmen descongelado incubado a 5 °C e 15 °C por até 48 horas;
- Avaliar a longevidade espermática pós-descongelamento;
- Verificar a taxa de prenhez de vacas submetidas à IATF com sêmen descongelado e posteriormente refrigerado a 5 °C.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Avaliação de sêmen descongelado bovino

O processo de criopreservação impacta na qualidade espermática devido a diversos fatores envolvidos, como os crioprotetores utilizados e as curvas de resfriamento e congelamento (Forero-Gonzalez et al., 2012). Os danos potenciais causados durante esse processo afetam diretamente a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides no sistema reprodutor feminino (Bag et al., 2004). Para minimizar essas lesões e otimizar o número de espermatozoides viáveis, a escolha adequada dos crioprotetores e a adoção de protocolos eficientes são fundamentais.

Métodos de análise laboratorial de sêmen descongelado bovino já foram estudados, porém quando se trata de correlação entre os parâmetros espermáticos e os índices de fertilidade *in vivo*, os dados ainda são variáveis (Freitas-Dell'Aqua et al., 2013). Apesar dos avanços em relação ao uso do glicerol como agente protetor para os espermatozoides, a viabilidade espermática ainda se mantém em torno de 50%, mesmo com as melhores técnicas de criopreservação (Watson, 1995; Ohashi, 2001). Isso reforça a importância de não se basear apenas em um único fator bioquímico ou morfológico para avaliar a funcionalidade do espermatozoide, como enfatizado por Melo e Henry (1999). A combinação de diversos fatores é essencial para obter um diagnóstico mais abrangente sobre a funcionalidade e integridade dos espermatozoides.

A análise laboratorial de sêmen bovino congelado geralmente se baseia em técnicas de microscopia de luz, considerando parâmetros como motilidade, vigor, concentração e morfologia. No entanto, esses parâmetros tradicionais podem ser limitados para prever com precisão o potencial fertilizante do sêmen. Pesquisadores têm buscado associar testes estruturais e funcionais para estimar a integridade das células espermáticas e sua alta correlação com as taxas de prenhez (Januskauskas et al., 2001). Estudos como o de Siqueira et al. (2007) não encontraram correlação entre os testes complementares e motilidade pós-descongelamento com a taxa de prenhez. Nenhum parâmetro considerado isoladamente serviu para avaliar a capacidade fertilizante do sêmen congelado/descongelado. Por outro lado, Phillips et al. (2004), após análises laboratoriais, isoladamente, obteve apenas correlação positiva entre morfologia espermática pós-descongelamento e taxa de concepção após inseminação artificial. Além disso, as melhores equações preditivas encontradas surgiram dos resultados associados à morfologia espermática, possibilitando a identificação de touros com maior ou menor potencial de fertilidade.

Esses resultados destacam a necessidade de desenvolver testes complementares para a avaliação seminal, como os testes de termoresistência (TTR), hipo-osmótico (HO) e de reação acrossômica. O teste de termoresistência envolve a incubação de amostras de sêmen descongeladas a 38 °C por 5h (teste lento) ou a 46 °C por 30 min (teste rápido) (CBRA, 2013). O teste hiposmótico é utilizado para avaliar a viabilidade funcional da membrana plasmática do espermatozoide, que é importante para diversos eventos fisiológicos durante a fertilização. Já o teste de reação acrossômica é realizado quando a capacitação espermática é induzida através de incubação do sêmen com heparina, e em seguida, avaliada a taxa de espermatozoides com reação acrossômica (Steinholt et al., 1991).

De acordo com Henry e Neves (1998), o sêmen bovino descongelado apresenta boa qualidade quando, após o teste de termoresistência, apresentar pelo menos 15% de motilidade espermática progressiva retilínea e escore 3, em escala de 1 a 5, de vigor espermático. Dessa forma, uma vez que os espermatozoides são células complexas, cujo papel na reprodução depende da funcionalidade de diversos atributos, o maior entendimento da qualidade espermática em amostras seminais é de grande importância. Isso possibilita para que as aplicações a campo possam externar o mais fiel possível as expectativas que as avaliações *in vitro* projetam, promovendo uma correlação positiva entre os índices de fertilidade *in vivo* e os resultados dos testes laboratoriais.

3.2 Influência do processo de refrigeração, congelamento e descongelamento na qualidade do sêmen

A utilização de sêmen congelado de alta qualidade por meio da inseminação artificial (IA) é uma biotécnica que oferece inúmeras vantagens à produção animal, principalmente por permitir a obtenção de animais com alto mérito genético (Lima et al., 2010). O processo de criopreservação, que envolve a utilização de crioprotetores específicos para armazenar as doses de sêmen em nitrogênio líquido a -196 °C por tempo indeterminado, compreende diferentes etapas cruciais, incluindo as taxas de resfriamento e congelamento. Essas fases têm um impacto significativo na qualidade do sêmen descongelado, uma vez que os espermatozoides são submetidos a diversos fatores estressantes, como redução de temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento. Os crioprotetores, por sua vez, são substâncias que fornecem, temporariamente, energia, proteção à redução de temperatura e manutenção do ambiente favorável à sobrevivência da célula. Eles têm o objetivo de reduzir os danos causados às células durante o processo de congelamento. Além disso, diversas substâncias foram estudadas e aprovadas por serem bons crioprotetores (Purdy, 2006).

Visando minimizar as variações nas curvas de resfriamento e congelamento do sêmen, diversos estudos têm buscado aprimorar as técnicas de criopreservação, empregando aparelhos computadorizados projetados para esse fim. Esses dispositivos têm como objetivo principal fornecer curvas de temperaturas programáveis e homogêneas (González, 2004), evitando choques térmicos nos espermatozóides e padronizando partidas de sêmen mais homogêneas. Embora essas unidades programáveis para criopreservação de sêmen sejam facilmente adquiridas, seu custo ainda é muito alto quando comparado às técnicas de criopreservação mais simples e menos onerosas utilizadas a campo. Nesse contexto, Rodello (2006) conduziu um estudo comparativo entre diferentes métodos de resfriamento e congelamento, em comparação ao automatizado. Ao utilizar bolsas de água durante a refrigeração do sêmen ovino em uma geladeira, ele conseguiu atingir uma qualidade espermática e uma taxa de queda de temperatura de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, semelhantes às conseguidas em sistema automatizado. Esse resultado demonstra que é possível adotar um método viável de resfriamento e posterior congelamento de sêmen com recursos mais acessíveis.

Outro estudo foi conduzido com sistemas alternativos de refrigeração de sêmen ovino, incluindo o uso ou não de bolsas de água em refrigeradores domésticos e balcão com temperatura controlada. Os pesquisadores investigaram os efeitos desses métodos sobre a qualidade do sêmen criopreservado e constataram que o uso de bolsas de água durante a refrigeração é eficiente em controlar a queda de temperatura, alcançando taxas de resfriamento de $-0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ no refrigerador e $-0,45^{\circ}\text{C}/\text{min}$ no balcão (Lima et al., 2010). Em contraste, Dias et al. (2018) compararam cinco métodos de resfriamento com dois métodos de congelamento e analisaram a qualidade do sêmen descongelado. Os resultados indicaram que os sistemas programáveis foram mais eficientes para o resfriamento do sêmen, especialmente quando considerado o parâmetro de cinética espermática *in vitro* após o descongelamento. Por outro lado, a pesquisa conduzida por Abud et al. (2014) concluiu que os sistemas de criopreservação de sêmen bovinos automatizado e convencional proporcionaram a mesma eficiência na proteção aos espermatozóides congelados quando utilizado diluentes tris-gema-glicerol. Com isso, a escolha do método mais adequado depende do técnico responsável e deve considerar a realidade de cada propriedade.

Apesar do sêmen congelado ser utilizado há anos na aplicação de tecnologias reprodutivas, o congelamento de sêmen apresenta algumas desvantagens, inclusive pelo fato de diminuir a fertilidade dos espermatozóides, principalmente quando os reprodutores são intolerantes ao processo de criopreservação com significativa queda na fertilidade espermática após o processamento (Watson, 2000). Neste sentido, Vishwanath (2003) destaca que o sêmen

refrigerado de bovinos oferece vantagens, como a otimização de touros com baixa resistência ao congelamento do sêmen, eliminação dos custos de estocagem e facilidade de manipulação na inseminação artificial em comparação com o sêmen congelado. A refrigeração de sêmen tem como objetivo reduzir o metabolismo espermático, mantendo o potencial fertilizante e prolongando a viabilidade dos espermatozoides (Batellier et al., 2001). Isso proporciona maior flexibilidade no uso do sêmen refrigerado em comparação ao sêmen fresco (Vishwanath & Shannon, 2000). A temperatura mais utilizada para refrigeração de sêmen sem congelar é de 4 a 5°C (Silva et al., 2002).

Segundo Freitas-Dell'Aqua et al. (2013), o sêmen refrigerado tem sido amplamente utilizado em protocolos de IATF, podendo resultar em maiores taxas de concepção quando comparado ao sêmen congelado, em virtude de sua maior viabilidade celular. No entanto, durante o processo de resfriamento, especialmente nas transições de temperatura entre 20 °C e 5 °C, a membrana plasmática dos espermatozoides pode sofrer alterações estruturais irreversíveis, caracterizadas por ruptura e perda da organização de seus arranjos lipídicos (Quinn et al., 1980). Esse fenômeno, descrito como a transição do estado líquido para o estado cristalino (fase gel), ocorre tanto no resfriamento quanto no congelamento profundo, sendo particularmente crítico na criopreservação, quando se associa à formação de cristais de gelo intra e extracelulares (Watson, 2000). Assim, ainda que o sêmen refrigerado ofereça vantagens práticas, o controle da velocidade e da faixa de temperatura de resfriamento é fundamental para minimizar danos estruturais e funcionais às células espermáticas.

Apesar dessa fase ser delicada, o sêmen refrigerado não passa pelo processo de congelamento e descongelamento, o que favorece a preservação da viabilidade celular e, conseqüentemente, pode elevar a taxa de concepção em relação ao sêmen congelado do mesmo touro. Estudos de campo reportaram ganhos médios de cerca de 10 a 14 % na taxa de prenhez quando compararam sêmen refrigerado e congelado em protocolos de IATF (Crespilho et al., 2012; Papa et al., 2015; Borges-Silva et al., 2016; Resende et al., 2018). Na prática, a programação dos protocolos de sincronização permite organizar a coleta e o uso do sêmen refrigerado em vacas previamente tratadas, viabilizando sua aplicação em sistemas comerciais. Mais recentemente, Silva et al. (2020) mostrou que o sêmen refrigerado a 5 °C por 24 ou 48 h, em dois diluidores diferentes, manteve taxas de prenhez em torno de 49%, sem diferença entre os tratamentos. Revisão técnica também aponta resultados consistentes em diferentes raças, embora ainda faltem análises sistemáticas sobre custo-benefício, escolha do diluidor, padronização de equipamentos e taxas de prenhez consolidadas em larga escala (Almeida et al.,

2023). Apesar da escassez de estudos abrangentes, as evidências disponíveis são promissoras e justificam a continuidade das investigações sobre o uso do sêmen refrigerado na IATF.

As lesões de membrana plasmática não ocorrem apenas durante o congelamento, mas também no descongelamento, etapa igualmente crítica para a viabilidade espermática. A rápida transição térmica de -196 °C para 37 °C em cerca de 30 segundos pode causar rearranjos de lipídios e proteínas da membrana, favorecendo perdas estruturais e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Watson, 1995; Holt, 2000; Zenteno et al., 2023). Essas alterações impactam diretamente a motilidade e a integridade celular, tornando o momento do descongelamento determinante para a funcionalidade espermática. Estudos *in vitro* indicam ainda que o congelamento-descongelamento compromete de forma mais acentuada a capacidade de fertilização em touros de baixa fertilidade. No entanto, uma vez que a fecundação é alcançada, não há diferenças relevantes na competência dos embriões produzidos em relação aos de touros de alta fertilidade (Al Naib et al., 2011). Nesse contexto, compreender as limitações do congelamento e do descongelamento abre espaço para avaliar estratégias complementares, como o uso de sêmen refrigerado ou a refrigeração após o descongelamento.

3.3 Uso de sêmen descongelado-refrigerado em protocolos de IATF e suas implicações logísticas em regiões remotas

Antes de abordar diretamente o uso do sêmen descongelado-refrigerado em protocolos de IATF, é importante destacar estudos que investigaram as limitações do espermatozoide frente a diferentes manipulações após o descongelamento. Hollinshead et al. (2004) observaram que espermatozoides bovinos não toleram um segundo ciclo de congelamento e descongelamento, mas mantêm viabilidade após sexagem seguida de congelamento e descongelamento, quando incubados por 3 h a 37 °C. De forma semelhante, Underwood et al. (2009) exploraram as características *in vitro* de sêmen descongelado, sexado e submetido a diferentes condições de incubação. Os espermatozoides mantidos a 15 °C preservaram motilidade de aproximadamente 66% e integridade acrossomal/viabilidade em torno de 65% por até 24 h. Mesmo após reaquecimento por 6 h a 37 °C, níveis funcionais aceitáveis foram mantidos. Em contrapartida, quando incubados continuamente a 37 °C, apresentaram rápida queda de motilidade, integridade de membrana e atividade mitocondrial já a partir de 4 h. Em trabalho complementar, Underwood et al. (2010a) verificaram que sêmen sexado e recongelado manteve capacidade de fertilização *in vitro* semelhante à de controles não sexados, sugerindo preservação parcial da competência funcional. Contudo, em ensaios *in vivo*, as taxas de prenhez foram drasticamente reduzidas, variando de 4 a 14% contra 45 a 75% nos grupos controle, além

de elevadas perdas gestacionais (Underwood et al., 2010b, 2010c). Esses achados reforçam que manipulações adicionais pós-descongelamento, como recongelamento, comprometem severamente a fertilidade real, ainda que a funcionalidade seja mantida *in vitro*.

A refrigeração do sêmen tem sido proposta como alternativa operacionalmente mais simples em IATF, sobretudo em contextos nos quais o acesso a suprimentos criogênicos é limitado. Isso reforça o potencial dessa estratégia como solução prática em condições de campo. (Borges-Silva et al., 2020). Em bovinos, estudos de campo com sêmen refrigerado (sem congelamento) mostram desempenho reprodutivo comparável e, em alguns casos, superior ao do sêmen congelado. Em bovinos de corte, protocolos de sincronização com sêmen refrigerado resultaram em taxas de prenhez satisfatórias, ainda que variáveis conforme o tipo de protocolo hormonal e o touro utilizado (Bucher et al., 2009). Em um ensaio com 838 vacas Nelore submetidas à IATF, o uso de sêmen refrigerado elevou a taxa de prenhez em aproximadamente 20% em relação ao sêmen congelado (59,9% vs. 49,4%; $P < 0,005$) (Borges-Silva et al., 2016). Em sistemas leiteiros, estudos reforçam que fatores como temperatura de armazenamento (22 a 5 °C), concentração espermática por dose e tempo até a inseminação modulam a fertilidade do sêmen refrigerado (Murphy et al., 2015).

Embora a maior parte da literatura sobre sêmen refrigerado envolva amostras não congeladas, há trabalhos relevantes sobre a manutenção do sêmen após o descongelamento. Underwood et al. (2009) demonstraram que a incubação a 15 °C pode preservar motilidade e integridade acrossomal por até 24 h, enquanto a 37 °C acelera as perdas funcionais. De forma semelhante, Faria et al. (2022) verificaram que o armazenamento pós-descongelamento a 4 °C preserva melhor motilidade, integridade de membrana e acrossomo por até 8 h, enquanto a 37 °C o declínio foi acentuado. Botta et al. (2019) acrescentaram que a incubação entre 36 e 39,5 °C por 4 h compromete severamente a motilidade e a integridade de membrana, com reflexo negativo na fertilidade *in vitro*. De maneira geral, a literatura indica que temperaturas baixas (5 - 15 °C) após o descongelamento podem ampliar a janela de uso do sêmen, embora os resultados de campo ainda sejam limitados e heterogêneos.

Esse debate ganha relevância em regiões como a Amazônia, onde a logística de uso do nitrogênio líquido impõe sérias restrições. A dependência de cadeias frias especializadas, associada às longas distâncias, sazonalidade das cheias e dificuldade de transporte rodoviário, torna o deslocamento frequentemente dependente de vias fluviais ou aéreas, elevando custos e reduzindo a regularidade do abastecimento (Fernandes et al., 2021). Um levantamento da CNA (2020) mostrou que o custo do nitrogênio líquido para inseminação artificial no Amazonas foi reduzido em 62,23% por meio de iniciativas setoriais, evidenciando que preço e disponibilidade

são barreiras concretas à adoção de biotécnicas reprodutivas na região. Em paralelo, análises nacionais destacam a expansão da IATF no Brasil, mas alertam que propriedades menores ainda enfrentam restrições orçamentárias e operacionais, reforçando a necessidade de protocolos mais acessíveis e custo-efetivos (Baruselli et al., 2019).

Em síntese, evidências *in vitro* sugerem que o sêmen descongelado pode ser mantido refrigerado em baixas temperaturas (5 a 15 °C) por períodos curtos sem prejuízo imediato da funcionalidade, representando uma alternativa promissora para reduzir a dependência do nitrogênio líquido em regiões remotas. No entanto, faltam ensaios de campo padronizados que confirmem taxas de prenhez comparáveis às obtidas com sêmen convencional, estratificando fatores como touro, diluente, tempo de armazenamento e condições logísticas reais. Essa lacuna fundamenta a presente tese, que busca avaliar de forma sistemática o efeito de duas temperaturas de refrigeração pós-descongelamento sobre a viabilidade espermática e a fertilidade *in vivo*, com aplicação prática no contexto amazônico.

4. REFERÊNCIAS

- ABUD, C. O. G.; ABUD, L. J.; OLIVEIRA NETO, J. C.; DODE, M. A. N.; SERENO, J. R. B.; MARTINS, C. F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 15, n. 1, p. 32-37, 2014. <https://doi.org/10.5216/cab.v15i1.12233>
- ALMEIDA, J.; MARQUES JUNIOR, A. P.; RESENDE, O. A. Sêmen refrigerado – estado da arte em diferentes espécies. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 47, n. 1, p. 3-21, jan./mar. 2023. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2023.001>
- AL NAIB, A.; HANRAHAN, J. P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriogenology*, v. 76, n. 1, p. 161-167, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.038>
- ARGOV-ARGAMAN, N.; MAHGREFTHE, K.; ZERON, Y.; ROTH, Z. Season-induced variation in lipid composition is associated with semen quality in Holstein bulls. *Reproduction*, v. 145, p. 479–489, 2013. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0498>
- BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S. M. K.; MITTAL, J. P. Effect of post-thaw incubation on sperm Kinematics and acrossomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. *Theriogenology*, v. 62, p. 415-424, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.018>
- BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J. M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n. 3-4, p. 181-190, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00155-5)
- BARUSELLI, P. S.; CATUSSI, B. L. C.; ABREU, L. Â.; ELLIFF, F. M.; SILVA, L. G.; BATISTA, E. O. S. Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. *Animal Reproduction*, v. 16, n. 3, p. 364-375, 2019. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0050>
- BELTRÃO, N.P.F.; DE CASTRO FERRAZ JUNIOR, M.V. Lipídios na reprodução de touros. *Tropical Animal Health Production* 55, 324 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11250-023-03720-2>
- BORGES-SILVA, J. C.; SILVA, M. R.; MARINHO, D. B.; NOGUEIRA, E.; SAMPAIO, D. C.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; MOURÃO, G. B.; SARTORI, R. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 7, p. 1004-1008, 2016. <https://doi.org/10.1071/RD14185>
- BORGES-SILVA, J. C.; SILVA, M. R.; MASSONETO, J. F. M.; LORO, P. S.; ALVES, I. A. C.; NOGUEIRA, E.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; MARINHO, D. B. Bovine chilled semen by 24h or 48h in two different commercial extenders for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal Reproduction*, v. 17, n. 3, p. 946, 2020. Abstracts of the 34th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), Florianópolis, 2020.
- BOTTA, D.; SANTOS, H. B.; SANTOS, J. S.; GUIMARÃES, D. B.; OLIVEIRA, R. V.; DODE, M. A. N. Influence of post-thawing thermal environment on bovine sperm

characteristics and IVF outcomes. *Andrologia*, v. 51, n. 6, e13266, 2019. <https://doi.org/10.1111/and.13266>

BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J. B.; DEJARNETTE, J. M.; WHITTIER, W. D.; KÄHN, W.; XU, Z. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone-supplemented CO-Synch protocol in beef cows. *Theriogenology*, v. 71, n. 7, p. 1180-1185, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.009>

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). Em atendimento a pleito da FAEA, White Martins reduz em 62% o preço do nitrogênio líquido para inseminação artificial animal. Brasília, DF, 2020. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/em-atendimento-a-pleito-da-faea-white-martins-reduz-em-62-o-preco-do-nitrogenio-liquido-para-inseminacao-artificial-animal>. Acesso em: 01 set. 2025

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.

CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; SANTOS, M. P.; SÁ FILHO, M. F. Use of cooled bull semen as strategy to increase the pregnancy rate in fixed time artificial insemination programs-case report. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, v. 4, n. 7, p. 175-179, 2012. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2012.175.179>

DIAS, E. A. R.; CAMPANHOLI, S. P.; ROSSI, G. F.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P. F.; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; ZORZETTO, M. F.; PAZ, C. C. P.; OLIVEIRA, L. Z.; MERCADANTE, M. E. Z.; MONTEIRO, F. M. Evaluation of cooling and freezing systems of bovine sêmen. *Animal Reproduction Science*, v. 195, p. 102-111, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.012>

DISKIN, M. G.; KENNY, D. A. Managing the reproductive performance of beef and dairy cows. *Theriogenology*, 86, 27-40, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.052>

FARIA, L. C. de; PEREIRA, B. de O.; PIVATO, I.; MION, B.; SPRICIGO, J. F. W.; DODE, M. A. N. Effects of thawing and storage temperature on sperm viability of Nelore and Holstein bulls. *Animal Reproduction*, v. 19, n. 2 (suppl.), e22118, 2022. Anais...35th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE).

FERRAZ JUNIOR, M. V. C.; PIRES, A. V.; BIEHL, M. V.; SANTOS, M. H.; BARROSO, J. P. R.; GONÇALVES, J. R. S.; SARTORI, R.; DAY, M. L. Comparison of two timed artificial insemination system schemes to synchronize estrus and ovulation in Nellore cattle. *Theriogenology*, v. 86, p. 1939-1943, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.012>

FERNANDES, C. A. C.; FREITAS-DE-MELO, A.; BERTANHA, M.; GUIMARÃES, A. L.; GOMES, T. M. C.; COSTA, C. B.; MOREIRA, H. P.; FERREIRA, H. N. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos: passado, presente e futuro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 45, n. 2, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar2021-0034>

FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; BRESSAN, F. F.; ARRUDA, R. P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, v. 44, supl. 1, p. 154-159, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01154.x>

FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; MONTEIRO, G. A.; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A.; PAPA, F. O. The effects of refrigeration temperature and storage time on apoptotic markers in equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 33, n. 1, p. 27-30, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.04.011>

GONZÁLEZ, R. A. F. Efeito da criopreservação utilizando diferentes técnicas de criopreservação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino. 2004. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

HENRY, M.; NEVES, J. P. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 91 p.

HERNÁNDEZ, M. M. R. et al. Suplementação de touros com sabões cálcicos de ácidos graxos poli-insaturados e qualidade seminal pré e pós-congelação. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 49, 6, 471–479, 2012.

HOLLINSHEAD, F. K.; O'BRIEN, J. K.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. *Theriogenology*, v. 62, n. 5, p. 958-968, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.030>

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*, v. 55, p. 947-981, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00456-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00456-3)

LIMA, L. F.; MOURA, P.; PASSOS, P. I. B.; LEAL, D. R.; RUMPF, R.; NEVES, J. P. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 835-844, out./dez. 2010. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/4252>. Acesso em: 13 jan. 2025.

MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 1, p. 71-78, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0102-09351999000600009>

MURPHY, C.; HOLDEN, S. A.; MURPHY, E. M.; LYONS, S. M.; LONERGAN, P.; FAIR, S. The impact of storage temperature and sperm number on fertility of liquid-stored bull semen. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27, n. 6, p. 1082-1089, 2015. <https://doi.org/10.1071/RD14369>

OHASHI, O. M. Inseminação Artificial de Bubalinos. In: GONSALVES, P. B., FIQUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal*. Livraria Varela, p. 97-110, 2001.

PAPA, P. M.; MAZIERO, R. M.; GUASTI, P. N.; JUNQUEIRA, C. R.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; PAPA, F. O.; VIANA, F. P.; ALVARENGA, M. A.; CRESPILOHO, A. M.; DELL'AQUA JR., J. A. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*, v. 83, n. 1, p. 107-113, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.009>

PHILLIPS, N. J.; MCGOWAN, M. R.; JOHNSTON, S. D.; MAYER, D. G. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Animal Reproduction Science*, v. 81, p. 47-61, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.10.003>

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v. 63, p. 215-225, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 60, n. 2, p. 403-407, 1980. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0600403>

RESENDE, O. A.; ALVES, P. A. P. M.; FAJARDO, R. S. L.; ALMEIDA, J.; SILVA, O. R.; MELLO, M. R. B. Eficiência do sêmen refrigerado na IATF de vacas Girolando. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY, 32., 2018, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: SBTE, 2018. p. 209.

RODELLO, L. Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen ovino. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P. da; HENRY, M.; TORRES, C. A. A.; SILVA, M. V. G. B. da; SILVEIRA, T. da S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 36, n. 2, p. 387-395, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007000200016>

STEINHOLT, H. C.; CHANDLER, J. E.; TIRADO, V. Evaluating acrosome reaction steps with brightfield and differential interference contrast microscopy techniques. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3822-3826, 1991. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78574-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78574-3)

SILVA, L.D.M.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Eds). *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2002.

SILVA, J. C. B.; SILVA, M. R.; SILVA, R. G.; MASSONETO, J. F.; LORO, P. S.; ALVES, I. A. C.; NOGUEIRA, E.; NICACIO, A. C.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; MARINHO, D. B. *Sêmen refrigerado bovino em protocolos de IATF: o que sabemos até o momento?* Corumbá: Embrapa Pantanal, 2020. 17 p. (Documentos / Embrapa Pantanal, 166). Disponível em: <https://www.embrapa.br/pantanal>. Acesso em: 25 jan. 2025.

TRAN, L.V.; MALLA, B.A.; KUMAR, S.; TYAGI, A.K. Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction - A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(5), 622-637, 2017. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.1034>

UNDERWOOD, S. L.; BATHGATE, R.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. *In vitro* characteristics of frozen-thawed, sex-sorted bull sperm after refreezing or incubation at 15 or 37 °C. *Theriogenology*, v. 72, p. 1001–1008, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.023>

UNDERWOOD, S. L.; BATHGATE, R.; PEREIRA, D. C.; CASTRO, A.; THOMSON, P. C.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Embryo production after *in vitro* fertilization with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. *Theriogenology*, v. 73, p. 97–102, 2010a. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.08.005>

UNDERWOOD, S. L.; BATHGATE, R.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 118, p. 171-175, 2010b. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.08.007>

UNDERWOOD, S. L.; BATHGATE, R.; EBSWORTH, M.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 118, p. 7-12, 2010c. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.004>

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n. 1-3, p. 23-53, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00153-6)

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v. 59, n. 2, p. 571-584, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01241-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01241-4)

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 481-492, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)

ZENTENO, E. S.; ROJANO, B.; BETANCUR, G. R. Influence of thawing temperature on sperm motility, structure, and metabolism of frozen bovine semen. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 53, n. 3, e20210731, 2023. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210731>

CAPÍTULO II – LIPÍDIOS NA REPRODUÇÃO DE TOUROS

Os resultados deste capítulo foram publicados na forma de artigo de revisão sob o seguinte referencial:

Beltrão, N.P.F., de Castro Ferraz Junior, M.V. Lipídios na reprodução de touros. *Tropical Animal Health Production* 55, 324 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11250-023-03720-2>

5. MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica no Portal de Periódicos da Capes e nas bases de dados PubMed, Web of Science e Elsevier, abrangendo estudos publicados nos últimos 15 anos, sem restrição quanto a referências conceituais. Para a seleção dos trabalhos, utilizaram-se os seguintes termos de busca em inglês e português: *polyunsaturated fatty acids, cattle, cholesterol, phospholipids, semen quality e reproduction*.

6 RESULTADOS

6.1 Lipídios e suas classificações

Os lipídios são moléculas orgânicas formadas por ácidos graxos e álcoois, como óleos e gorduras. Eles constituem um grupo heterogêneo de compostos relacionados que apresentam propriedades físicas comuns, como a insolubilidade em água, mas são solúveis em solventes apolares, como éter, clorofórmio, óleos, esteroides e ceras (Botham and Mayes 2014). Os lipídios são encontrados principalmente nas folhas e sementes das plantas. Os tipos de lipídios variam desde fosfolipídios e galactolipídios, presentes nas folhas, até triglicerídeos, localizados como substância de reserva nas sementes. Além destes, ceras, carotenóides, clorofila, algumas vitaminas e outras substâncias solúveis em éter também são encontradas nas plantas (Salman et al. 2010). Eles estão presentes em quantidades que variam de cerca de 40% nos corpos animais até 3,5% em plantas forrageiras, e de 18 a 40% em oleaginosas (Lana 2005; Palmquist and Mattos 2006).

Os lipídios podem ser classificados em simples, complexos, precursores e derivados. Os lipídios simples são ésteres de ácidos graxos com vários álcoois, como gorduras, óleos e ceras. Os lipídios complexos são ésteres de ácidos que contêm outras substâncias adicionais além de ácidos graxos e álcoois, como os fosfolipídios, que são lipídios contendo ácidos graxos associados a um resíduo de ácido fosfórico e a um composto nitrogenado; glicolipídios (glicosfingolipídios), que contêm um ácido graxo, esfingosina e um carboidrato. Outros lipídios complexos, como sulfolipídios e aminolipídios, com as lipoproteínas também se enquadram nesta categoria. Por fim, os lipídios precursores e derivados incluem ácidos graxos, glicerol e esteróis, aldeídos graxos e corpos cetônicos, hidrocarbonetos, vitaminas lipossolúveis e hormônios (Botham and Mayes 2014).

Com relação à nutrição animal, a principal classe de interesse são os ácidos graxos, que representam cerca de 90% dos triglicerídeos. Estes são a principal forma de armazenamento de lipídios tanto em plantas quanto em animais. Os triglicerídeos são formados por uma molécula de glicerol ligada a três ácidos graxos (Caetano et al. 2020). Os ácidos graxos são classificados em três grupos quanto à insaturação (ligações duplas), saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Os ácidos graxos saturados não possuem ligações duplas em suas cadeias. Os ácidos graxos monoinsaturados possuem apenas uma insaturação, e os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) possuem duas ou mais insaturações. Além disso, a configuração dos ácidos graxos pode ocorrer em duas formas isoméricas na molécula, CIS e TRANS, que correspondem a moléculas de ácidos graxos que possuem a mesma composição química, mas diferem na posição dos átomos de H no plano horizontal da ligação dupla. Quando estão do mesmo lado,

são chamados CIS, e se estiverem em lados opostos, são chamados TRANS (Medeiros et al. 2015).

O estado físico de um lipídio à temperatura ambiente é determinado pelo seu ponto de fusão, que é influenciado pelo grau de saturação e pelo tamanho de sua cadeia carbônica (Kozloski 2017). O grau de insaturação tem um efeito importante sobre a digestão de lipídios pelos animais, principalmente em ruminantes, nos quais a fermentação de carboidratos fibrosos no rúmen é influenciada pelo tipo e teor de lipídios (Caetano et al. 2020). Assim, enfatiza-se que a classificação dos lipídios, bem como sua aplicabilidade na nutrição animal, já está bem elucidada, mas é necessário investigar mais a fundo os efeitos do fornecimento de ácidos graxos em dietas animais que possam ter efeitos benéficos sobre a reprodução.

Os lipídios desempenham papéis importantes no organismo animal, como serem uma fonte eficiente de energia, atuarem como isolante térmico que permite a condução nervosa e previne a perda de calor, auxiliarem na absorção de vitaminas, atuarem como camada protetora para os tecidos e o corpo e serem um componente estrutural e funcional das biomembranas (Motta 2009).

6.2 Digestão e absorção de lipídios em ruminantes

A alimentação animal pode ser otimizada com o uso de lipídios, uma vez que esses nutrientes aumentam a absorção de vitaminas lipossolúveis, fornecem ácidos graxos essenciais para a membrana dos tecidos e atuam como precursores na regulação do metabolismo. É importante destacar que a extensão, a insaturação, a ramificação e a posição geométrica das ligações duplas dos ácidos graxos influenciam suas características químicas e funções biológicas (Andriguetto et al. 2002). Os ruminantes normalmente consomem uma dieta com concentração de lipídios em torno de 3 a 4% com base na matéria seca, principalmente na forma de triacilglicerol. No entanto, o excesso de lipídios pode ter efeitos negativos, inibindo a fermentação ruminal e o crescimento microbiano devido à toxicidade dos ácidos graxos insaturados para os microrganismos do rúmen.

O processo de biohidrogenação dos ácidos graxos ocorre no rúmen e é desencadeado pelo excesso de lipídios na alimentação animal. Esse mecanismo é realizado por bactérias anaeróbias que convertem ácidos graxos insaturados presentes nos alimentos em ácidos graxos saturados, por meio da adição de hidrogênio (Harfoot et al. 1997). Esse processo promove mudanças significativas na composição dos ácidos graxos absorvidos pelo intestino e liberados na corrente sanguínea dos animais (Jenkins et al. 2008). Além disso, a biohidrogenação dos ácidos graxos induz a produção de ácidos linoleicos conjugados (CLA), que possuem

importantes propriedades funcionais. É relevante enfatizar que a biohidrogenação dos ácidos graxos pode ser manipulada para melhorar a qualidade nutricional dos alimentos de origem animal (Jenkins et al. 2008), além de seus efeitos sobre outras funções, como a reprodução, que é um dos objetos de estudo.

Uma parte dos ácidos graxos liberados no rúmen pode ser absorvida pelas células microbianas, mas a maior parte escapa com o digesta e passa para o abomaso e o intestino delgado, onde ocorrem a digestão e a absorção. Esses processos podem ser divididos em quatro fases: emulsificação, hidrólise, formação de micelas e absorção. A emulsificação começa no abomaso, com o objetivo de reduzir as gotículas de lipídios por meio do aumento da temperatura, da mistura e da agitação, facilitando a passagem para o intestino delgado. A emulsificação é completada pelos sais biliares, que solubilizam os lipídios em água, reduzindo a tensão superficial e transformando a gordura em pequenas gotículas lipídicas. Isso facilita a ação da lipase pancreática e da co-lipase, que hidrolisam os triacilgliceróis por ação combinada. A co-lipase adere às gotículas lipídicas, abrindo espaço para a ação da lipase, que quebra a ligação dos ácidos graxos em cada extremidade da molécula de triacilglicerol. Esse processo resulta em dois ácidos graxos livres e um monoacilglicerol para cada molécula de triacilglicerol hidrolisada (Palmquist and Mattos 2006).

Após a hidrólise, formam-se micelas, pequenos aglomerados solúveis em água de sais biliares e lipídios. Essa associação facilita a passagem dos lipídios através da camada aquosa estacionária da membrana plasmática dos enterócitos, permitindo a absorção dos ácidos graxos. Durante esse processo, os elementos lipídicos difundem-se através do glicocálice até a membrana apical por meio de proteínas ligadoras de ácidos graxos (FABP). Monoacilgliceróis, colesterol e vitaminas lipossolúveis difundem-se pela membrana apical sem necessidade de mediadores, já que a membrana apical é composta principalmente por fosfolipídios. A partir daí, todos os componentes da micela alcançam os enterócitos, exceto os sais biliares. Após esse processo, os principais ácidos graxos são novamente transformados em triacilgliceróis e fosfolipídios, juntamente com colesterol e proteínas do retículo endoplasmático, formando quilomícrons, que são transportados pelos capilares linfáticos até o fígado para serem metabolizados (Palmquist and Mattos 2006).

6.3 Influência dos ácidos graxos poli-insaturados na qualidade espermática

Os ácidos graxos são fontes de energia e componentes fundamentais nas estruturas e atividades celulares, além de desempenharem um papel crucial na regulação das propriedades e atividades das membranas celulares (Santos et al. 2008). Nos espermatozoides,

especificamente, eles influenciam a permeabilidade e a fluidez da membrana plasmática. As alterações no comprimento, no grau de insaturação e na posição das ligações duplas dos ácidos graxos resultam em efeitos significativos na qualidade espermática. Os principais efeitos são a mudança na fluidez e permeabilidade da membrana, a influência sobre a motilidade e, conseqüentemente, sobre a capacidade de fusão com o óvulo durante a fertilização (Staples et al. 1998).

Pesquisas mostraram que existe variação sazonal na composição de ácidos graxos e colesterol no sêmen bovino e que isso está relacionado à qualidade seminal. Por exemplo, em um estudo conduzido por Argov-Argaman et al. (2013), frações de sêmen foram analisadas em duas estações do ano (verão e inverno), e variações em parâmetros fisiológicos e estruturais foram encontradas, embora o volume e a densidade por ejaculação não tenham mostrado diferenças entre os períodos. Amostras analisadas no inverno apresentaram maior motilidade, motilidade progressiva e velocidade, enquanto no verão observaram-se defeitos de cauda caracterizados por altas concentrações de ácidos graxos saturados, baixas concentrações de PUFA e colesterol. Essa composição lipídica pode ser utilizada como um indicador de qualidade seminal, uma vez que alterações induzidas pelo estresse ambiental na composição lipídica de um compartimento específico podem comprometer a estrutura e, conseqüentemente, a função dos espermatozoides.

Um ponto importante a ser destacado é a fluidez da membrana plasmática, que é a capacidade das moléculas se moverem. Stubbs e Smith (1984) demonstraram que os PUFA desempenham um papel crucial no aumento da fluidez da membrana dos espermatozoides, mas em níveis elevados aumentam a sensibilidade à peroxidação lipídica. É importante observar que os efeitos dos ácidos graxos sobre a qualidade seminal podem variar de acordo com a fonte e o tipo de ácido graxo, bem como com o diluente utilizado. PUFA das famílias ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6) são essenciais para a atividade reprodutiva, representando cerca de 30 a 50% da quantidade total de ácidos graxos na membrana dos espermatozoides de mamíferos. Eles contribuem para a regulação da fluidez e da responsividade acrossomal, e o aumento da fluidez reflete a capacidade da membrana de desempenhar suas funções, como facilitar o transporte de moléculas e receber sinais das células. Com base nessas informações, pesquisas têm se concentrado em melhorar a qualidade seminal por meio do fornecimento de PUFA nas dietas animais e em diluentes seminais, a fim de reduzir danos às células espermáticas (Kiernan et al. 2013) e melhorar a composição lipídica e a qualidade do sêmen congelado (Towhidi and Parks 2012; Abavisani et al. 2013).

Em um estudo com touros que receberam dietas suplementadas com óleo de peixe, fonte de PUFA (n-3), os animais apresentaram aumento no volume do sêmen e na concentração espermática em comparação aos que receberam uma dieta sem óleo de peixe. Além disso, observou-se aumento na viabilidade, na motilidade progressiva e no perfil lipídico, sugerindo uma melhora na qualidade in vitro do sêmen fresco e descongelado devido ao aumento na proporção de PUFA nas dietas (Khoshvaght et al. 2016). Em contrapartida, o estudo de Rossi et al. (2019) não encontrou diferenças significativas na concentração espermática, nos defeitos, na qualidade e na fertilidade do sêmen fresco entre touros suplementados ou não com gorduras poli-insaturadas a longo prazo. No entanto, foi observada melhora na qualidade do sêmen descongelado nos parâmetros de velocidade média do trajeto pós-descongelamento, termorresistência e velocidade retilínea. Finalmente, Gholami et al. (2010) verificaram melhora na cinética espermática do sêmen fresco de touros suplementados com óleo de peixe por 90 dias, mas não observaram melhora nesse parâmetro no sêmen descongelado.

Resultados superiores foram encontrados na qualidade do sêmen fresco e descongelado de touros que receberam suplementação com óleo de linhaça em comparação ao óleo de peixe, provavelmente devido às diferentes fontes de n-3 (Moallem et al. 2015). No entanto, é importante considerar alguns fatores antes de avaliar nutrientes específicos na qualidade espermática, como o nível de incorporação desses nutrientes nos espermatozoides e o tempo adequado para o ciclo da espermatogênese, de forma que a suplementação tenha efeito considerável em todas as etapas do desenvolvimento espermático (Byrne et al. 2017).

O estudo de Bastos et al. (2021) avaliou os efeitos da suplementação prolongada com PUFA e da adição de antioxidante em diluente seminal sobre a qualidade do sêmen de touros Nelore. Os resultados indicaram que a suplementação não melhorou a qualidade do sêmen e que a capacidade de fertilização in vitro não foi afetada. Curiosamente, os pesquisadores também identificaram que a dieta paterna afetou o conteúdo lipídico intracitoplasmático dos embriões, sugerindo uma possível implicação dos efeitos paternos sobre o estado metabólico do embrião. Esse resultado é importante porque destaca a relevância de se considerar os efeitos paternos na reprodução animal e pode ter implicações no programa metabólico dos embriões. No entanto, mais estudos são necessários para compreender melhor os mecanismos envolvidos na relação entre a dieta paterna e o estado metabólico do embrião.

De modo geral, os estudos sugerem que a maioria dos PUFA encontrados no tecido reprodutivo é proveniente de grãos da dieta, principalmente dos ácidos linoleico e linolênico. A dieta também pode alterar a composição lipídica do sêmen e, consequentemente, afetar a qualidade espermática. Byrne et al. (2017) investigaram o efeito da suplementação de n-3 e n-

6 PUFA sobre o sêmen de touros e observaram uma mudança na composição lipídica, mas sem diferença na qualidade do sêmen fresco ou descongelado. Khoshniat et al. (2020) verificaram que a suplementação com ácidos graxos n-3 provenientes do óleo de linhaça aumentou significativamente a motilidade, a integridade de membrana e os parâmetros de atividade, além de reduzir as anormalidades no sêmen descongelado, mas não teve efeito sobre a qualidade do sêmen fresco em touros Holandeses.

6.4 Efeitos das prostaglandinas na qualidade espermática

As prostaglandinas são ácidos graxos de 20 carbonos sintetizados na maioria dos tecidos de mamíferos. Embora a concentração de prostaglandinas no sêmen bovino seja geralmente baixa em comparação a outras espécies, mesmo pequenas quantidades podem ser absorvidas pelo trato genital feminino, resultando em contrações das paredes e facilitando o transporte dos espermatozoides. A biossíntese de prostaglandinas relacionadas à reprodução ocorre a partir do ácido araquidônico, que é produzido pela quebra de fosfolipídios de membrana na célula produtora pela enzima fosfolipase A2. Como resultado, o ácido araquidônico de 20 carbonos é liberado para atuar como precursor de eicosanoides, que podem ser transformados em prostaglandinas por três vias metabólicas: ciclooxigenase, lipooxigenase ou epoxigenase.

As prostaglandinas são derivadas de ácidos graxos essenciais presentes na dieta de bovinos, como o ácido linoleico e o ácido araquidônico. Estudos mostram que a suplementação com gorduras poli-insaturadas pode aumentar a concentração desses ácidos graxos na membrana celular dos espermatozoides, estimulando a atividade da enzima ciclooxigenase (COX) e a produção de prostaglandinas, principalmente prostaglandina E2 (PGE2) e prostaglandina F2 α (PGF2 α). Essas prostaglandinas desempenham um papel importante na regulação da motilidade espermática, na capacitação e na fertilização, além de modularem a resposta imune no trato reprodutivo feminino. A presença de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática ou no plasma seminal, principalmente da família n-3, influencia o metabolismo das células espermáticas. Outras famílias de ácidos graxos, n-6 e n-9, participam da síntese de prostaglandinas (PGE1, PGE1 α , PGE2 e PGE2 α) e de seus precursores ácido araquidônico e ácido dihomo-gama-linolênico. Além disso, estudos anteriores mostraram que a suplementação com ácidos graxos pode melhorar a qualidade do sêmen em bovinos, como concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides.

O estudo de Shalev et al. (1994) apontou a presença da enzima ciclooxigenase na cabeça e na peça intermediária dos espermatozoides bovinos, sugerindo o envolvimento das prostaglandinas no processo de maturação dos gametas e seu potencial impacto na capacidade

de fertilização. Em um estudo subsequente, Baptista et al. (2001) investigaram a influência da inibição da síntese de prostaglandinas durante a fase inicial da capacitação espermática, utilizando indometacina suplementada in vitro ao sêmen bovino. Os resultados indicaram que a ausência de prostaglandinas compromete o processo de fertilização, o desenvolvimento embrionário e a qualidade. Além disso, um estudo recente conduzido por Jalmeria et al. (2018) mostrou que a prostaglandina E tem efeito positivo sobre a morfologia espermática, sendo benéfica para a fertilidade do sêmen quando presente em níveis elevados.

O estudo de Abdussamad et al. (2016) teve como objetivo avaliar o impacto de diferentes diluentes seminais e da inclusão de prostaglandina F2 α sobre as taxas de prenhez em vacas. Os resultados indicaram que formulações específicas de diluentes, quando combinadas com prostaglandina F2 α , levaram a melhorias notáveis nos índices de prenhez (Abdussamad et al. 2016). No entanto, a administração de F2 α por injeção intramuscular no momento da inseminação ou por infusão intrauterina mostrou-se ineficaz (Gabriel et al. 2011). É importante destacar que a ação das prostaglandinas na reprodução de touros, especialmente em relação ao aumento da taxa de fertilização e, conseqüentemente, da taxa de prenhez, ainda é pouco estudada e compreendida.

6.5 Efeito do ácido linoleico conjugado (cla) na qualidade espermática

O CLA é um grupo de ácidos graxos com 18 átomos de carbono que são isômeros posicionais e geométricos, com duplas ligações conjugadas (Funck et al. 2006). Apenas duas combinações têm bioatividade comprovada, cis-9, trans-11 CLA e trans-10, cis-12 CLA (Freitas et al. 2020). Trata-se de um ácido graxo que atualmente vem sendo estudado por seus efeitos benéficos à saúde humana e é encontrado em alimentos de origem animal (Gouvêa et al. 2012). Ele se origina de duas formas: durante a biohidrogenação ruminal do ácido linoleico ou pela síntese de gordura animal. A presença de CLA em produtos derivados de ruminantes, como carne e leite, está relacionada à biohidrogenação incompleta de ácidos graxos insaturados presentes na dieta (Pereira et al. 2011). Durante esse processo, as bactérias presentes no rúmen desses animais convertem o ácido linoleico em CLA. Os níveis de CLA são variados e dependem da dieta dos animais e do processo de produção. Por exemplo, a concentração de CLA cis-9 trans-11 C18:2 aumentou em 230% (0,46 vs 1,06 g/100 g) com a suplementação de óleo de soja na dieta de vacas leiteiras (Eifert et al. 2006).

A suplementação dietética com uma ampla variedade de PUFA também pode alterar o perfil lipídico do sêmen e, conseqüentemente, alguns de seus parâmetros. O CLA, por sua vez, pode ser incorporado aos fosfolipídios da membrana e influenciar seus efeitos biológicos.

Karimi et al. (2017) avaliaram o uso potencial do CLA na qualidade seminal e destacaram a importância da composição lipídica da membrana espermática para as mudanças fisiológicas que levam à fertilização. Eles observaram que a suplementação de CLA na dieta de touros Holandeses aumentou a proporção de espermatozoides com anormalidades no sêmen fresco com suplementação de CLA, bem como aumentou a proporção de espermatozoides pós-descongelamento com morfologia anormal na décima semana do ensaio em comparação ao grupo controle, mas não teve efeitos sobre o volume, a concentração e a produção total de sêmen. Soares et al. (2013) verificaram que o uso de isômeros de CLA em diferentes concentrações no diluente de espermatozoides bovinos não causou alterações na viabilidade e na motilidade, mas afetou negativamente a função mitocondrial. Em contrapartida, efeitos benéficos na qualidade seminal com a suplementação de CLA e sua inclusão no diluente seminal foram relatados. Esses efeitos incluem aumento da concentração do ejaculado e maior percentual de espermatozoides vivos após o descongelamento, sugerindo um potencial do CLA em mitigar os efeitos negativos do estresse térmico (Liman et al. 2021).

Diante dos limitados estudos sobre o impacto do CLA na qualidade seminal, a suplementação desse composto na dieta ou no diluente seminal de bovinos não demonstrou vantagens significativas no sêmen fresco ou descongelado. Portanto, os dados disponíveis sobre os parâmetros seminais com o uso de CLA são inconclusivos até o momento, o que reforça a necessidade de pesquisas adicionais para esclarecer seus reais efeitos. Medidas mais precisas podem ser obtidas com estudos conduzidos durante as estações quente e fria, aumento do período de suplementação para dois ou mais ciclos espermatogênicos e extensão do tempo de amostragem para identificar com precisão em qual estágio da espermatogênese o CLA exerce sua função. Além disso, Liman et al. (2021) enfatizam que investigações mais detalhadas em nível molecular são necessárias para avaliar o efeito do CLA sobre o estado de capacitação espermática, a integridade do DNA e a capacidade de fertilização. Essas medidas são cruciais para estabelecer conclusões consistentes sobre o efeito do CLA na reprodução de touros.

6.6 Efeitos de diferentes fontes de ácidos graxos poli-insaturados na qualidade espermática em bovinos: dados e resultados

Com o objetivo de fornecer uma visão abrangente sobre as fontes de PUFA e sua relação com a melhoria da qualidade espermática, resumimos na Tabela 1 o efeito da ingestão de PUFA na dieta, juntamente com seus respectivos resultados que foram apresentados nesta revisão.

Tabela 1. Principais ácidos graxos poli-insaturados utilizados na qualidade espermática em bovinos

Fonte	Componente	Referência	Resultados
Óleo de peixe	Ômega-3	Khoshvaght et al. (2016)	Aumento do volume e concentração espermática, viabilidade e motilidade. (Sêmen fresco e descongelado)
Óleo de soja (gordura protegida no rúmen)	Ácido linoleico (ômega-6)	Rossi et al. (2019)	Não encontrou diferença nos parâmetros de qualidade espermática, mas os autores observaram maior velocidade e termorresistência dos espermatozoides em sêmen fresco
Óleo de peixe	Ômega-3	Gholami et al. (2010)	Melhor cinética no sêmen fresco e nenhuma melhora no sêmen descongelado
Óleo de linhaça	Ômega-3	Moallem et al. (2015)	Melhores resultados nos parâmetros qualitativos no sêmen fresco e descongelado em comparação ao óleo de peixe
Ácido graxo poli-insaturado protegido no rúmen	Ácido linoleico (ômega-6) e ácido linolênico (ômega-3)	Bastos et al. (2021)	Reduziu a qualidade do sêmen, mas sem afetar a capacidade de fertilização
Óleo de peixe	Ômega-3 e ômega-6	Byrne et al. (2017)	Houve alteração na composição lipídica do sêmen. Mas não houve melhora significativa na qualidade dos parâmetros de sêmen fresco e descongelado
Óleo de linhaça	Ômega-3	Khoshniat et al. (2020)	Aumento da motilidade, atividade de membrana e menos anormalidades no sêmen descongelado
CLA dietético	CLA	Karimi et al. (2017)	Menor quantidade de espermatozoides anormais no sêmen fresco e descongelado, mas sem diferença no volume, concentração e produção total de sêmen
Isômeros de CLA	CLA	Soares et al. (2013)	Sem diferença na motilidade e viabilidade, mas houve disfunção mitocondrial quando usado no diluente
CLA dietético	CLA	Liman et al. (2021)	Maior concentração no ejaculado e maior sobrevivência dos espermatozoides após o descongelamento

6.7 Efeitos dos fosfolipídios e do colesterol na qualidade espermática

Os fosfolipídios são moléculas complexas compostas por uma cabeça hidrofílica e duas cadeias de ácidos graxos hidrofóbicas. Essas cadeias são predominantemente poli-insaturadas,

o que torna os fosfolipídios altamente suscetíveis a mudanças nas condições de temperatura. Quando expostos à diminuição da temperatura, os fosfolipídios podem se organizar em uma estrutura conhecida como micela invertida ou hexagonal II. Nessa condição, as extremidades hidrofóbicas ficam voltadas para fora e as hidrofílicas para dentro, o que aumenta a permeabilidade da membrana e permite a entrada de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana e causar danos irreparáveis (Khosrowbeygi e Zarghami 2007). Nos espermatozoides de mamíferos, a membrana plasmática é composta, em média, por 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (Flesh e Gadella 2000). Segundo Borges et al. (2011), os fosfolipídios são a principal fonte de substrato para a respiração endógena nos espermatozoides, o que sugere que a organização desses lipídios na membrana é crucial para a função celular adequada.

Estudos têm demonstrado que a integridade da membrana é fundamental para a capacitação espermática e o processo de fertilização (Gadella e Harrison 2002). Por exemplo, a exposição dos espermatozoides a condições de estresse, como altas temperaturas, pode levar a uma alteração na organização dos fosfolipídios da membrana, o que compromete sua função e pode levar à redução da qualidade seminal (Pinho et al. 2016). Portanto, compreender a estrutura e a função dos fosfolipídios na membrana espermática é essencial para melhorar o entendimento dos processos que regulam a fertilidade masculina. Além disso, a nutrição também pode afetar a concentração de colesterol e fosfolipídios no touro, o que pode impactar a qualidade seminal. Por exemplo, foi encontrado um aumento nas taxas de sobrevivência à criopreservação em bovinos pela adição de diferentes concentrações de colesterol durante o processo de criopreservação (Purdy e Graham 2004). Outro estudo mostrou que uma dieta rica em ácidos graxos n-3 aumentou a concentração de fosfolipídios na membrana espermática em touros, o que melhorou a qualidade seminal (Adewumi et al. 2019). Por outro lado, uma dieta rica em gordura saturada pode induzir a um aumento na concentração de colesterol na membrana espermática, o que pode prejudicar a função espermática (Brouwer et al. 2015).

Outro ponto é o nível de fluidez da membrana, que depende da temperatura e da proporção entre ácidos graxos saturados (colesterol) e insaturados (fosfolipídios) (Lehninger et al. 2005). A perda de colesterol da membrana plasmática de células criopreservadas pode causar capacitação prematura, reduzindo a viabilidade dos espermatozoides criopreservados no trato reprodutivo feminino (Mocé et al. 2010). No entanto, é importante observar que o colesterol pode ser facilmente incorporado ou extraído das membranas plasmáticas das células usando ciclodextrinas (Moore et al. 2005). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos compostos por seis (α -ciclodextrina), sete (β -ciclodextrina) ou oito (γ -ciclodextrina) unidades de

glicopirranose ligadas por ligações α -(1,4), cujas moléculas se caracterizam por possuírem uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade interna lipofílica (Banchero et al. 2013).

A composição de fosfolipídios presente na membrana plasmática dos espermatozoides pode influenciar a sensibilidade ao choque térmico durante a criopreservação. De acordo com Parks e Lynchy (1992), uma maior proporção de fosfatidilcolina em relação à fosfatidiletanolamina pode conferir maior resistência. Além disso, a atividade espermática e sua capacidade de motilidade são altamente dependentes da disponibilidade de energia. Embora a frutose seja a principal fonte de energia para essa atividade (Scott e Dawson 1968), em situações de ausência de carboidratos solúveis oxidáveis, os fosfolipídios podem ser utilizados como fonte de energia pelos espermatozoides. Isso porque a fosfatidilcolina, o principal fosfolipídio presente na membrana espermática, pode ser oxidada para produzir energia em condições anaeróbicas (Hartree e Mann 1961). Segundo Lardy e Phillips (1941), na ausência de carboidratos, os espermatozoides bovinos obtêm energia a partir da oxidação de fosfolipídios intracelulares, o que explica a redução no conteúdo de fosfolipídios após a incubação aeróbica (Dolatpanah et al. 2008).

A viabilidade e a motilidade espermática são fatores críticos para o sucesso da fertilização. Esses processos dependem da integridade da bainha mitocondrial, cujos fosfolipídios são os principais componentes. No entanto, a oxidação dos ácidos graxos nesses fosfolipídios por radicais livres de oxigênio pode danificar os espermatozoides e afetar sua motilidade (Borges et al. 2011). O colesterol, um importante esteroide presente nas membranas espermáticas, também desempenha um papel essencial na regulação da função espermática (Scott 2000). Embora o sêmen fresco apresente uma alta razão colesterol/fosfolipídios, durante a capacitação espermática, o colesterol migra da membrana para solubilizar proteínas e receptores, enquanto os fosfolipídios se deslocam para dentro da membrana espermática (Cross 1998). Isso resulta em uma diminuição da razão colesterol/fosfolipídios, reduzindo a viscosidade da membrana e expondo os fosfolipídios, o que estimula a reação acrossômica.

A perda de colesterol começa logo após a separação dos espermatozoides do plasma seminal, influenciada pela ação de moléculas lipofílicas presentes no meio, como albumina e lipoproteínas. A saída de colesterol promove um aumento no pH intracelular, possibilitando a capacitação e, conseqüentemente, a reação acrossômica (Borges et al. 2011). Portanto, é importante manter um equilíbrio adequado entre colesterol e fosfolipídios para garantir a função espermática normal e a fertilização bem-sucedida. Em resumo, a capacitação espermática é um processo fisiológico crucial para a fertilização, tornando o espermatozoide capaz de realizar a reação acrossômica (Gadella et al. 2008).

Assim, a presença de colesterol no plasma seminal de touros é um parâmetro útil na avaliação da qualidade seminal (Beer-Ljubic' et al. 2009). Uma possível estratégia para melhorar a qualidade de doses baixas de sêmen bovino durante a criopreservação é o uso de ciclodextrina pré-carregada com colesterol, como mencionado anteriormente (Lone 2018).

O colesterol é um esterol fundamental para as membranas celulares animais (Christie 1989) e possui um papel essencial na biossíntese de testosterona pelas células de Leydig nos tecidos intersticiais do testículo. Nos animais machos, isso regula atividades reprodutivas como a espermatogênese, características sexuais secundárias e efeitos comportamentais e metabólicos (Tran et al. 2017). Estudos recentes de Johnson et al. (2019) demonstraram que a melhoria na nutrição tem efeitos positivos na expressão de genes da biossíntese de colesterol e na maturação das células de Sertoli em testículos de touros bovinos. Esses resultados enfatizam a importância de uma nutrição adequada na regulação dos processos reprodutivos.

Para alcançar uma fertilidade satisfatória em animais, é crucial considerar a estrutura e a composição do sêmen, bem como os métodos usados para melhorar sua qualidade, como fornecer ou enriquecer lipídios na dieta ou no diluente. No entanto, quando se trata de estimar a fertilidade *in vivo*, um dos maiores desafios é a baixa correlação observada com a fertilidade *in vitro* em vários parâmetros de qualidade seminal. Apesar dos avanços significativos na avaliação da qualidade seminal, a previsão da fertilidade espermática em campo por meio de parâmetros de qualidade *in vitro* ainda apresenta desafios consideráveis, como relatado por Zhang et al. (1999) e confirmado por Sellem et al. (2015). Embora tenham sido encontradas relações significativas entre motilidade e fertilidade (Sellem et al. 2015), estas foram baixas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alimentação de touros com diferentes tipos de ácidos graxos pode influenciar positivamente parâmetros de qualidade seminal, como motilidade, viabilidade, concentração e termorresistência. No entanto, os resultados variam de acordo com o tipo de ácido graxo utilizado, a forma de administração e sua qualidade.

8. REFERÊNCIAS

- Abavisani, A., Arshami, J., Naserian, A.A., Kandelousi, M.A.S., Azizzadeh, M., 2013. Quality of bovine chilled or frozen-thawed semen after addition of omega-3 fatty acids supplementation to extender. *Int J Fertil Steril*, 7, 161-168.
- Adewumi, K., Oketch, S.Y., Choi, Y., Huchko, M.J., 2019. Female perspectives on male involvement in a human-papillomavirus-based cervical cancer-screening program in western Kenya. *BMC Women's Health*, 19, 107.
- Andriguetto, J.M., Perly, L., Minardi, I., Gemael, A., Flemming, J.S., Souza, G.A., Bona Filho, A., 2002. Os alimentos e os princípios nutritivos. In: *Nutrição Animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal – os alimentos*. São Paulo: Nobel, 1, 395.
- Argov-Argaman, N., Mahgrefthe, K., Zeron, Y., Roth, Z., 2013. Season-induced variation in lipid composition is associated with semen quality in Holstein bulls. *Reproduction*, 145, 479–489.
- Banchero, M., Ronchetti, S., Manna, L., 2013. Characterization of Ketoprofen/Methyl- β Cyclodextrin complexes prepared using supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemistry*, 2013, 1-8.
- Baptista, M.C., Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Horta, A.E.M. Papel das prostaglandinas na fase inicial da capacitação espermática em bovinos. In: *Proceedings do III Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, 381-386, 2001. <https://docplayer.com.br/80094884-Papel-das-prostaglandinas-na-fase-inicial-da-capacitacao-espermatoca-em-bovinos.html>. Acessado em 02 de fevereiro de 2023.
- Bastos, N.M., Rossi, G.F., Leão, B.C.S., Negrão, F., Ferreira, C.R., Vrisman, D.P., Rodrigues, N.N., Zorzetto, M.F., Freitas-Dell'Aqua, C.P., Vantini, R., Monteiro, F.M., Mercadante, M.E.Z., Eberlin, M.N., Lima, V.F.M.H., Mingoti, G.Z., 2021. Effects of paternal diet and antioxidant addition to the sêmen extender on bovine semen characteristics and on the phenotype of the resulting embryo. *Theriogenology*, 175, 23-33.
- Beer-Ljubic', B., Aladrovic', J., Marenjak, T.S., Las'kaj, R., Majic'-Balic', I., Milinkovic'-Tur, S., 2009. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. *Theriogenology*, 72, 1132-1140.
- Borges, J.C., Silva, M.R., Guimarães, J.D., Esper, C.R., Franceschini, P.H., 2011. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 35(3), 303-314.
- Botham, K.M., Mayes, P.A. Lípidios de Importância Fisiológica. In: Murray, Robert K., Bender, David A., Botham, Kathleen M., Kennelly, Peter J., Rodwell, Victor W., Weil, P. Anthony (dir.), 2012. *Harper Bioquímica Ilustrada*. 29 ed McGraw-Hill Interamericana Editores S.A., 140-151.
- Brouwer, C.L., Steenbakkers, R.J.H.M., Bourhis, J., Budach, W., Grau, C., Grégoire, V., Herk, M.V., Lee, A., Maingon, P., Nutting, C., O'Sullivan, B., Porceddu, S.V., Rosenthal, D.E., Sijtsema, N.M., Langendijk, J.A., 2015. CT-based delineation of organs at risk in the head and

neck region: DAHANCA, EORTC, GORTEC, HKNPCSG, NCIC CTG, NCRI, NRG Oncology and TROG consensus guidelines. *Radiother Oncol*, 117(1), 83-90.

Büyükleblebici, S., Taşdemir, U., Tuncer, P.B., Durmaz, E., Özgürtaş, T., Büyükleblebici, O., Coşkun, E., Gürcan, I.S., 2014. Can linoleic acid improve the quality of frozen thawed bull sperm?. *CryoLetters*, 35(6), 473-481.

Byrne, C.J., Fair, S., English, A.M., Holden, S.A., Dick, J.R., Lonergan, P., Kenny, D.A., 2017. Dietary polyunsaturated fatty acid supplementation of young post-pubertal dairy bulls alters the fatty acid composition of seminal plasma and spermatozoa but has no effect on semen volume or sperm quality. *Theriogenology*, 90, 289-300.

Caetano, G.A.O., Fonseca, A.A., Figueiredo, C.B., 2020. Teor e composição de lipídeos como ferramenta de gestão na nutrição de bovinos. *Research, Society and Development*, 9(7), e334974037.

Champe, P.C., Harvey, R.A., 1997. *Bioquímica Ilustrada*. 2 ed. Artes Médicas, Porto Alegre.
Christie, W.W.W., 1989. *Gas chromatography; a practical guide*. 1 ed, Ayr, Scotland: The Oily Press.

Cross, N.L., 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod*, 59, 7-11.
Dolatpanah, M.B., Towhidi, A., Farshad, A., Rashidi, A., Rezayazdi, A., 2008. Effects of dietary fish oil on semen quality of goats. *Asian-Australas J Anim Sci*, 21, 29-34.

Eifert, E.C., Lana, R.P., Lanna, D.P.D., Teixeira, R.M.A., Arcuri, P.B., Leão, M.I., Oliveira, M.V.M., Valadares Filho, S.C., 2006. Perfil de ácidos graxos e conteúdo de ácido linoléico conjugado no leite de vacas alimentadas com a combinação de óleo de soja e fontes de carboidratos na dieta. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(4), 1829-1837.

Flesh, F.M., Gadella, B.M., 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys*, 1469, 197-235.

Freitas, D.S., Lopes, G.A.G., Nascimento, B.R., Pereira, L.A.A.C., Batista, R.I.T.P., Campos Junior, P.H.A., 2020. Ácido linoleico conjugado como potencial bioativo para modulação e criotolerância de gametas e embriões. *Ciência Animal Brasileira*, 21, e-63574.

Funck, L.G., Arellano, D.B., Block, J.M., 2006. Ácido linoléico conjugado (CLA) e sua relação com a doença cardiovascular e os fatores de risco associados. *Archivos Latino americanos de Nutrition*, 56(2), 123-134.

Gabriel, H.G., Wallenhorst, S., Dietrich, E., Holtz, W., 2011. The effect of prostaglandin F2 α administration at the time of insemination on the pregnancy rate of dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 123, 1-4.

Gadella, B.M., Harrison, R.A.P., 2002. Capacitation Induces Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate-Dependent, but Apoptosis-Unrelated, Exposure of Aminophospholipids at the Apical Head Plasma Membrane of Boar Sperm Cells. *Biology of Reproduction*, 67, 340-350.

Gadella, B.M., Tsai, P.S., Bourke, A., Brewis, I.A., 2008. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol*, 52, 473.

Gholami, H., Chamani, M., Towhidi, A., Fazeli, M.H., 2010. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozenthawed semen in Holstein bulls. *Theriogenology*, 74(9), 1548-1558.

Gottschall, C.S., Bittencourt, R.H., Mattos, R.C., Gregory, R.M., 2009. Antecipação da aplicação de prostaglandina, em programa de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 10.

Gouvêa, M.M., Franco, C.F.J., Marques, F.F.C., Pereira Netto, A.D., 2012. Ácidos Linoleicos Conjugados (ALC) – Os Benefícios que Exercem sobre a Saúde Humana e as Principais Metodologias Analíticas Aplicadas para a sua Determinação em Leites. *Revista Virtual de Química*. 4(6), 653-669.

Harfoot, C.G., Hazlewood, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson PN, Stewart CS. (Ed.), 1997. *The rumen microbial ecosystem*. 2.ed. London: Chapman & Hall, 382-426.

Hartree, E.F., Mann, T., 1961. Phospholipids in ram semen: metabolism of plasmalogen and fatty acids. *Biochemical Journal*, 80, 464-476.

Jalmeria, N.S., Panth, S., Pandita, S., Roy, A.K., Ashutosh, M., Mohanty, T.K., Bhakat, M., Punetha, M., Gupta, D., 2018. Seasonal variations in hormones and enzymes of seminal plasma and its relationship with sêmen quality in crossbred cattle bulls. *Biological Rhythm Research*, 51(4), 633-643.

Jenkins, T.C., Wallace, R.J., Moate, P.J., Mosley, E.E., 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of animal science*, 86(2), 397-412.

Johnson, C., Dance, A., Kovalchuk, I., Kastelic, J., Thundathil, J., 2019. Enhanced early-life nutrition upregulates cholesterol biosynthetic gene expression and Sertoli cell maturation in testes of pre-pubertal Holstein bulls. *Scientific Reports*, 9(6448), 1-10.

Karimi, R., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Rezayazdi, K., Mousavi, M., Safari, H., Martinez-Pastor, F., 2017. Effects of supplemental conjugated linoleic acids (CLA) on fresh and post-thaw sperm quality of Holstein bulls. *Reprod Dom Anim.*, 52(3), 1-9.

Khoshniat, M.T., Towhidi, A., Rezayazdi, K., Zhandi, M., Rostami, F., Davachi, N.D., Khalooee, F., Kastelic, J., 2020. Dietary omega-3 fatty acids from linseed oil improve quality of post-thaw but not fresh sperm in Holstein bulls. *Cryobiology*, 93, 102-108.

Khoshvaght, A., Towhidi, A., Zare-shahneh, A., Noroozi, M., Zhandi, M., Davachi, N.D., Karimi, R., 2016. Dietary n-3 PUFAs improve fresh and post-thaw sêmen quality in Holstein bulls via alteration of sperm fatty acid composition. *Theriogenology*, 85, 807-812.

Khosrowbeygi, A., Zarghami, N., 2007. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77(2), 117-121.

Kiernan, M., Fahey, A.G., Fair, S., 2013. The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 947-954.

- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., du Plessis, S.S., 2010. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian journal of experimental biology*, 48, 425-435.
- Kozloski, G.V., 2017. *Bioquímica dos ruminantes*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 3. ed, 290.
- Lana, R.P., 2005. *Nutrição e Alimentação Animal – Mitos e Realidades*. Viçosa: Editora Suprema Gráfica e Editora Ltda.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier.
- Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., Dondero, F., 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*, Cambridge, 2(3), 246-256.
- Lone, S.A., 2018. Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action on sperm during cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 192, 1-5.
- Lone, A.S., Mohanty, T.K., Bhakat, M., Yadav, H.P., Paray, A.R., Dewry, R.K., Baithalu, R.K., Sinha, R., Kumar, P., 2021. Cholesterol-loaded cyclodextrin attenuates dilution effect and improves quality of bovine low sperm insemination doses during cryopreservation. *Andrologia*, 53(14202).
- Lardy, H.A., Phillips, P.H., 1941. The interrelation of oxidative and glycolytic processes as sources of energy for bull spermatozoa. *American Journal of Physiology*, 133(3), 602-609.
- Liman, M.S., Franco, V., Cardoso, C.L., Longobardi, V., Gasparrini, B., Wheeler, M., Rubessa, M., Esposito, G., 2021. Effects of Dietary Supplementation of Conjugated Linoleic Acids and Their Inclusion in Semen Extenders on Bovine Sperm Quality. *Animals*, 11(483), 1-18.
- Mattos, R., Staples, C.R., Thatcher, W.W., 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Reviews of Reproduction*, 5, 38-45.
- Medeiros, S.R., Albertini, T.Z., Marino, C.T. Lipídios na nutrição de ruminantes. In: Medeiros SR, Gomes RC, Bungenstab DJ (Ed.), 2015. *Nutrição de bovinos de corte: fundamentos e aplicações*. Brasília, DF: Embrapa, 14.
- Moallem, U., Neta, N., Zeron, Y., Zachut, M., Roth, Z., 2015. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 83, 1110-1120.
- Moce, E., Blanch, E., Tomás, C., Graham, J.K., 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reproduction in Domestic Animals* 45 (Suppl. 2), 57-66.
- Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K., 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51, 241-249.

Motta, V.T., 2009. *Bioquímica Clínica para laboratório: Princípios e Interpretações*. 5ªed. Porto Alegre: Editora Medbook, Caxias do Sul.

Palmquist, D.L., Mattos, W.R.S. Metabolismo de lipídeos. In: Berchielli, T.T.; Pires, A.V.; de Oliveira, S. G., 2006. *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 287-310.

Parks, J.E., Lynchy, D.V., 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boas, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29, 255-266.

Pereira, E.S., Pimentel, P.G., Bomfim, M.A.D., Carneiro, M.S.S., Cândido, M.J.D., 2011. Torta de girassol em rações de vacas em lactação: produção microbiana, produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite. *Acta scientia-rum Animal science*, Maringá, 33(4), 287-394.

Pinho, R.O., Lima, D.M., Shiomi, H.H., Siqueira, J.B., Silveira, C.O., Faria, V.R., Lopes, P.S., Guimarães, S.E.G.J., 2016. Effect of cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates on plasma membrane viability of Piau swine breed frozen/thawed spermatozoa. *Cryobiology*, 73(1), 1-6.

Purdy, P.H., Graham, J.K., 2004. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biology of Reproduction*, 71(2), 522-527.

Rossi, G.F., Dias, E.A.R., Bastos, N.M., Vrisman, D.P., Rodrigues, N.N., Vantini, R., Garcia, J.M., Simili, F.F., Ribeiro, E.G., Canesin, R.C., Mercadante, M.E.Z., Freitas-Dell'Aqua, C.P., Monteiro, F.M., Mingoti, G.Z., 2019. Sexual maturity and fertility-related measures in Young Nellore bulls receiving long-term dietary supplementation with rumen-protected polyunsaturated fatty acids. *Theriogenology*, 139, 16-27.

Salman, A.K.D., Ferreira, A.C.D., Soares, J.P.G., Souza, J.P. Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos, 2010. In: Documentos 136, Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/884369/1/doc136alimentacaoderuminantes.pdf>. Acessado em 15 de dezembro de 2022.

Santos, J.E., Bilby, T.R., Thatcher, W.W., Staples, C.R., Silvestre, F.T., 2008. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. *Reproduction Domestic Animals*, 43, 23-30.

Scott, T.W., Dawson, R.M., 1968. Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. *Biochemical Journal*, 108, 457-475.

Scott, M.A., 2000. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal Reproduction Science*, 60, 337-348.

Sellem, E., Broekhuijse, M.L.W.J., Chevrier, L., Camugli, S., Schmitt, E., Schibler, L., Koenen, E.P.C., 2015. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*, 84, 1447-1454.

Shalev, Y., Shemesh, M., Levinshal, T., Marcus, S., Breibart, H., 1994. Localization of cyclooxygenase and production of prostaglandins in bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 405-413.

Stubbs, C.D., Smith, A.D., 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 779, 89-137.

Soares, M.P., Brandelli, A., Celeghini, E.C.C., Arruda, R.P., Rodriguez, S.A.F., 2013. Effect of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers of conjugated linoleic acid on the integrity and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa. *Cryobiology*, 67, 102-105.

Squires, E.J., 2010. *Applied animal endocrinology*. Cabi.

Staples, C.R., Thatcher, W.W., BURKE, J.M., 1997. Influences of dietary energy, fat, and protein on reproductive performance of lactating dairy cows. In *Proc. IX Int. Conf. On Prod. Dis. Farm Anim.* Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany, 204-221.

Silvestre, F.T., Carvalho, T.S.M., Francisco, N., Santos, J.E.P., Staples, C.R., Jenkins, T.C., Thatcher, W.W., 2011. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: I. Uterine and metabolic responses, reproduction, and lactation. *Journal of Dairy Science*, 94, 189-204.

Taha, A.Y., Blanchard, H.C., Cheon, Y., Ramadan, E., Chen, M., Chang, L., Rapoport, S.I., 2017. Dietary Linoleic Acid Lowering Reduces Lipopolysaccharide-Induced Increase in Brain Arachidonic Acid Metabolism. *Molecular Neurobiology*, 54, 4303-4315.

Takahashi, T., Itoh, R., Nishinomiya, H., Katoh, M., Manabe, N., 2012. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability, *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 92-97.

Towhidi, A., Parks, J.E., 2012. Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29, 1051-1056.

Tran, L.V., Malla, B.A., Kumar, S., Tyagi, A.K., 2017. Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction - A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(5), 622-637.

Wathes, D.C., Abayasekara, D.R.E., Aitken, R.J., 2007. Polyunsaturated fatty acids in males and female reproduction. *Biology of Reproduction*, 77(2), 190-201.

CAPÍTULO III - SÊMEN BOVINO DESCONGELADO E REFRIGERADO MANTÉM A FERTILIDADE: UMA ESTRATÉGIA PRÁTICA PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO PARA REGIÕES REMOTAS

Os resultados deste capítulo foram aceitos para publicação na forma de artigo científico sob o seguinte referencial:

BELTRÃO, Nelma Pinheiro Fragata; AZEVEDO, Leana Livramento de; SOUZA, Terezinha Teixeira de; FERRAZ JUNIOR, Marcos Vinicius de Castro. Thawed-refrigerated bovine semen maintains fertility: a practical strategy for fixed-time artificial insemination in remote regions. Submetido à *Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana*, Curitiba, 2024.

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1 Local do Estudo e Comitê de Ética

O estudo foi conduzido em duas fases. A primeira fase foi realizada em laboratório no Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia (ICSEZ/UFAM), em Parintins, Amazonas, Brasil (2°37'15"S; 56°44'28"W). A segunda fase foi conduzida em uma fazenda comercial (2°25'00.8"S 57°06'40.9"W) localizada a 60 km por via fluvial de Parintins. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e aprovado sob o processo SEI nº 23105.044903/2022-43.

9.2 Ensaio 1 - Qualidade Espermática

12 Palhetas de sêmen bovino comercialmente congelado, provenientes de uma mesma partida de dois touros diferentes, foram submetidas a diferentes temperaturas de incubação após o descongelamento. O sêmen foi avaliado em dois tratamentos, definidos pela temperatura de incubação após o descongelamento: 5 °C (SD5) e 15 °C (SD15). As palhetas de sêmen foram analisadas em sete tempos pós-descongelamento: 0, 2, 6, 10, 24, 36 e 48 horas. Cada tratamento incluiu seis repetições por tempo de avaliação, totalizando 84 repetições. Para análise, as palhetas foram descongeladas em água morna a 37 °C por 30 segundos e, em seguida, transferidas para tubos *Eppendorf* previamente aquecidos a 37 °C e incubadas a 5 ± 1 °C e 15 ± 1 °C. A refrigeração foi realizada em caixas térmicas de isopor de 17 L, com dimensões internas de 28,6 cm × 19,9 cm × 32,1 cm e dimensões externas de 33,4 cm × 24,1 cm × 36,7 cm. Dentro de cada caixa, foram colocados 500 mL de água a 37 °C em recipientes plásticos,

juntamente com placas de gelo reutilizáveis e termômetros para monitorar e manter as temperaturas desejadas.

Para atingir e manter 15 ± 1 °C, utilizou-se uma única placa de gelo reutilizável. Para 5 ± 1 °C, uma placa de gelo foi adicionada no início da incubação e outra após quatro horas, garantindo taxa de resfriamento de $-0,3$ °C/min em ambos os tratamentos. As placas de gelo foram periodicamente substituídas para manter a estabilidade térmica por todo o período experimental. Cada placa tinha volume de 700 mL de gel, medindo $27,5 \text{ cm} \times 15 \text{ cm} \times 2,3 \text{ cm}$, e eram previamente congeladas a -20 °C por pelo menos 22 horas antes do uso. As amostras de sêmen foram avaliadas quanto à motilidade progressiva, vigor e morfologia espermática. A motilidade progressiva (0 - 100%) e o vigor (0 - 5) foram avaliados por microscopia óptica (400x), analisando uma gota de 10 µL de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C. A análise morfológica foi realizada por meio de esfregaços, conforme as orientações do Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (CBRA, 2013). Os esfregaços foram corados com azul de metileno, e 200 células por amostra foram classificadas como normais ou com alterações morfológicas na cabeça, peça intermediária ou cauda.

9.3 Ensaio 2 - Teste de Longevidade Espermática

A longevidade espermática foi avaliada por meio do teste de Termorresistência Lento (CBRA, 2013). Seis palhetas de sêmen (0,25 mL), previamente descongeladas a 37 °C por 30 segundos, foram incubadas em banho-maria a 38 °C por 5 horas. A motilidade retilínea progressiva e o vigor foram avaliados no início e no final do teste por microscopia óptica (400x).

9.4 Ensaio 3 – Taxa de Prenhez

Com base nos resultados da avaliação da qualidade espermática e considerando fator operacional e logístico, a temperatura de 5 ± 1 °C foi escolhida para o teste de fertilidade *in vivo*. O estudo foi realizado com 100 vacas submetidas a protocolo de IATF. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos experimentais. No tratamento com sêmen descongelado-refrigerado (SD; n = 50), as vacas foram inseminadas com sêmen comercial que foram previamente descongelados e, em seguida, refrigerados $-0,3$ °C/min a 5 ± 1 °C por 10 ± 1 h. Antes da IA esse sêmen era aquecido a 37°C por 30 segundos. No grupo controle, sêmen convencional (SC; n = 50), as vacas foram inseminadas com sêmen descongelado a 37 °C por 30 segundos imediatamente antes da IA. Todas as palhetas utilizadas no experimento pertenciam a uma única partida de um único touro, garantindo uniformidade do material genético.

Cada protocolo de sincronização da ovulação iniciou-se no Dia 0 (D0) com a inserção de um dispositivo intravaginal liberador de progesterona contendo 2 g do hormônio, associado à aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de Benzoato de estradiol. No Dia 7 (D7), o implante de progesterona era removido, e as vacas recebiam injeções IM de 0,5 mg de Cloprostenol, 0,6 mg de Cipionato de estradiol e 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) para indução da ovulação. No Dia 9 (D9), 55 horas após a remoção da progesterona, as vacas eram inseminadas (Santos et al., 2018). Antes da IA, era realizada ultrassonografia transretal para mensuração do diâmetro do folículo dominante, e a inseminação era conduzida seguindo os respectivos tratamentos. O diagnóstico de gestação era realizado 30 dias após a IATF por ultrassonografia. Os principais parâmetros reprodutivos avaliados foram o diâmetro folicular no momento da IA e a taxa de prenhez.

9.5 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O Ensaio 1 foi conduzido em delineamento em blocos ao acaso, utilizando o touro como efeito de bloco. O Ensaio 3 foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos e 50 repetições (vacas) por tratamento. Os dados das variáveis contínuas foram previamente avaliados quanto à normalidade (Shapiro–Wilk) e homogeneidade de variâncias (Welch) antes da ANOVA. As variáveis contínuas foram analisadas por análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento MIXED do software SAS 9.3. Motilidade e vigor espermático foram analisados como medidas repetidas (efeito de tempo), sendo testadas diversas matrizes de covariância, definindo-se a matriz de simetria composta (*compound symmetry*) conforme o menor valor do Critério de Informação de Akaike (AIC). A aproximação de Kenward–Roger foi utilizada para determinar os graus de liberdade do denominador empregados no teste dos efeitos fixos. A taxa de prenhez foi analisada por ANOVA utilizando o procedimento GLIMIX com a opção binomial no SAS 9.3. A significância estatística foi considerada para $P < 0,05$. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo procedimento *Least Squares Means* (LSMEANS), com comparações pareadas realizadas por meio da opção PDIFF = ALL.

10. RESULTADOS

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na motilidade, vigor ou morfologia espermática entre as temperaturas de incubação de 5 °C e 15 °C. Também não foi observado efeito de interação ($P > 0,05$) entre temperatura e tempo de incubação para nenhuma das variáveis analisadas. Entretanto, a motilidade espermática apresentou redução progressiva ao longo do tempo de incubação ($P < 0,0001$), passando de 63,67% no tempo 0 h para 12,17% após 48 h de incubação (Fig. 1). O vigor seguiu a mesma tendência, com declínio significativo ($P < 0,0001$) de 4,41 no tempo 0 h para 0,92 após 48 h (Fig. 1). Em relação à morfologia, o tempo de incubação influenciou as alterações de cauda ($P = 0,036$). A 5 °C, os valores variaram entre 4,6 e 7,17% de 0 a 48 h, enquanto a 15 °C oscilaram entre 6 e 6,5% no mesmo intervalo.

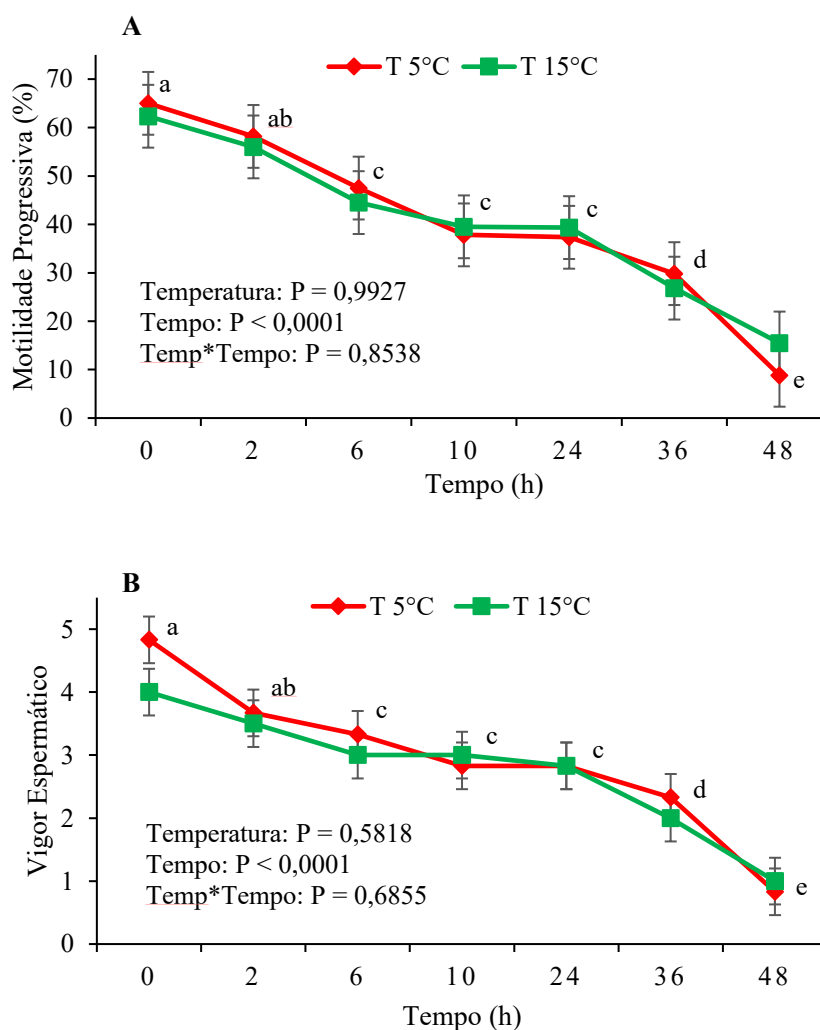


Figura 1. Motilidade Progressiva (A) e Vigor Espermático (B) de sêmen bovino descongelado e refrigerado às temperaturas (T) de 5 °C e 15 °C por até 48 horas.

Os dados do teste de termorresistência não mostraram diferenças significativas na motilidade progressiva entre os tempos avaliados ($P = 0,0728$), nem no vigor espermático ($P = 0,1556$) (Fig. 2).

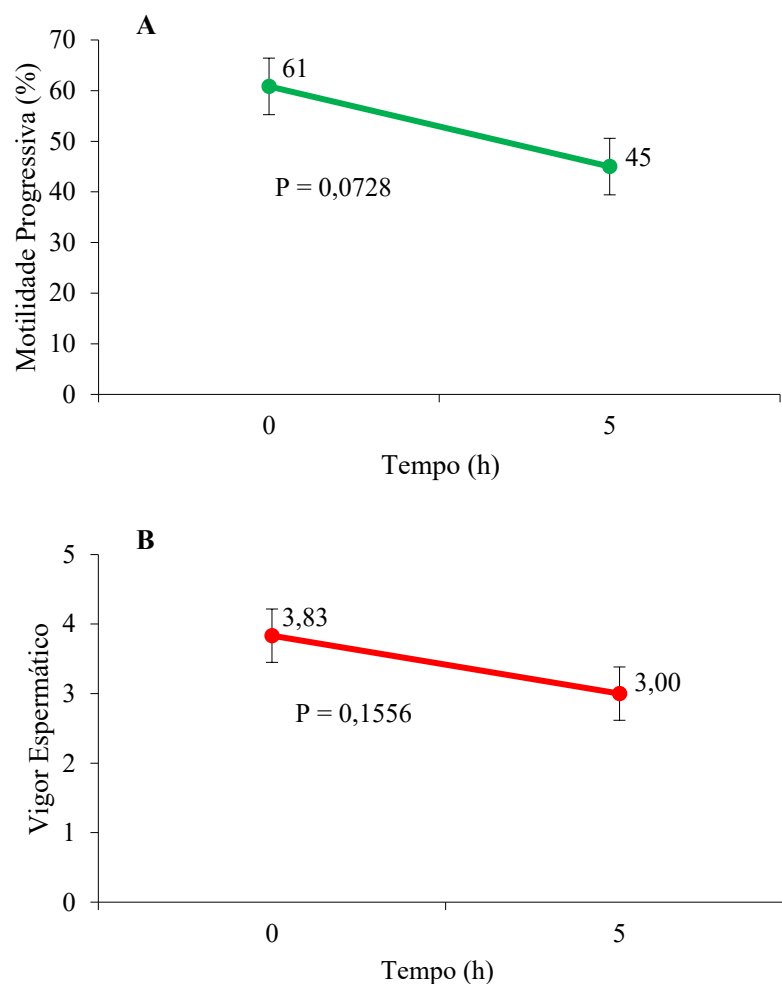


Figura 2. Teste de Termorresistência Lento (38 °C por 5 h) sobre a motilidade progressiva (A) e o vigor espermático (B) de sêmen bovino descongelado.

As taxas de prenhez não foram afetadas pelos tratamentos ($P = 0,8760$). De maneira semelhante, não foram observadas diferenças significativas no diâmetro folicular entre os grupos experimentais ($P = 0,8231$) (Fig. 3). O tempo médio entre o descongelamento da palheta de sêmen e a inseminação artificial (IA) foi de aproximadamente 10 ± 1 h (variando de 8,5 a 12 h, desde o descongelamento até a IA).

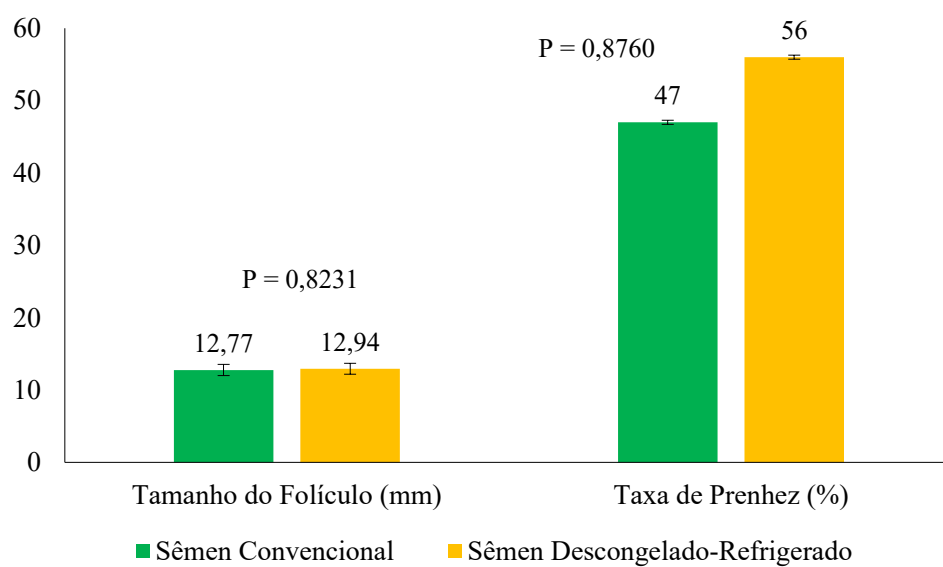


Figura 3. Tamanho do Folículo e Taxa de Prenhez de vacas inseminadas com sêmen convencional e com sêmen descongelado-refrigerado a 5 °C

11. DISCUSSÃO

A motilidade espermática apresentou declínio progressivo ao longo do tempo, independente da temperatura de incubação. Essa redução era esperada devido ao desgaste fisiológico natural do espermatozoide após o descongelamento, alheio às condições de armazenamento. Uma vez descongeladas, as células espermáticas consomem nutrientes, acumulam subprodutos metabólicos e sofrem estresse oxidativo e osmótico, resultando em perda gradual de motilidade (Talini et al., 2019). A ausência de efeito da temperatura reforça a hipótese de que a degeneração espermática é inevitável após o descongelamento, sendo mais influenciada pelo tempo de exposição do que pela temperatura em si (Alm-Kristiansen, 2023). Além disso, a ausência de interação entre temperatura e tempo indica que o declínio da motilidade seguiu padrão semelhante nos grupos de incubação a 5 °C e 15 °C. Com base nesses resultados, optou-se por 5 °C para os testes de campo, por ser considerada uma temperatura mais segura para retardar a deterioração espermática ao longo do tempo.

O mesmo padrão foi observado para o vigor espermático, que também apresentou redução progressiva com o aumento do tempo de incubação. Estatisticamente, os valores de motilidade e vigor permaneceram comparáveis aos 10 e 24 h. Considerando que o sêmen bovino pós-descongelamento deve apresentar motilidade progressiva mínima de 30% e vigor ≥ 3 para assegurar a fertilização (CBRA, 2013), ambos os períodos preservaram a viabilidade do sêmen descongelado-refrigerado sem comprometer a fertilidade. Entretanto, manter temperaturas estáveis em caixas térmicas por longos períodos pode ser desafiador, especialmente quando se utilizam placas de gelo reutilizáveis. Portanto, um período de armazenamento de 10 h mostrou-se a opção mais viável para garantir a estabilidade do sêmen durante o manuseio e transporte. Esses achados são essenciais para determinar a janela ideal de uso do sêmen descongelado-refrigerado, proporcionando maior flexibilidade na inseminação sem comprometer a eficiência reprodutiva.

A análise de morfologia espermática indicou que a temperatura de incubação não influenciou significativamente a integridade estrutural dos espermatozoides. Contudo, verificou-se aumento das alterações de cauda ao longo do tempo ($P = 0,036$), o que pode estar relacionado à maior fragilidade do flagelo após o descongelamento, tornando-o mais suscetível a danos osmóticos e a lesões decorrentes da criopreservação (Watson, 2000; Holt, 2000; Min et al., 2024). Apesar disso, a proporção de espermatozoides morfologicamente normais manteve-se elevada, sempre acima de 88%, indicando que a magnitude dessas alterações foi pequena e não comprometeu a qualidade global do sêmen para uso em inseminação artificial.

Os resultados do teste de termorresistência lento mostraram ausência de diferenças significativas na motilidade ou vigor espermático ao longo dos tempos observados. Isso sugere que a incubação em condições fisiológicas, simulando o trato reprodutivo feminino, não alterou a funcionalidade espermática em condições laboratoriais. Esses dados reforçam que o sêmen utilizado no presente estudo apresentou alta qualidade laboratorial, o que é particularmente relevante para a aplicação prática do sêmen descongelado-refrigerado na IATF, pois as células espermáticas mantiveram sua capacidade funcional durante todo o período avaliado. Assim, garante-se que os espermatozoides possam permanecer móveis por tempo suficiente para alcançar o oócito e completar a fertilização. Para sêmen bovino com potencial fértil adequado, espera-se motilidade mínima de 15% após o descongelamento (CBRA, 2013), e, neste estudo, a motilidade manteve-se dentro da faixa aceitável para viabilidade reprodutiva após o teste.

O principal achado deste estudo foi a viabilidade do uso de sêmen descongelado e refrigerado por várias horas sem comprometer a fertilidade na IA. Esses resultados sustentam a hipótese de que a refrigeração do sêmen após o descongelamento pode ser uma alternativa prática para reduzir a dependência do nitrogênio líquido no manejo reprodutivo, quando necessária. As taxas de prenhez estáveis endossam essa abordagem, demonstrando que ela não afeta a eficiência da IATF, ao mesmo tempo que oferece maior flexibilidade logística e redução de custos operacionais, especialmente em regiões remotas. As taxas de prenhez das vacas inseminadas com sêmen convencional e com sêmen descongelado-refrigerado foram semelhantes, 47% e 56%, respectivamente, confirmando que a refrigeração após o descongelamento não impacta negativamente a fertilidade do sêmen em condições de campo. Além disso, a ausência de efeitos significativos sobre o diâmetro folicular sugere que não houve diferenças fisiológicas entre os grupos. Ambos os grupos de vacas apresentavam boas condições reprodutivas. No entanto, a literatura descreve de forma consistente que o tamanho do folículo ovulatório exerce influência direta sobre a fertilidade, sendo esta negativamente afetada quando o diâmetro folicular é inferior a 10 mm (Perry et al., 2005, 2007; Ferraz Junior et al., 2016; Santos et al., 2018).

12. CONCLUSÃO

Esses resultados confirmam que o sêmen descongelado e refrigerado pode ser utilizado por até 10 horas sem comprometer a fertilidade na inseminação artificial em tempo fixo. A motilidade e o vigor espermático diminuíram ao longo do tempo, mas permaneceram dentro dos limites aceitáveis por até 24 horas. O teste de longevidade mostrou que a incubação em condições fisiológicas semelhantes às das vacas não afetou a funcionalidade espermática. As taxas de prenhez permaneceram estáveis, demonstrando seu potencial para reduzir a dependência do nitrogênio líquido e mantendo a eficiência reprodutiva.

13. REFERÊNCIAS

- ALM-KRISTIANSEN, A. H. Motility subpopulations with distinct motility characteristics using swim-up-selected sperm cells from Norwegian Red bulls: effects of freezing–thawing and between-bull variation. *Biology*, v. 12, p. 1086, 2023. <https://doi.org/10.3390/biology12081086>
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.
- FERRAZ JUNIOR, M. V. C.; PIRES, A. V.; BIEHL, M. V.; SANTOS, M. H.; BARROSO, J. P. R.; GONÇALVES, J. R. S.; SARTORI, R.; DAY, M. L. Comparison of two timed artificial insemination system schemes to synchronize estrus and ovulation in Nellore cattle. *Theriogenology*, v. 86, p. 1939–1943, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.012>
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
- MIN, C.-G.; MA, X.; WANG, Y.-C.; ZHONG, C.-K.; YUAN, C.-S.; ZHANG, K.-Y.; ZHAN, C.-L.; HOU, S.-K.; WANG, X.-H.; WANG, J.; FANG, Y.; LIU, H.-Y.; DING, H.; GUO, J.; LU, W.-F. The effects of repeated freezing and thawing on bovine sperm morphometry and function. *Cryobiology*, v. 115, p. 104892, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2024.104892>
- PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C.; GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, p. 5268–5273, 2005. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0501700102>
- PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; ROBERTS, A. J.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal of Animal Science*, v. 85, p. 684–689, 2007. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-519>
- SANTOS, M. H.; FERRAZ JUNIOR, M. V. C.; POLIZEL, D. M.; BARROSO, J. P. R.; MISZURA, A. A.; MARTINS, A. S.; BERTOLONI, A. V.; OLIVEIRA, G. B.; PIRES, A. V. Decreasing from 9 to 7 days the permanence of progesterone inserts make possible their use up to 5 folds in suckled Nellore cows. *Theriogenology*, v. 111, p. 56–61, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.017>
- TALINI, R.; KOZICKI, L. E.; GAIEVSKI, F. R.; POLO, G.; LIMA, L. G. F.; SANTIAGO, J.; SEGUI, M. S.; WEISS, R. R.; GALAN, T. G. B. Bovine semen thermoresistance tests and their correlation with pregnancy rates after fixed-time artificial insemination. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 71, n. 6, p. 2085–2092, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10994>
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 481-492, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)