FELIPE BARBOSA DOS SANTOS

**Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em
vacas de corte**

São Paulo
2016

FELIPE BARBOSA DOS SANTOS

Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho
Celeghini

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3394
FMVZ

Santos, Felipe Barbosa dos
Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte /
Felipe Barbosa dos Santos. -- 2016.
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

1. Bovinos. 2. Espermatozoides. 3. Taxa de prenhez. 4. Sondas fluorescentes.
5. CASA. I. Título.

Parecer da Comissão de Ética

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte", protocolado sob o CEUA nº 4682260814, sob a responsabilidade de **Eneiva Carla Carvalho Celeghini** e equipe; *Felipe Barbosa dos Santos* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) na reunião de 15/10/2014.

We certify that the proposal "Relationship of semen quality to fertility after TAI in beef cows", utilizing 10000 Bovines (10000 females), protocol number CEUA 4682260814, under the responsibility of **Eneiva Carla Carvalho Celeghini** and team; *Felipe Barbosa dos Santos* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 10/15/2014.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2014** a **06/2016**

Área: **Reprodução Animal**

Procedência: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **10000**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **a**

Resumo: Muitos fatores podem interferir diretamente na fertilidade do rebanho submetido à inseminação artificial em tempo fixo (IATF), tais como anestro pelo balanço energético negativo das matrizes, anestro pós-parto, afecções reprodutivas e saúde dos touros de repasse. Ultrapassadas as dificuldades sanitárias, a qualidade do sêmen utilizado na IATF surte grande efeito sobre a fertilidade do rebanho, mostrando a importância de serem feitas avaliações mais acuradas para identificar os fatores de maior impacto. Sabe-se que a criopreservação resulta em danos à estrutura da célula espermática. Estes danos vêm sendo analisados rotineiramente por técnicas convencionais (análises subjetivas), mas técnicas mais sensíveis vêm sendo desenvolvidas, como a análise da motilidade por sistemas computacionais (CASA) e o uso de sondas fluorescentes por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo. Porém, ainda são poucos os estudos sobre o impacto da utilização destas, sobre a fertilidade. Dessa forma, o objetivo deste estudo é realizar a análise do sêmen distribuído pelas centrais de criopreservação antes do uso na IATF pelas avaliações convencionais, por sistema CASA e sondas fluorescentes, avaliando seus impactos sobre a fertilidade do rebanho. Para obtenção do sêmen para realização deste estudo foi realizada parceria com empresas privadas que prestam serviços de IATF. Todas as partidas de sêmen antes da IATF serão submetidas à avaliação convencional seguindo os parâmetros estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). A IATF será realizada em aproximadamente 10.000 vacas, sendo utilizadas somente as partidas consideradas aptas pelas análises convencionais, após estas partidas serão também analisadas por CASA e sondas fluorescentes. Os dados obtidos serão analisados pelo programa computacional Proc Logistic incluído no Statistical Analysis System 9.1.3 (SAS Institute Inc., 1999). Para os resultados de fertilidade das vacas inseminadas no programa de IATF será considerada a resposta binária (prenhe ou vazia) e será realizada a análise de regressão logística múltipla, admitindo-se o nível de significância de 5%, e análise de correlação múltipla entre a fertilidade e as características de cada partida de sêmen.

Local do experimento:

São Paulo, 10 de junho de 2016

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 03 de agosto de 2016

CEUA N 4682260814

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Enelva Carla Carvalho Celeghini

Área: Reprodução Animal

Enelva Carla Carvalho Celeghini (orientador)

Título do projeto: "Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 08/junho/2016) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Gostaríamos de solicitar a mudança no número de animais (vacas) e amostras biológicas (palheta de sêmen bovino). Foi previsto inicialmente o uso de 10.000 vacas para as inseminações artificiais (IA), na prática, o número de IA realizado foi próximo a este, mas como a proposta do nosso estudo era saber a oscilação da fertilidade em função da qualidade do sêmen, foram removidos do estudo os dados que apresentavam oscilações da fertilidade que poderiam ser em função de manejo da propriedade e das condições da fêmea, na tentativa de ter dados mais controlados e melhor distribuição das partidas de sêmen utilizadas nas diferentes propriedades e diferentes categorias das fêmeas. Em resumo, foram avaliadas 68 partidas de sêmen, sendo somente 51 consideradas aptas para uso em IA. Das partidas aptas, foram utilizados dados das IA de 25 partidas, num total de 4.523 vacas inseminadas. ".

Comentário da CEUA: "Foram solicitadas mudanças no número de animais (vaca) e de amostras biológicas (palhetas de sêmen bovino), as quais foram devidamente justificadas.".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Santos, Felipe Barbosa dos

Título: **Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico todo esse trabalho a minha família e amigos que sempre foram minha base de inspiração e incentivo na busca do conhecimento, da formação e felicidade, sou eternamente grato.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter iluminado o meu caminho, me ajudado a tomar as decisões certas, me acalmado nos momentos mais aflitos, e por mostrar que o caminho planejado por mais difícil que seja sempre valerá a pena, quando realizado com dedicação, honestidade e amor;

Aos meus pais **Waldomiro e Indelécia**, por todo o apoio e incentivo. Por mais difícil que seja se ausentar de casa sempre foram minha base de tudo, sempre apoiando e mostrando os melhores caminhos a seguir. Por todos os ensinamentos, conversas, estímulos, broncas e amor que dedicaram a mim durante toda esta caminhada. Sou imensamente grato, e feliz por Deus ter me concedido os pais maravilhosos que tenho;

A **Karine Casanova**, minha companheira que sempre entendeu e motivou a buscar o conhecimento, pelos conselhos nos momentos difíceis, pela paciência e dedicação.

Aos meus **familiares**, que sempre me incentivaram a buscar o conhecimento, sempre me exaltando nas conversas de família, mostrando toda sua admiração por ter conseguido realizar a pós-graduação em uma universidade excelente como é a USP;

À **Profª Drª Eneiva Carla Carvalho Celeghini**, minha orientadora, minha mãe da pós-graduação, que sempre me guiou e mostrou que este caminho que estava seguindo seria o melhor para mim. Mostrando que o caminho da ciência e do saber é gratificante quando realizado com amor. Sempre me orientou nos momentos difíceis, me incentivando e motivando a sempre buscar o melhor. Agradeço por todas as conversas e ajuda nas tomadas de decisões não somente durante a vida acadêmica, mas também na vida pessoal. Por ter me aceitado, acreditado em mim, e aberto as portas na pós-graduação. Tenho imensa admiração por você. Muito Obrigado;

Ao **Prof. Dr. Guilherme Pugliesi**, meu co-orientador e amigo, que desde a época de estágio me incentivou e motivou a buscar o conhecimento, pelas conversas, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pelas ajudas durante todo este caminho. Sempre foi um exemplo como pessoa e profissional. Sem sua participação, paciência e orientação este sonho seria mais difícil de ser realizado. Sou extremamente grato por tudo;

Ao **Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda**, por todas as conversas, conselhos, e momentos de descontração durante os encontros. É um exemplo de profissional, dedicação a ciência e busca pela melhora da biotecnologia. Agradeço pelos ensinamentos, e por sempre deixar o Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) a disposição;

Ao **Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade**, por permitir a realização do experimento no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) que foi fundamental para a realização das análises;

Ao **Prof. Dr. Ed Hoffman Madureira**, por ter me aceitado como estagiário no Departamento de Reprodução Animal, e ter iniciado aqui minha caminhada para a tão sonhada pós-graduação na USP. Por toda a amizade, ajuda, conselhos, conversas e discussões;

Ao **Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli**, pela amizade, conselhos, ajuda nas tomadas de decisões durante a pós-graduação e vida pessoal. Por acalmar nos momentos difíceis e orientar os melhores caminhos;

Aos **Professores do VRA**, por todo o ensinamento passado durante as disciplinas e conversas, discussões, conselhos, amizade e incentivo a sempre buscar o conhecimento;

Aos **funcionários do CBRA**, Clayton, João, Márcio, Rildo, Zé Maria e Alexandra, pela convivência, conversas, ajudas e risadas;

A **Harumi**, por sempre estar pronta e com carinho ajudar a resolver os problemas e tirar as dúvidas;

As pessoas que auxiliaram ativamente em todo meu experimento; **Maíra Bianchi** e **Shirley Florez** que realizaram todas as análises laboratoriais, mesmo em momentos difíceis por conta do tempo para execução. Por todas as conversas e conselhos em momentos aflitos. Sem a dedicação de vocês este sonho não seria realizado.

A empresa **Geneplan Reprodução Bovina e todas as fazendas parceiras** que permitiram a realização do experimento de campo, e com dedicação obtivemos os excelentes resultados.

Aos membros da nossa equipe do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPaR), **Maíra, Shirley, Bruna, Fabián, Leonardo e Vitor** que sempre ajudaram prontamente com as dúvidas e conselhos.

Aos colegas da Pós-Graduação: **Everton, Thiago Santin, Thiago Martins, Milton, Kleber, Jú Mega, Moana, Milena, Mariana, Sara, Renata, Gabriel, Angela, Beatriz, Patrícia, Ticiano, Roney, Estela, Jú Diniz**, pela amizade, conselhos, risadas e aprendizado.

Aos amigos, ou melhor, “Irmãos” que Deus colocou em meu caminho: **Rodolfo Mingotti (Badá), Bernardo Marcozzi, Rômulo Germano, Marcos Colli, Carlos Eduardo (Dado)**, que sempre me ajudaram e aconselharam nas decisões tomadas. Por toda dedicação, carinho, amizade, risadas e paciência que tiveram.

A minha família de Pirassununga. Os Irmãos que tive na “Republica BoiTrepanu” : Geraldo, Barnabé, Nesquik, Boça, Bola 8, Kurió, Lau, Lambizomem, Caruncho, Canário, Quati, Siri, Põe, Viola, Nandinho, Caçapa, e a nossa companheira Elaine. Agradeço a cada um pela experiência vivida, pelo convívio em grupo, amizade, companheirismo, incentivo, discussões, etc... Levo a certeza de que fiz amigos para vida toda. Sou eternamente grato a todos.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudo concedida permitindo a realização deste projeto.

“Em primeiro lugar, tenha um ideal prático e definitivo; uma meta, um objetivo. Em segundo lugar, disponha dos meios necessários para atingir os seus fins; sabedoria, dinheiro, materiais e métodos. Em terceiro lugar, ajuste todos os seus meios para esse fim ”

Aristóteles.

RESUMO

SANTOS, F. B. dos. **Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte**. [Relationship of semen quality to fertility after TAI in beef cows]. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A criopreservação do sêmen resulta em danos à estrutura espermática, sendo nítida a importância da avaliação das partidas de sêmen antes de serem submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Todavia, nem sempre as avaliações convencionais do sêmen são suficientes para identificar partidas que possam resultar em baixa taxa de prenhez no campo, sendo necessária uma investigação mais profunda e acurada. Neste sentido, este experimento foi realizado com o objetivo de identificar partidas de sêmen que apresentam falhas na fertilidade, mesmo sendo aprovadas pelas avaliações convencionais. Foram realizadas análises convencionais (motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática) de 72 partidas de sêmen de 22 touros antes da estação de monta. Destas, 55 partidas de 18 touros foram aprovadas para o uso na IATF, mas somente 28 partidas de 10 touros foram utilizadas. As partidas de sêmen utilizadas na IATF foram submetidas a outras avaliações: análise computadorizada da motilidade espermática (CASA), integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial (por sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência). Os dados foram analisados pelo Proc Mixed do SAS usando o Test “T”. As taxas de prenhez das diferentes partidas de sêmen variaram de 71 a 37%, sendo a média e desvio padrão das partidas de $55,57 \pm 7,57\%$. Os dados de fertilidade a campo permitiram a separação das partidas de sêmen como de “Alta” (>50% de prenhez) e “Baixa” ($\leq 50\%$ de prenhez) fertilidade, sendo comparadas quatro partidas de “Alta” e quatro de “Baixa” fertilidade. Os dados das características seminais de todas as partidas de sêmen foram submetidos à análise por boxplot e separados em quartis superior e inferior. Quando se comparou as partidas de “Alta” e “Baixa” fertilidade notou-se diferença na taxa de prenhez ($p < 0,01$), mas não foi notada diferença para motilidade ($p = 0,91$), vigor ($p = 0,63$), concentração ($p = 0,27$), número de espermatozoides por palheta (NEP, $p = 0,27$), número de espermatozoides móveis e normais por palheta ($p = 0,18$), defeitos maiores ($p = 0,17$), defeitos totais ($p = 0,43$), integridade de membrana plasmática (MPI, $p = 0,07$), alto potencial de membrana

mitocondrial (AP, $p=0,94$), motilidade total (MT, $p=0,10$), VCL ($p=0,80$), VSL ($p=0,75$), VAP ($p=0,88$), LIN ($p=0,78$), STR ($p=0,71$) e BCF ($p=0,13$). No entanto, foram encontradas diferenças entre os grupos (“Alta” e “Baixa”) para defeitos menores ($p=0,05$), espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial (PIAIA)/Palheta ($p=0,01$), integridade de acrossomo (AI, $p=0,03$), motilidade progressiva (MP, $p<0,01$) e rápidos ($p<0,01$). Quando comparados os quartis superior e inferior das características seminais foram encontradas diferenças para concentração espermática ($p<0,01$), NEP ($p<0,01$), número de espermatozoides móveis por palheta ($p<0,01$), espermatozoides móveis e normais ($p<0,01$), defeitos maiores ($p<0,01$), defeitos menores ($p=0,01$), defeitos totais ($p=0,05$), MPI ($p<0,01$), AI ($p<0,01$), AP ($p=0,03$), PIAIA ($p<0,01$), PIAIA/palheta ($p<0,01$), mas esta divisão de grupos por quartis superior e inferior não apresentaram diferença sobre a fertilidade ($p>0,05$); sendo que somente. Entretanto, para MT ($p<0,01$) e MP ($p<0,01$) além da diferença entre os quartis foi notado efeito da fertilidade (MT, $p=0,05$ e MP, $p=0,01$), sendo maior para os de baixa fertilidade. Pode-se concluir que os padrões de qualidade de partidas de sêmen que apresentam fertilidade distinta podem ser semelhantes, além disso, que pode haver diferença na qualidade espermática entre as partidas que não influenciam a fertilidade. Desta forma, são necessárias outras análises mais acuradas para investigar as causas de falha na fertilidade de algumas partidas de sêmen.

Palavras-chave: Bovinos. Espermatozoides. Taxa de prenhez. Sondas Fluorescentes. CASA.

ABSTRACT

SANTOS, F. B. dos. **Relationship of semen quality to fertility after TAI in beef cows.** [Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte]. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Semen cryopreservation results in damage to sperm structure, and it is clear the importance of evaluating the semen batches before submitted it to timed artificial insemination (TAI). However, conventional semen evaluations are not always sufficient to identify batch that may result in reduced pregnancy rate in the field, requiring a more thorough and accurate investigation. Thus, this experiment was conducted in order to identify semen batches that have gaps in fertility, even being adopted by conventional assessments. Conventional analysis (motility, vigor, concentration and morphology) were performed of 72 semen batches from 22 bulls before the breeding season. Of these, 55 batches from 18 bulls were approved for use in TAI, but only 28 batches from 10 bulls were used. Semen batches used in TAI were subjected to further assessment: computer-assisted sperm analysis (CASA), integrity of plasma and acrosomal membranes and mitochondrial membrane potential (by fluorescent probes under epifluorescence microscopy). Data were analyzed by Proc Mixed of the SAS using Test "T". Pregnancy rates of different semen batches ranged 71-37%, and the mean and standard deviation of the batches was $55.57 \pm 7.57\%$. Field fertility data allowed the separation of the semen batches as "High" (>50% pregnancy rate) and "Low" ($\leq 50\%$ pregnancy rate) fertility. It was compared four batches of "High" and four batches of "Low" fertility. Data of the seminal characteristics of all the semen batches were analyzed by boxplot and separated into upper and lower quartiles. When comparing the batches of "High" and "Low" fertility was noticed a difference in the pregnancy rate ($p < 0.01$), but was not noticeable difference in motility ($p = 0.91$), vigour ($p = 0.63$), concentration ($p = 0.27$), number of spermatozoa per straw (NEP, $p = 0.27$), number of motile and normal sperm per straw ($p = 0.18$), major defects ($p = 0.17$), total defects ($p = 0.43$) plasma membrane integrity (MPI, $p = 0.07$), high mitochondrial membrane potential (AP, $p = 0.94$), total motility (TM, $p = 0.10$), VCL ($p = 0.80$), VSL ($p = 0.75$), VAP ($p = 0.88$), LIN ($p = 0.78$), STR ($p = 0.71$) and BCF ($p = 0.13$). However, differences were found

between the groups ("High" and "Low") for minor defects ($p=0.05$), sperm with plasma and acrosomal membranes integrity and high mitochondrial membrane potential (PIAIA)/straw ($p=0.01$), acrosomal integrity (AI, $p=0.03$) progressive motility (PM, $p < 0.01$) and rapid ($p < 0.01$). When comparing the upper and lower quartiles of the seminal characteristics differences were found for sperm concentration ($p < 0.01$), NEP ($p < 0.01$), number of motile sperm per straw ($p < 0.01$), motile and normal sperm ($p < 0.01$), major defects ($p < 0.01$), minor defects ($p=0.01$), total defects ($p=0.05$), MPI ($p < 0.01$), AI ($p < 0.01$), AP ($p=0.03$), PIAIA ($p < 0.01$), PIAIA/straw ($p < 0.01$), but this division groups by upper and lower quartiles showed no difference in fertility rate ($p > 0.05$). However, to MT ($p < 0.01$) and MP ($p < 0.01$) the difference between quartiles of fertility effect was noted (MT, $p=0.05$ and MP, $p=0.01$), been higher for low fertility. It can be concluded that patterns of semen quality of batches that have distinct fertility may be similar, furthermore, there may be differences in sperm quality among batches that do not affect fertility. Thus, it takes other more accurate analysis to investigate the causes of failure on fertility of some semen batches.

Keywords: Bovine. Sperm. Pregnancy rate. Fluorescent probes. CASA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmula para o cálculo da concentração espermática em Câmara de Neubauer.....	25
Quadro 1 - Classificação de partidas de sêmen de touros de acordo com os resultados das análises convencionais	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das partidas classificadas como de alta e baixa fertilidade após IATF	41
Tabela 2 - Relação das partidas de sêmen que apresentaram as quatro maiores e as quatro menores taxas de prenhez	42
Tabela 3 - Divisão por quartis realizada pelo SAS de cada característica espermática, para separação dos maiores e dos menores valores para cada variável de todas as partidas (alta + baixa fertilidade).....	42
Tabela 4 - Divisão por quartis realizada pelo SAS para cada característica espermática, para separação dos maiores e dos menores valores de cada variável das partidas de alta fertilidade.....	43
Tabela 5 - Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas analisadas pelo método convencional das partidas de sêmen bovino que apresentaram alta e baixa fertilidade a campo.....	45
Tabela 6 - Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial avaliadas por sondas fluorescentes das partidas de sêmen de touros que apresentaram alta e baixa fertilidade a campo	46
Tabela 7 - Média $\pm$ erro padrão das características do movimento espermático avaliados pelo sistema CASA utilizando o programa Sperm Class Analyser (SCA) das partidas de sêmen bovino que apresentaram alta e baixa fertilidade a campo.....	46
Tabela 8 - Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de partidas de sêmen que apresentaram Alta e Baixa fertilidade e foram separadas por quartis superior e inferior e seu efeito sobre a fertilidade.....	48
Tabela 9 - Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de partidas de sêmen que apresentaram alta fertilidade e foram separadas por quartis superior e inferior e seu efeito sobre a fertilidade	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	O ESPERMATOZOIDE.....	21
2.2	QUALIDADE DO SÊMEN	23
2.3	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESPERMÁTICA	24
2.3.1	Análises convencionais	24
2.3.2	Avaliações da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial.....	30
3	OBJETIVOS	33
4	HIPÓTESES	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1	LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL.....	35
5.2	ANÁLISE DO SÊMEN ANTES DA IATF	35
5.2.1	Análises convencionais	35
5.3	AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE A CAMPO.....	37
5.3.1	Animais.....	38
5.3.2	Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)	38
5.3.3	Diagnóstico de gestação.....	39
5.4	ANÁLISE DO SÊMEN APÓS A IATF.....	39
5.4.1	Análise computadorizada do movimento espermático	39
5.4.2	Integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial	40
5.5	DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
6	RESULTADOS	45
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Em 2014 o rebanho brasileiro já ultrapassava 200 milhões de cabeças, sendo 135,4 milhões de bovinos de corte e 22,8 milhões de bovinos provenientes de cruzamento industrial. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de bovinos e o maior exportador mundial de carne. Porém, apesar de sua colocação no cenário mundial, a eficiência reprodutiva ainda é baixa, apresentando 80,6 milhões de matrizes e desmamando apenas 55,2 milhões de bezerros, gerando uma taxa de desmama de cerca de 68,5%, tornando a atividade insatisfatória quando comparada a agricultura (ANUALPEC, 2015).

Impulsionada pela tentativa de melhorar o desempenho do rebanho, está havendo aumento do uso das biotécnicas aplicadas à reprodução animal, sendo a inseminação artificial (IA) a biotécnica mais utilizada em todo o mundo (PARKINSON, 2004). Apesar de se saber que a utilização de reprodutores geneticamente superiores em programas de IA produz uma progênie que pode incrementar a produtividade, no Brasil apenas 10% das fêmeas são inseminadas, chegando a mais de 12 milhões de inseminações em 2014 (ASBIA, 2014).

Algumas das justificativas que podem ser apontadas é a carência de mão-de-obra, deficiência de infraestrutura nas fazendas e qualidade de manejo dos animais (BARROS; BRENO, 2004).

Devido à falha na observação de estro para a IA, a adoção da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), que permite sincronizar o estro e a ovulação, por meio de tratamentos hormonais, vem possibilitando massificar sua utilização na pecuária de corte. Além de contribuir em diminuir o período de anestro pós-parto e induzir a ciclicidade ou a ovulação de animais em anestro, aumentando o ganho genético e econômico (MADUREIRA; PIMENTEL, 2005; CRESPILO, 2010; SÁ FILHO et al., 2010).

Desta forma, houve o avanço na utilização da IATF em mais de 5%, impulsionando a comercialização de doses de sêmen, que em 14 anos aumentou mais de 100%, sendo comercializadas 5 milhões de doses de sêmen no ano 2000 e mais de 13 milhões de doses em 2014, representando a proporção de 59% para gado de corte e 41% para gado de leite (ASBIA, 2014).

O processo de criopreservação do sêmen pode causar danos aos espermatozoides, chegando ao decréscimo de aproximadamente 50% da motilidade espermática (HAMERSTEDT et al., 1990; THOMAS et al., 1998; CELEGHINI et al., 2008), sendo que para a integridade das membranas esta queda pode ser mais acentuada, chegando a mais de 60% (CELEGHINI et al., 2008).

Embora nítido o crescente aumento na comercialização do sêmen criopreservado, poucos avanços tecnológicos em relação aos índices de congelabilidade dos ejaculados foram alcançados nas últimas décadas, observando perda significativa do potencial de fertilização do sêmen criopreservado (CURTIS et al., 1998; FUERST-WALTL et al., 2006; MEDEIROS et al., 2002; CELEGHINI et al., 2008).

Vincent et al. (2012) realizaram estudos com 660 partidas de sêmen criopreservado bovino, de centrais no Canadá, comparando as análises convencionais com as análises realizadas pelo sistema CASA e uso de sondas fluorescentes por citometria de fluxo (CF). Os resultados mostraram que 10,8% das amostras que foram aprovadas nos testes convencionais foram rejeitadas nos testes CASA e CF, elucidando a importância de melhorar as análises realizadas pelas centrais antes de distribuir o sêmen e de se realizar testes de fertilidade.

Em estudos realizados no Mato Grosso do Sul (Brasil) avaliando o sêmen utilizado nos programas de IATF, seguindo os parâmetros sugeridos pelo CBRA, foi notado que grande parte do sêmen utilizado não estava dentro dos padrões, ocasionando insucesso nos programas de IATF (NOGUEIRA et al., 1999), elucidando a necessidade de realizar análises mais acuradas no sêmen criopreservado, para assegurar a qualidade oferecida aos pecuaristas.

Em um estudo realizado por Nogueira et al. (2011) o sêmen utilizado representa grande impacto na fertilidade do rebanho. Foram realizadas 5.249 inseminações, comparando diferentes doses de sêmen, obtendo-se índices variando de 40,9% a 61,9% de prenhez dependendo do sêmen utilizado.

Apesar de nítida a importância de realizar a análise do sêmen por métodos mais acurados na tentativa de melhorar a fertilidade, ainda são poucos os estudos *in vivo* da relação da integridade das estruturas espermáticas e seu impacto sobre a fertilidade.

Desta forma o objetivo desta dissertação é observar se há diferenças entre os testes realizados rotineiramente por laboratórios (análises convencionais), e análises mais acuradas do movimento espermático e viabilidade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial entre partidas que apresentam boa fertilidade e fertilidade inferior, e se a utilização destes testes mais acurados podem predizer o potencial de fertilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ESPERMATOZOIDE

O processo de divisão e transformação das células tronco germinativas (espermatogênese) ocorre no interior dos túbulos seminíferos, formando o gameta masculino (MRUK; CHENG, 2004). Tal processo é dividido em duas fases, espermatocitogênese e espermiogênese.

A espermatocitogênese caracteriza a primeira fase de divisões, em que as espermatogônias originam espermatócitos primários ($2n$) que se dividem por meiose transformando-se em espermatídes (n) (BARH, 1989). A espermiogênese é caracterizada pela remodelação das espermatídes, que deixam de apresentar-se de forma arredondada e passam a se apresentar na forma de espermatozoide. A diferenciação espermática é dividida em fase de Golgi, Capuchão, Acrossoma e Maturação (JOHNSON et al., 2000).

Ao fim da fase de maturação o espermatozoide apresenta cabeça e flagelo unidos pelo colo e membrana plasmática envolvendo toda a célula, sendo liberados no lúmen dos túbulos seminíferos, em um processo denominado espermição (EDDY; O' BRIEN, 1994; MORTIMER, 1997; GARNER et al., 2001).

A membrana plasmática é organizada por uma bicamada lipídica constituída por: fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e proteínas. As regiões apolares das moléculas lipídicas são orientadas para o centro da bicamada lipídica, e as regiões polares para a região extracelular ou em contato com o citoplasma, conforme descrito por Singer e Nicolson em 1972 denominando o mosaico fluído (ANDRADE, 2009).

Sabe-se que o modelo mosaico fluído é mais complexo incluindo distribuição lipídica, assimetria da bicamada lipídica, polimorfismo dos lipídios e interação lipídio-lipídio e lipídio-proteína, sendo arranjados em um mosaico de domínios (LADHA, 1998; JANUSKAUSKAS et al., 2003).

A membrana plasmática possui elevada concentração de fosfolipídios, como a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina no folheto interno, e no folheto externo

estão a esfingomielina e a fosfatidilcolina, indicando que os espermatozoides são extremamente sensíveis a estímulos externos. Possui também elevados níveis de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente derivados do ácido linoleico, com importante papel na fluidez e flexibilidade da membrana (LENZI et al., 1996). Entre os esteróis, o colesterol é o mais abundante, e entre os glicolípídios destaca-se o SGa1AAG (LADHA, 1998).

O colesterol está presente nas membranas exercendo o papel de modular a fluidez e a estabilidade da bicamada lipídica por meio de sua interação estérica com os fosfolípídios de membrana (PARKS, 1997), sendo inversamente proporcional a quantidade de colesterol e a flexibilidade e fluidez da membrana (AMANN; PICKETT, 1987). O colesterol desempenha também papel importante na resistência dos espermatozoides de diferentes espécies ao choque-frio (HOLT, 2000a).

As proteínas integrais atuam como canais ou receptores de outras moléculas na membrana. Há carboidratos carregados negativamente em sua superfície, atraindo proteínas e glicoproteínas do meio externo, envolvendo todo o espermatozoide e formando um glicocálix. Tal glicocálix exerce função primordial na interação espermatozoide e oócito (AMANN; PICKETT, 1987)

O processo de fertilização espermática pode ser explicado baseado nas características de fluidez, flexibilidade e intensa atividade que a membrana espermática possui, o que a permite ser facilmente desestabilizada e ativada (LENZI et al., 1996).

O acrossoma está localizado na porção apical da cabeça do espermatozoide, sendo formado pelas membranas acrossomais interna e externa, entre as quais estão várias enzimas hidrolíticas necessárias para penetração da zona pelúcida e fecundação do oócito. A membrana acrossomal interna está em contato com a membrana nuclear, e a membrana acrossomal externa fica em contato com a face interna da membrana plasmática (FLESH; GADELLA, 2000). Durante a reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática se fundem formando vesículas, permitindo a passagem de enzimas como a acrosina e a hialuronidase, e outros componentes da matriz acrossomal (ASHIZAWA et al., 2004). Após a reação acrossomal, a zona equatorial da membrana plasmática do espermatozoide sofre modificações e se funde ao oolema do oócito, englobando o gameta masculino para o interior do oócito, ativando o

gameta feminino e iniciando o bloqueio à polispermia pela liberação de grânulos corticais (GADELLA et al., 2001).

As mitocôndrias estão dispostas ao redor da porção proximal do axonema do flagelo, realizam a fosforilação oxidativa para a produção de ATP como fonte de energia necessária para a motilidade flagelar (LEITE, 2008).

Contudo, a fertilização do oócito depende do metabolismo da célula para produção de energia, motilidade progressiva, integridade das membranas e funcionalidade das proteínas relacionadas com os eventos da fertilização (SQUIRES et al., 1999).

2.2 QUALIDADE DO SÊMEN

A qualidade do sêmen depende da manutenção da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática, como: membrana plasmática, flagelo, mitocôndrias, acrossoma e cromatina. Somente com o funcionamento adequado de todas as estruturas é possível que o espermatozoide se movimente pelo trato feminino e chegue ao oócito, penetrando sua zona pelúcida, se ligando a membrana plasmática e iniciando o processo de desenvolvimento embrionário (CELEGHINI et al., 2010).

Durante a monta natural, o touro deposita bilhões de espermatozoides no fundo da vagina da fêmea, sem passar por injúrias pertinentes a manipulação humana do sêmen, já no processo de inseminação artificial o sêmen passa pelo processo de criopreservação, gerando lesões nos espermatozoides; além disso, a palheta possui número reduzido de espermatozoides podendo impactar na fertilidade (SARTORI, 2004).

Tais lesões foram comprovadas devido a testes utilizando sondas fluorescentes com diferentes afinidades pelas diversas estruturas celulares e possibilitaram avaliar a integridade das membranas plasmática, acrossomal, função mitocondrial e outras. Foi observado que cerca de 85% das células espermáticas sofrem injúrias quando criopreservadas (FORERO-GONZALEZ et al., 2012).

Também atribuído a estes danos do processo de criopreservação o comprometimento do movimento espermático, alterações morfológicas, alterações da permeabilidade das membranas e geração de espécies reativas de oxigênio (WATSON, 2000).

A forma mais segura de se mensurar a fertilidade do sêmen é por meio da taxa de prenhez após monta natural ou inseminação artificial, porém esse procedimento é demorado e possui alto custo (ARRUDA et al., 2011).

2.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESPERMÁTICA

2.3.1 Análises convencionais

A motilidade é uma das análises mais importantes a ser considerada na avaliação do sêmen, pois depende diretamente da qualidade espermática (FONSECA et al., 1992). Devido a isso é classicamente utilizada nas amostras de sêmen (GILLAN et al., 2005). Por ser prático e simples, este método é utilizado para acessar a viabilidade dos espermatozoides a partir da estimativa da porcentagem de células móveis utilizando microscopia óptica, porém tal método apresenta alta subjetividade e variabilidade dos resultados (MALMGREN, 1997).

O exame é realizado em microscópio óptico de campo claro ou que apresente contraste de fase, utilizando-se aumento de 100 ou 200x, sendo utilizada a amostra de uma gota do sêmen já homogeneizado entre lâmina e lamínula aquecidas e mantidas a 37°C, visualizando e estimando a porcentagem de células móveis. Caso o sêmen esteja muito concentrado recomenda-se a diluição (CBRA, 2013).

Casagrande et al. (1980) em um estudo realizado em centrais de inseminação estabeleceu que a motilidade mínima para se obter fertilidade normal é de 20%. Kjaestad et al. (1993) utilizaram o sêmen congelado de 18 touros que apresentavam diferentes taxas de fertilidade, investigaram os valores médios de motilidade total, velocidade dos espermatozoides e integridade do acrossoma,

estabelecendo para os touros com melhor fertilidade os valores de 67,5%; 2,5%; e 79,3% respectivamente. Notou-se correlação entre motilidade e velocidade espermática mas não entre motilidade e integridade de acrossoma.

Assim como a motilidade, o vigor espermático também é determinado visualmente de acordo com a intensidade em que os espermatozoides se movimentam (BARBOSA, 2005). A intensidade do movimento espermático é avaliada em escore de 1 a 5, sendo: 1: movimento oscilatório; 2: movimento lento; 3: movimento intermediário; 4: movimento retilíneo rápido; 5: movimento progressivo retilíneo e muito rápido (CBRA, 2013).

A concentração espermática é dada pela relação da quantidade de espermatozoides x plasma seminal ou diluidor no caso de sêmen criopreservado. O método de contagem mais utilizado é a contagem em câmara de Neubauer em que um volume de sêmen conhecido é diluído em um volume de meio, geralmente formol-salino tamponado, também conhecido. Após a homogeneização, uma amostra é inserida na câmara de Neubauer, mantida em repouso horizontal por 5 minutos, para que as células se sedimentem no fundo. Logo, a câmara é levada ao microscópio óptico e contadas as células de cinco quadrados grandes de cada lado da câmara. Após a contagem é calculada a média e submetido ao cálculo da concentração (Figura 1), sendo o resultado expresso em mm^3 ou se multiplicado por 1.000, expresso em cm^3 (CBRA, 2013).

Figura 1 - Fórmula para o cálculo da concentração espermática em Câmara de Neubauer

$$\text{CONCENTRAÇÃO} = \frac{A}{\frac{1}{10} \times \frac{N}{25} \times \frac{1}{B}}$$

Sendo:

A = Número médio de espermatozoides contados nos dois retículos;

N = número de quadrados grandes contados;

B = fator de diluição.

Fonte: adaptado de CBRA (2013)

Stewart e Bennett (1968) compararam diferentes concentrações (5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 x 10⁶) de espermatozoides totais por palheta, e não observaram diferença entre os tratamentos. Mais tarde, Foulkes e Stewart (1977) compararam diferentes concentrações (5,0; 7,0 e 9,0 x 10⁶) de espermatozoides totais por palhetas de 0,25 mL, não encontrando diferença na fertilidade. Logo quando utilizaram concentrações de 12,0 e 20,0 x 10⁶ houve menor taxa de retorno ao cio. Den Daas et al. (1998) compararam doses com 1,1 a 11,8 x 10⁶ de espermatozoides viáveis por palheta, e concluíram que não houve correlação entre o número máximo de espermatozoides viáveis com uma maior taxa de não retorno ao cio aos 56 dias.

A técnica de avaliação da morfologia espermática pode estimar a quantidade de espermatozoides morfologicamente normais, sendo desejável valores $\geq 70\%$ para sêmen fresco, refrigerado ou congelado (CBRA 2013).

A avaliação da célula espermática pode ser realizada por várias metodologias sendo: microscopia ótica de luz com a utilização de corantes como: Rosa de Bengala, Giemsa, eosina-nigrosina e outros; microscopia de contraste de fase, microscopia de interferência diferencial (DIC), e com a utilização de sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência (JOHNSON et al., 2000; SALVADOR et al., 2001; CELEGHINI et al., 2007).

As anormalidades morfológicas podem ser classificadas de acordo com a região da célula onde ocorreu o defeito (cabeça, peça intermediária ou cauda) (HOWARD; PACE, 1988), defeitos primários e secundários, ou defeitos maiores e menores (BARBOSA, 2005). A classificação mais utilizada até a atualidade foi descrita por Blom (1973), considerando a importância do defeito para a fertilidade, sendo classificadas em defeitos maiores e defeitos menores. Os defeitos maiores são: defeitos no acrossoma, gota citoplasmática proximal, cabeça subdesenvolvida, cabeça estreita na base, cabeça isolada patológica, cabeça pequena anormal, *pouch formation*, cauda enrolada na cabeça, cabeça piriforme, formas teratológicas, defeitos da peça intermediária, cauda fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota distal. Os defeitos menores são: cabeça delgada, cabeça gigante, cabeça curta, cabeça larga, cabeça pequena normal, cabeça isolada normal, inserções da cauda abaxial, retroaxial ou oblíqua, cauda dobrada ou enrolada e gota citoplasmática distal.

A alta frequência de espermatozoides morfológicamente anormais ou com um único defeito podem reduzir a fertilidade (VERSTEGEN et al., 2002; FRENEAU 2011). Alterações do acrossoma como o *Knobbed Acrosome* pode impactar negativamente a fertilidade. O ejaculado de touros com alta porcentagem desta alteração podem apresentar índices de fertilidade próximos da esterilidade, pois impede a ligação dos espermatozoides à zona pelúcida. A presença de gotas citoplasmáticas proximais em níveis de 5 a 15% podem estar associados ao sêmen de baixo potencial de fertilização. As alterações de cabeça estão associadas a descondensação da cromatina levando a subfertilidade e baixa taxa de clivagem de embriões. A presença de anormalidades de cauda pode ser transitória, principalmente devido à maturidade sexual dos touros, mas podem prejudicar a eficiência reprodutiva devido à falha do movimento espermático adequado (ARRUDA et al., 2015).

Arruda et al. (2015) descrevem que, segundo o Grupo de Trabalho de Andrologia Bovina, instituído pela Portaria n.109/2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento-MAPA (BRASIL, 2009), para proceder à revisão do “Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal”, houve consenso em recomendar para ejaculados de touros os seguintes padrões: espermatozoides normais - valor mínimo de 70% de células normais, sendo esta característica a de maior importância para a fertilidade do touro no rebanho. Para defeitos maiores o máximo de 20% de defeitos, e para defeitos menores o máximo de 30% de tolerância, respeitando o limite de 70% de espermatozoides normais, sendo a distribuição para os defeitos individuais os limites de anormalidades de até 5% para defeitos maiores e 10% para defeitos menores.

O Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal sugere parâmetros classicamente utilizados na rotina de análise laboratorial convencional do sêmen congelado bovino buscando assegurar os padrões de qualidade. Tais parâmetros são: volume superior a 0,25 mL, e quando descongelado entre 35 a 37°C por um tempo mínimo de 30 segundos devem apresentarem motilidade progressiva superior a 30%; vigor superior a 3 (em escala de 1 a 5); defeitos totais inferior a 30% e defeitos maiores inferior a 10% para doses de, no mínimo, 10×10^6 espermatozoides com motilidade

progressiva e defeitos totais inferior a 20% e defeitos menores inferior a 10% para doses com 6 a $<10 \times 10^6$ espermatozoides com motilidade progressiva (CBRA, 2013).

Classicamente o movimento espermático tem sido avaliado baseando-se em uma avaliação subjetiva de parâmetros como motilidade massal e individual, sendo estas consideradas como uma expressão da viabilidade espermática (VERSTEGEN et al., 2002). Porém, as avaliações subjetivas das características seminais apresentam variações entre técnicos, sendo que diversos examinadores podem classificar diferentemente amostras de um mesmo ejaculado, elucidando a necessidade de estabelecer uma técnica mais acurada de se analisar a cinética espermática (BACKER; CLARKE, 1987; DUNPHY et al., 1989).

Muitos sistemas foram desenvolvidos para a análise espermática computadorizada (CASA, do inglês - computer-assisted semen analysis), tais como da Hamilton Thorne Biosciences (Inc., Beverly, Massachusetts, U.S.A.), SQA (Sperm quality analyser - Medical Eletronic Systems Ltd., Caesarea, Israel) e SCA (Sperm Class Analyser - Microptics Barcelona, Espanha) e são utilizados na avaliação da cinética espermática (CENTOLA, 1996; HAUGLAND et al., 2009).

Amann e Katz (2004) referem-se ao sistema CASA como um sistema automatizado (*Hardware e Software*) que visualiza e digitaliza imagens sucessivas dos espermatozoides, processam, analisam e geram informações individuais da cinética espermática, e também valores estatísticos médios da população total. Os resultados obtidos refletem uma série de parâmetros que definem o exato movimento de cada espermatozoide.

O sistema de análise computadorizado SCA consiste em um microscópio de contraste de fase acoplado a uma câmera de vídeo que capta as imagens e as envia ao software SCA instalado no sistema operacional de um computador, onde são reproduzidas e analisadas de forma eficiente (BURNES et al., 2004; HAUGLAND et al., 2009).

Para realizar com sucesso a análise do movimento espermático é necessário utilizar uma concentração adequada. Kolibianakis et al. (1992) obtiveram uma concentração ótima para análise com 50×10^6 espermatozoides/mL, e após avaliação de 110 amostras de sêmen notaram correlação ($r=0,89$; $p<0,001$) entre movimento espermático analisado pelo método convencional e computadorizado.

O sistema CASA permite realizar a contagem total de espermatozoides da amostra, sendo que a motilidade total (%) representa a população de espermatozoides móveis e a motilidade progressiva (%) a porcentagem de espermatozoides que apresentam movimento progressivo, determinado no *setup* (ARRUDA et al., 2000).

Segundo Versteegen et al. (2002) o CASA permite avaliar três velocidades espermáticas: velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), sendo a velocidade da real trajetória do espermatozoide, é a maior das três velocidades, serve como elemento de cálculo para a linearidade; velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide, sendo sempre a mais baixa das três velocidades e velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$) é a velocidade da trajetória média do espermatozoide. Quando a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear com pouco movimento lateral, os valores de VAP são semelhantes a VSL, porém em trajetórias irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de movimento lateral, a VAP será maior que a VSL.

Outras características do movimento espermático avaliados pelo CASA incluem: amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm) refere-se ao deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real. Este parâmetro está relacionado com a capacidade de penetração da zona pelúcida, sendo este um dos parâmetros que apresentam efeito direto sobre a fertilização; frequência de batimento (BCF, Hz) é o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza em direção do movimento; retilinearidade (STR, %) é referente a relação percentual entre VSL e VAP, estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta; linearidade (LIN, %) é a relação percentual entre VSL e VCL, ou seja, é a porcentagem de células que tem index linear $> 0,7$. Quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade. Os valores de velocidade são determinados como percurso relevante percorrido em um período de tempo, enquanto os valores de LIN, e STR são determinados como raio dos valores de velocidade (VERSTEGEN et al., 2002).

Farrell et al. (1998) realizaram combinações de múltiplas variáveis obtidas com o CASA, sendo estas responsáveis pelos melhores índices de correlação com fertilidade a campo, do que a utilização de uma única variável de CASA. Segundo

Verstegen et al. (2002) os parâmetros VCL e ALH fornecidos por CASA apresentaram alta correlação com fertilização na maioria dos seus estudos, e BCF e LIN apresentaram correlação positiva com fertilidade em alguns estudos, mas em outros não.

Segundo Matos et al. (2008) os valores de VAP, VSL e VCL são maiores em amostras com mais de 50% de oócito fertilizados, e quando estes valores estão combinados com altos valores de LIN e BCF há melhor migração e penetração no muco cervical.

2.3.2 Avaliações da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial

A célula espermática é composta por vários compartimentos inclusos nas membranas celulares que devem permanecer intactos para garantir a funcionalidade celular, sendo essenciais para que ocorra o processo de fertilização (ÔURA; TOSHIMORI, 1990; PAPAIOANNOU et al., 1997).

A integridade e funcionalidade das estruturas espermáticas podem ser monitoradas por sondas fluorescentes, que se ligam e marcam estruturas específicas das células, fornecendo informações precisas sobre os compartimentos e funcionalidade das células espermáticas, já que a fluorescência é um indicador sensível do estado de certas moléculas, sendo aplicado como uma ferramenta para mensurar mudanças metabólicas no interior de células vivas (CELEGHINI et al., 2007).

A sonda fluorescente iodeto de propídio (PI) possui afinidade pelo DNA e cora de vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (CELEGHINI, 2005), enquanto a sonda Hoechst 33342 (H342) é utilizada como um contra-corante para determinar espermatozoides com membrana plasmática íntegras quando associado a uma sonda de coloração distinta como o PI, se ligando ao DNA específico e marcando de azul o núcleo da célula (CASEY et al., 1993; MAXWELL et al., 1997).

Devido ao caráter glicoproteico dos componentes acrossomais, é possível avaliar a integridade acrossomal por preenchimento da matriz acrossomal de espermatozoides que apresentem acrossoma lesado com lectinas conjugadas como a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), esta aglutinina possui afinidade por resíduos glicoproteicos específicos, se associando a açúcares α -manosídeos encontrados nos resíduos acrossomais. Para que o PSA seja visualizado é necessário que seja conjugado a fluoresceínas, como o isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA), marcando assim de coloração verde-amarela células que apresentam acrossoma lesionado (CASEY et al., 1993; ARRUDA, 2000; CELEGHINI, 2005; SILVA; GADELA, 2006).

Diante da importância de se avaliar o potencial da membrana mitocondrial foram desenvolvidas sondas fluorescentes como as rodaminas e as carbocianinas, que não destroem a célula, nem são tóxicas (REERS et al., 1991). A sonda carbocianina catiônica lipofílica (JC-1), se difere das rodaminas e de outras carbocianinas por produzir dois picos de emissão de fluorescência que refletem a existência de duas formas da sonda (monômeros ou agregados), possibilitando identificar populações de mitocôndrias com diferentes potenciais de membrana por código de cor (ARRUDA et al., 2003).

Tal corante emite fluorescência de acordo com a concentração de sua penetração no interior da organela. Quando é penetrada em altas concentrações apresenta-se na forma de J-agregados emitindo coloração vermelha, identificando assim, as mitocôndrias funcionais. Já em mitocôndrias com baixo a médio potencial de atividade, a fluorescência apresenta-se na forma de monômeros, penetrando em baixas concentrações, emitindo fluorescência em verde. Desta forma, a sonda JC-1 emite fluorescência de cor verde para o laranja esverdeado ou vermelho (ARRUDA et al., 2003; CELEGHINI, 2005; NASCIMENTO et al., 2008).

Segundo Tartaglione et al. (2004) a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossoma é mais acurada para prever a fertilidade *in vitro* que a avaliação da motilidade e morfologia espermática. Januskauskas et al. (2001) perceberam que as taxas de fertilidade relacionadas com os dados da cinética espermática obtidos por CASA, sondas fluorescentes e estrutura da cromatina por citometria de fluxo podem ser capazes de prever a capacidade fertilizante do sêmen.

Celeghini et al. (2007) realizaram a associação das sondas PI, H342, FITC-PSA e JC-1 para avaliar simultaneamente a integridade das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial, encontrando resultado promissor na validação da técnica. Em seguida, Celeghini et al. (2008) observaram que esta associação de sondas fluorescentes permitia detectar com mais precisão lesões nas células espermáticas após o processo de criopreservação do sêmen. Em continuidade ao estudo, Oliveira et al. (2014) utilizaram esta mesma associação de sondas fluorescentes para separar partidas de sêmen que apresentavam características espermáticas similares, diferindo apenas no percentual de células contendo integridade de membrana plasmática, acrossoma intacto e alto potencial mitocondrial (PIAIA); assim três partidas de sêmen, contendo 8,5; 23 e 44,5% de PIAIA, foram submetidas à IATF, e resultaram em diferença na fertilidade, notando-se maior taxa de prenhez para as partidas apresentando maior percentual de membranas íntegras (36,2; 50,0 e 64,7%, respectivamente).

3 OBJETIVOS

Este estudo busca compreender se as diferenças existentes na fertilidade a campo entre partidas de sêmen bovino estão relacionadas à qualidade espermática avaliada previamente antes do uso na IATF, tendo por objetivos específicos:

1. Avaliar a fertilidade do sêmen comercial bovino aprovado por análises convencionais.
2. Avaliar se as diferenças na fertilidade do campo após IATF podem ser explicadas por avaliações do sêmen utilizando o sistema CASA e sondas fluorescentes.
3. Avaliar se o sêmen congelado bovino aprovado nas avaliações convencionais pode ser rejeitado por CASA e sondas fluorescentes e estes resultados influenciar na fertilidade.
4. Buscar a relação entre as características de qualidade do sêmen com a fertilidade.

4 HIPÓTESES

Baseados nos objetivos e no levantamento bibliográfico foram formuladas as seguintes hipóteses:

- A utilização das análises convencionais como: motilidade, vigor, concentração, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais, e número de espermatozoides móveis por palheta não são suficientes para assegurar boa taxa de prenhez no campo.
- A inclusão das técnicas de avaliação das partidas de sêmen com CASA e sondas fluorescentes incrementa a predição da fertilidade a campo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

As análises do sêmen foram realizadas no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus “Fernando Costa”, Pirassununga-SP e as inseminações artificiais foram realizadas em fazendas comerciais localizadas no estado do Mato Grosso do Sul (Brasil), e na cidade de Puerto Suárez (Bolívia). O período do experimento estendeu-se de agosto de 2014 a agosto de 2016.

5.2 ANÁLISE DO SÊMEN ANTES DA IATF

Foram analisadas 72 partidas de sêmen de 22 touros, das raças Angus, Brahman e Nelore. As partidas foram adquiridas pelas fazendas parceiras antes de iniciar a estação de monta para análise da qualidade seminal. Após as análises convencionais realizadas, apenas 55 partidas de 18 touros foram selecionadas e liberadas para IATF. Destas, somente 28 partidas de sêmen de 10 touros, sendo sete de touros da raça Nelore e três da raça Angus foram submetidas à IATF (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação de partidas de sêmen de touros de acordo com os resultados das análises convencionais

(Continua)

Ordem	Touro	Partida	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	NS/Pal ¹ (x10 ⁶ /mL)	NSM/Pal ² (x10 ⁶ /mL)	Def. Mai ³ (%)	Def. Men ⁴ (%)	Def. Tot ⁵ (%)	Classificação
1	A	1	65	3,0	17,5	11,4	4,0	23,0	27,0	SNU ⁶
2	A	2	60	3,5	22,5	13,5	4,0	7,0	11,0	SNU
3	A	3	70	4,0	27,5	19,3	6,0	12,0	18,0	SNU
4	B	1	35	2,5	21,9	7,7	32,0	10,0	42,0	NS ⁸
5	C	1	50	3,0	17,5	8,8	31,0	0,0	31,0	SIATF ⁷
6	C	2	40	2,0	13,1	5,3	12,5	7,5	20,0	NS
7	D	1	75	4,0	10,6	8,0	20,0	2,5	22,5	SIATF
8	D	2	85	4,0	23,1	19,7	22,5	1,5	24,0	SIATF
9	D	3	85	4,0	16,9	14,3	14,0	4,0	18,0	SIATF
10	D	4	75	3,5	24,4	18,3	8,0	3,0	11,0	SIATF
11	E	1	60	2,5	29,3	17,6	19,5	1,0	20,5	SIATF
12	E	2	55	2,5	23,8	13,1	13,0	5,5	18,5	SNU
13	E	3	60	2,5	20,6	12,4	13,5	5,0	18,5	SNU
14	E	4	60	3,0	31,3	18,8	11,0	4,0	15,0	SNU
15	F	1	70	3,0	18,1	12,7	14,5	4,0	18,5	SNU
16	G	1	55	2,5	26,9	14,8	17,5	7,5	25,0	SIATF
17	G	2	60	2,5	34,4	20,6	3,5	4,5	8,0	SIATF
18	G	3	40	2,0	35,6	14,3	24,5	1,5	26,0	SIATF
19	G	4	65	2,5	15,6	10,2	18,5	0,5	19,0	SIATF
20	G	5	40	3,0	22,5	9,0	16,5	4,0	20,5	SNU
21	G	6	50	2,5	21,9	10,9	17,5	0,0	17,5	SNU
22	G	7	65	3,0	21,9	14,2	8,0	7,0	15,0	SNU
23	G	8	45	2,0	25,0	11,3	30,0	1,0	31,0	NS
24	G	9	60	3,0	35,0	21,0	31,5	4,0	35,5	NS
25	G	10	25	2,5	23,1	5,8	14,0	1,0	15,0	NS
26	G	11	55	3,0	35,6	19,6	27,5	2,5	30,0	NS
27	G	12	40	2,0	37,5	15,0	30,5	1,5	32,0	NS
28	G	13	45	2,5	29,4	13,2	27,0	4,0	31,0	NS
29	G	14	30	2,5	28,1	8,4	12,0	14,0	26,0	NS
30	H	1	45	2,5	22,5	10,1	8,5	5,0	13,5	SNU
31	I	1	60	2,5	20,0	12,0	11,5	2,0	13,5	SNU
32	I	2	70	3,0	8,8	6,1	6,5	2,5	9,0	NS
33	J	1	70	3,5	17,5	12,3	12,5	3,5	16,0	SNU
34	K	1	65	2,5	13,8	8,9	25,0	6,0	31,0	SNU
35	K	2	60	2,5	17,5	10,5	16,0	13,0	29,0	SNU
36	K	3	75	3,5	17,5	13,1	16,0	20,0	36,0	SNU
37	K	4	60	3,0	23,8	14,3	21,0	22,0	43,0	NS
38	L	1	60	3,0	15,0	9,0	11,0	6,0	17,0	SIATF
39	L	2	75	3,0	18,8	14,1	12,5	25,5	38,0	SIATF
40	L	3	75	4,0	22,5	16,9	15,0	9,0	24,0	SNU
41	L	4	50	2,5	18,8	9,4	16,0	3,0	19,0	SNU
42	M	1	60	3,5	21,9	13,1	10,0	4,5	14,5	SIATF
43	M	2	60	2,5	20,0	12,0	11,0	2,0	13,0	SIATF

(conclusão)

Ordem	Touro	Partida	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	NS/Pal ¹ (x10 ⁶ /mL)	NSM/Pal ² (x10 ⁶ /mL)	Def. Mai ³ (%)	Def. Men ⁴ (%)	Def. Tot ⁵ (%)	Classificação
44	M	3	75	3,5	15,0	11,3	12,0	10,0	22,0	SIATF ⁷
45	M	4	75	3,5	16,3	12,2	11,0	7,0	18,0	SIATF
46	M	5	70	3,0	18,8	13,1	12,0	3,0	15,0	SIATF
47	M	6	65	3,5	11,3	7,3	11,0	2,5	13,5	SNU ⁶
48	M	7	70	3,0	10,0	7,0	17,0	2,0	19,0	SNU
49	M	8	75	3,5	16,3	12,2	11,0	3,0	14,0	SNU
50	M	9	70	3,5	16,9	11,8	11,0	2,0	13,0	SNU
51	M	10	65	3,0	17,5	11,4	9,0	2,0	11,0	SNU
52	N	1	75	2,5	4,9	3,7	23,0	0,0	23,0	SIATF
53	N	2	50	3,0	26,3	13,1	14,0	3,0	17,0	SNU
54	O	1	50	2,5	18,8	9,4	7,0	5,0	12,0	SIATF
55	O	2	75	4,0	15,0	11,3	6,0	6,0	12,0	SIATF
56	O	3	55	3,0	15,0	8,3	8,0	2,0	10,0	SIATF
57	O	4	70	2,5	15,0	10,5	3,0	8,0	11,0	SIATF
58	O	5	65	4,0	20,0	13,0	9,0	2,0	11,0	SIATF
59	O	6	70	3,0	20,0	14,0	7,0	8,0	15,0	SNU
60	P	1	50	2,5	35,6	17,8	9,5	0,5	10,0	SIATF
61	Q	1	60	3,0	20,8	12,5	28,0	8,0	36,0	NS ⁸
62	R	1	35	2,0	43,8	15,3	12,0	5,5	17,5	SNU
63	S	1	65	3,0	26,9	17,469	20,5	2,5	23,0	SIATF
64	S	2	70	2,5	26,3	18,375	19,5	3,0	22,5	SIATF
65	S	3	55	2,0	31,3	17,188	22,0	1,5	23,5	SIATF
66	S	4	55	3,0	30,0	16,500	16,5	5,5	22,0	SIATF
67	T	1	65	3,0	21,3	13,8	30,0	2,0	32,0	NS
68	T	2	35	3,0	32,5	11,4	30,0	6,0	36,0	NS
69	U	1	70	3,0	22,5	15,8	9,0	2,5	11,5	SNU
70	U	2	70	2,5	16,3	11,4	10,0	1,0	11,0	SNU
71	V	1	50	2,5	24,4	12,2	11,0	3,5	14,5	SNU
72	V	2	60	2,5	13,1	7,9	9,0	4,0	13,0	NS

Fonte: Santos (2016).

Legenda: ¹NS/Pal: Número de espermatozoides por palheta, ²NSM/Pal: Número de espermatozoides móveis por palheta; ³Def. Mai: Defeitos maiores, ⁴Def. Men: Defeitos menores, ⁵Def. Tot: Defeitos totais. Classificação: ⁶SIATF: Seleccionada e utilizada para IATF, ⁷SNU: Seleccionada e não utilizada para IATF, ⁸NS: Não seleccionada.

5.2.1 Análises convencionais

Foram descongeladas duas palhetas de sêmen de cada partida a 37° C por 30 segundos, homogeneizadas e avaliadas quanto à concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática.

A avaliação da concentração espermática foi realizada por meio de diluição do sêmen em formol salino a 5% na diluição 1:100, sendo colocado 10 µL de sêmen

em 990 μ L de formol salino tamponado, com a contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer. A motilidade e o vigor foram avaliados com uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula. A motilidade foi determinada em porcentagem de espermatozoides móveis no campo, enquanto o vigor foi classificado em escore de 1 a 5, sendo 1 referente ao movimento mais lento dos espermatozoides e 5 ao mais rápido. Para a morfologia espermática o sêmen foi diluído em formol salino tamponado a 5%. Uma gota do sêmen diluído foi colocada entre lâmina e lamínula e observados em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC, Nikon, modelo 80i) com aumento de 1000x, contando-se 200 células por amostra e classificando-as de acordo com Bloom (1973) em defeitos maiores e defeitos menores.

Foram consideradas dentro do padrão as partidas de sêmen que apresentaram: volume $\geq 0,25$ mL; motilidade progressiva $\geq 30\%$; vigor ≥ 3 , número de espermatozoides móveis/palheta $\geq 10 \times 10^6$, espermatozoides normais $\geq 70\%$ e defeitos maiores $\leq 10\%$, conforme descrito pelo CBRA (2013). Após avaliação, as partidas dentro dos padrões foram liberadas para utilização na IATF.

5.3 AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE A CAMPO

5.3.1 Animais

Foram submetidas à IATF 5.235 fêmeas pluríparas da raça Nelore e mestiças Nelore. Foram utilizadas vacas paridas apresentando período pós-parto de 30 a 60 dias. Os animais foram mantidos em pasto de *Brachiaria brizantha* e Capim Mombaça, recebendo sal mineralizado e água permitindo a ingestão *ad libitum* durante todo o período experimental.

5.3.2 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

As vacas foram submetidas a um protocolo de sincronização do estro e da ovulação. Foi utilizado protocolo de três manejos, onde as vacas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) (Sincrogest; Ouro Fino, Cravinhos, SP,

Brasil) e administração via intramuscular (IM) de 2 mg de Benzoato de estradiol (BE) (2 mg; Sincrodiol, Ouro Fino); 8 dias após, foi removido o dispositivo intravaginal e administrado via IM 1 mg de Cipionato de estradiol (ECP; Zoetis, São Paulo, SP), 300 UI de eCG (Novormon; Zoetis) e 0,530 mg de cloprostenol sódico (Sicrocio; Ouro Fino); 48 horas após as vacas foram submetidas a inseminação artificial (IA).

Os lotes submetidos à IATF apresentavam número superior a 100 animais, sendo utilizado no mínimo duas partidas de sêmen por lote.

5.3.3 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico para confirmação da gestação foi realizado entre 30 e 45 dias após a IATF utilizando o aparelho de ultrassonografia Dp 10Vet Mindray, por via transretal em modo B.

5.4 ANÁLISE DO SÊMEN APÓS A IATF

Após a IATF, as partidas que foram utilizadas foram novamente avaliadas utilizando-se técnicas complementares. Para isso, duas palhetas de sêmen de cada partida foram descongeladas (37°C/30 segundos), homogeneizadas e avaliadas quanto à motilidade pelo sistema CASA e integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.

5.4.1 Análise computadorizada do movimento espermático

A motilidade espermática foi avaliada pelo sistema CASA (programa SCA - Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha). O *setup* foi ajustado previamente para análise de espermatozoides bovinos. Para avaliação, a amostra espermática foi diluída ($12,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL) em meio TALP *sperm* (BAVISTER; LORRAINE, 1983), pré- aquecido a 37° C. A câmara de Makler® (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel) foi utilizada na avaliação. As variáveis consideradas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MPROG,%),

velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

5.4.2 Integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

As membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial espermática foram analisadas pela técnica de avaliação simultânea descrita por Celeghini et al. (2007, 2008).

Para avaliação simultânea foram utilizados 150 μL de sêmen diluído em TALP (25×10^6 espermatozoides/mL) adicionando-se a estas sondas fluorescentes: 2 μL de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL, Molecular Probes), 2 μL de iodeto de propídio (0,5 mg/mL, Sigma-Andrich), 20 μL de aglutinina obtida de *Pisum sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 $\mu\text{L/mL}$, Sigma-Andrich) e 6 μL de iodeto de 5,5', 6,6' tetracloro 1,1', 3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1, 153 μM , Sigma-Andrich) preparadas conforme descrito por Celeghini et al. (2007). Após a adição das sondas fluorescentes, a amostra foi incubada por 8 minutos a 37°C. A leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) em aumento de 1000x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm). Foram avaliadas 200 células por amostra, sendo classificadas de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda em: PIAIA (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial), PIAIB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta, baixo potencial de membrana mitocondrial), PIALA (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial), PIALB (membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial), PLAIA (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta, alto potencial de membrana mitocondrial), PLAIB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta,

baixo potencial de membrana mitocondrial), PLALA (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, alto potencial de membrana mitocondrial), PLALB (membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada, baixo potencial de membrana mitocondrial). Foram considerados nos resultados os percentuais de células PIAIA, membrana plasmática íntegra (MPI), membrana acrossomal íntegra (AI) e alto potencial de membrana mitocondrial (AP).

5.5 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

A partir dos resultados obtidos da IATF, as partidas de sêmen foram classificadas em Alta fertilidade (>50% de prenhez) e Baixa fertilidade (≤50% de prenhez) (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação das partidas classificadas como de alta e baixa fertilidade após IATF

TOURO	PARTIDA	Número de IA	Taxa Prenhez (%)	Fertilidade*
G	2	76	71	Alta ¹
D	2	200	69	Alta
G	4	104	69	Alta
C	1	451	65	Alta
G	3	117	62	Alta
G	1	139	61	Alta
D	4	144	59	Alta
D	1	181	58	Alta
L	1	289	58	Alta
M	4	199	58	Alta
N	1	100	58	Alta
O	4	363	58	Alta
M	1	29	55	Alta
O	2	162	55	Alta
O	3	76	55	Alta
D	3	439	54	Alta
O	1	150	54	Alta
O	5	59	54	Alta
M	3	38	53	Alta
E	1	514	52	Alta
M	5	268	52	Alta
P	1	115	52	Alta
S	3	296	50	Baixa ²
L	2	163	49	Baixa
S	2	255	47	Baixa
S	4	85	46	Baixa
M	2	33	45	Baixa
S	1	190	37	Baixa

Fonte: Santos (2016).

Legenda: *Fertilidade: ¹Alta: ≥ 50% de taxa de fertilidade, ²Baixa: ≤50% de taxa de fertilidade

Em seguida, foram separadas e comparadas as quatro partidas que apresentaram as maiores taxas de fertilidade e as quatro partidas que apresentaram as menores taxas fertilidade, respeitando o total mínimo de 80 inseminações por partida (Tabela 2).

Tabela 2 - Relação das partidas de sêmen que apresentaram as quatro maiores e as quatro menores taxas de prenhez

Touro	Partida	Número de IA	Taxa de prenhez (%)	Fertilidade*
G	4	104	69	Alta ¹
D	2	200	69	Alta
C	1	451	65	Alta
G	3	117	62	Alta
S	1	190	37	Baixa ²
S	2	255	47	Baixa
S	3	296	50	Baixa
S	4	85	46	Baixa

Fonte: Santos (2016).

Legenda: *Fertilidade: ¹Alta: > 50% de taxa de fertilidade, ²Baixa: ≤50% de taxa de fertilidade

Logo, todas as partidas, que apresentaram tanto alta fertilidade e quanto baixa fertilidade, foram separadas por quartis dentro de cada característica espermática obtida nas análises laboratoriais (Tabela 3) e foram comparadas as taxas de prenhez entre os valores contidos no quartil superior e no quartil inferior dentro de cada variável.

Em adição, somente as partidas que apresentaram alta fertilidade foram também separadas por quartis dentro de cada característica espermática obtida nas análises laboratoriais (Tabela 4) e foram comparadas as taxas de prenhez entre os valores contidos no maior e no menor quartis para cada variável.

Tabela 3 - Divisão por quartis realizada pelo SAS de cada característica espermática, para separação dos maiores e dos menores valores para cada variável de todas as partidas (alta + baixa fertilidade)

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS		QUARTIS – SAS	
Motilidade Total (%)	ACIMA	74,50	ABAIXO 65,20
Motilidade Progressiva (%)	ACIMA	58,10	ABAIXO 45,60
Concentração (X10 ⁶ /mL)	ACIMA	107,50	ABAIXO 38,75
Número Sptz ¹ /Palheta (X 10 ⁶)	ACIMA	26,90	ABAIXO 15,30
Número Sptz ¹ Móveis/Palheta (X 10 ⁶)	ACIMA	19,33	ABAIXO 10,33
Defeitos Maiores (%)	ACIMA	19,80	ABAIXO 9,30
Defeitos Menores (%)	ACIMA	5,80	ABAIXO 1,50
Defeitos Totais (%)	ACIMA	23,00	ABAIXO 12,00
PIAIA ² (%)	ACIMA	50,00	ABAIXO 32,50
PIAIA/Palheta (%)	ACIMA	12,40	ABAIXO 5,40
MPI ³ (%)	ACIMA	57,70	ABAIXO 43,30
AI ⁴ (%)	ACIMA	80,50	ABAIXO 65,80
AP ⁵ (%)	ACIMA	66,00	ABAIXO 45,00

Fonte: Santos (2016).

Legenda: ¹Sptz: espermatozoides. ²PIAIA: Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial; ³MPI: Espermatozoides com membrana plasmática intacta; ⁴AI: Espermatozoides com acrossoma Intacto; ⁵AP: Espermatozoides com alto potencial mitocondrial.

Tabela 4 - Divisão por quartis realizada pelo SAS para cada característica espermática, para separação dos maiores e dos menores valores de cada variável das partidas de alta fertilidade

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS		QUARTIS – SAS	
Motilidade Total (%)	ACIMA	75,00	ABAIXO 62,40
Motilidade Progressiva (%)	ACIMA	58,20	ABAIXO 40,90
Concentração (X10 ⁶ /mL)	ACIMA	95,00	ABAIXO 37,50
Número Sptz ¹ /Palheta (X 10 ⁶)	ACIMA	23,75	ABAIXO 15,00
Número Sptz ¹ Móveis/Palheta (X 10 ⁶)	ACIMA	14,56	ABAIXO 9,77
Defeitos Maiores (%)	ACIMA	19,00	ABAIXO 9,00
Defeitos Menores (%)	ACIMA	6,00	ABAIXO 2,00
Defeitos Totais (%)	ACIMA	23,00	ABAIXO 12,00
PIAIA ² (%)	ACIMA	48,00	ABAIXO 32,00
PIAIA/Palheta (%)	ACIMA	10,35	ABAIXO 5,00
MPI ³ (%)	ACIMA	55,00	ABAIXO 41,00
AI ⁴ (%)	ACIMA	80,00	ABAIXO 64,00
AP ⁵ (%)	ACIMA	66,00	ABAIXO 43,00

Fonte: Santos (2016).

Legenda: ¹Sptz: espermatozoides. ²PIAIA: Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial; ³MPI: Espermatozoides com membrana plasmática intacta; ⁴AI: Espermatozoides com acrossoma Intacto; ⁵AP: Espermatozoides com alto potencial mitocondrial.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados por meio do programa SAS System for Windows 9.3 (SAS, 2000).

Utilizando o aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 – Log10X; Raiz quadrada – RQ X; Quadrado – X²) e quando a normalidade não foi obtida, empregou-se, então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Os dados obtidos pelas análises convencionais, por CASA e por sondas fluorescentes foram submetidas à análise descritiva utilizando o PROC MEANS e distribuídas em classes (quartis). O primeiro quartil incluiu os 25% das partidas de sêmen com resultados superiores da variável em estudo (1º quartil). Na sequência, os quartis intermediários (2 e 3) compreenderam os 50% das partidas com resultados intermediários, e o 4º quartil englobou 25% das partidas com resultados inferiores.

Para cada análise de quartil as variáveis foram classificadas como SUPERIOR (1º quartil) ou INFERIOR (4º quartil) formando os grupos experimentais.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, e as diferenças entre médias estudadas pelo teste “T”.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais.

O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre os tratamentos.

6 RESULTADOS

Considerando as partidas de sêmen separadas em Alta e Baixa fertilidade, apesar de ter sido encontrada diferença significativa entre a taxa de prenhez ($p = 0,0006$); quando se considerou as avaliações convencionais não foram notadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) para nenhuma das características avaliadas (Tabela 5).

Tabela 5 - Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas analisadas pelo método convencional das partidas de sêmen bovino que apresentaram alta e baixa fertilidade a campo

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS	FERTILIDADE		PROBABILIDADE
	ALTA	BAIXA	
Taxa de Prenhez (%)	66,00 $\pm$ 2,00	45,00 $\pm$ 3,00	0,0006
Motilidade subjetiva (%)	60,00 $\pm$ 6,70	61,25 $\pm$ 3,75	0,90
Vigor (1-5)	2,87 $\pm$ 0,43	2,65 $\pm$ 0,24	0,63
Concentração (X 10 ⁶ /ml)	91,87 $\pm$ 18,04	114,40 $\pm$ 4,83	0,27
Número Sptz ¹ /Palheta (X 10 ⁶)	22,97 $\pm$ 4,51	28,59 $\pm$ 1,21	0,27
Número Sptz ¹ Móveis/Palheta (X 10 ⁶)	13,20 $\pm$ 2,45	17,38 $\pm$ 0,39	0,18
Defeitos Maiores (%)	24,13 $\pm$ 2,61	19,63 $\pm$ 1,16	0,17
Defeitos Menores (%)	0,87 $\pm$ 0,37	3,13 $\pm$ 0,85	>0,05
Defeitos Totais (%)	25,00 $\pm$ 2,48	22,75 $\pm$ 0,32	0,43

Fonte: Santos (2016).

Nota: Valores de $P < 0,05$ diferentes estatisticamente segundo teste "T".

Legenda: ¹Sptz: espermatozoides.

Quando se considerou as avaliações das membranas notou-se diferença entre os grupos de Alta e Baixa fertilidade somente para o número de espermatozoides PIAIA/Palheta ($p = 0,01$) e para a porcentagem de integridade de acrossoma ($p = 0,03$); no entanto, estes valores foram maiores para o sêmen de Baixa fertilidade (Tabela 6).

Tabela 6 - Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial avaliadas por sondas fluorescentes das partidas de sêmen de touros que apresentaram alta e baixa fertilidade a campo

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS	FERTILIDADE		PROBABILIDADE
	ALTA	BAIXA	
Taxa de Prenhez (%)	66,00 $\pm$ 2,00	45,00 $\pm$ 3,00	0,0006
PIAIA ¹ (%)	33,53 $\pm$ 10,30	54,93 $\pm$ 3,86	0,10
Número Sptz ² PIAIA ¹ /Palheta (X 10 ⁶)	7,56 $\pm$ 2,21	16,16 $\pm$ 0,69	0,01
MPI ³ (%)	41,00 $\pm$ 6,56	56,88 $\pm$ 3,48	0,07
AI ⁴ (%)	65,90 $\pm$ 3,30	78,75 $\pm$ 2,98	0,03
AP ⁵ (%)	61,25 $\pm$ 11,62	62,25 $\pm$ 4,31	0,94

Fonte: Santos (2016).

Nota: Valores de $P < 0,05$ diferentes estatisticamente segundo teste "T".

Legenda: ¹PIAIA: Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial; ²Sptz: espermatozoides; ³MPI: Espermatozoides com membrana plasmática intacta; ⁴AI: Espermatozoides com acrossoma Intacto; ⁵AP: Espermatozoides com alto potencial mitocondrial.

Quando foram comparadas as características de movimento espermático pelo CASA para as partidas de Alta e Baixa fertilidade, encontrou-se maior motilidade progressiva ($P < 0,0001$) e porcentagem de espermatozoides rápidos ($P < 0,0001$) para o sêmen de Baixa fertilidade, sendo que nenhuma outra característica foi estatisticamente diferente (Tabela 7).

Tabela 7 - Média $\pm$ erro padrão das características do movimento espermático avaliados pelo sistema CASA utilizando o programa Sperm Class Analyser (SCA) das partidas de sêmen bovino que apresentaram alta e baixa fertilidade a campo

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS	FERTILIDADE		PROBABILIDADE
	ALTA	BAIXA	
Taxa de Prenhez (%)	66,00 $\pm$ 2,00	45,00 $\pm$ 3,00	0,0006
Motilidade Total (%)	56,95 $\pm$ 6,54	72,18 $\pm$ 0,76	0,10
Motilidade Progressiva (%)	34,85 $\pm$ 0,85	50,45 $\pm$ 1,44	<0,0001
Rápidos (%)	60,00 $\pm$ 0,70	65,07 $\pm$ 0,26	<0,0001
VCL ¹ (μ m/s)	161,10 $\pm$ 24,70	168,10 $\pm$ 5,23	0,80
VSL ² (μ m/s)	74,88 $\pm$ 9,92	78,37 $\pm$ 2,82	0,75
VAP ³ (μ m/s)	99,90 $\pm$ 9,29	98,42 $\pm$ 2,14	0,88
LIN ⁴ (%)	49,67 $\pm$ 9,76	46,67 $\pm$ 1,68	0,78
STR ⁵ (%)	74,06 $\pm$ 4,82	79,60 $\pm$ 1,46	0,31
BCF ⁶ (Hz)	14,34 $\pm$ 3,30	21,20 $\pm$ 0,22	0,13

Fonte: Santos (2016).

Nota: Valores de $P < 0,05$ diferentes estatisticamente segundo teste "T".

Legenda: ¹VCL: Velocidade curvilínea; ²VSL: Velocidade progressiva; ³VAP: Velocidade de trajeto; ⁴LIN: Linearidade; ⁵STR: Retilinearidade; ⁶BFC: Frequência de batimento.

Ao separar em quartis Superior e Inferior, as partidas de sêmen que apresentaram tanto Alta e quanto Baixa fertilidade, verificou-se diferença estatística ($p > 0,05$) para as características de concentração, número de espermatozoides por palheta, motilidade total, motilidade progressiva, número de espermatozoides móveis por palheta, porcentagem de espermatozoides móveis e normais, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais, porcentagem de PIAIA, número de espermatozoides PIAIA por palheta, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e alto potencial de membrana mitocondrial; entretanto, foi notada diferença na taxa de prenhez apenas para motilidade total ($p = 0,02$), motilidade progressiva ($p = 0,02$) e integridade de acrossoma, sendo a fertilidade maior para as partidas encontradas nos quartis inferiores (Tabela 8).

Quando a separação por quartis Superior e Inferior foi realizada somente com as partidas de sêmen de Alta fertilidade, também se verificou diferença estatística ($p > 0,05$) para as características de concentração, número de espermatozoides por palheta, motilidade total, motilidade progressiva, número de espermatozoides móveis por palheta, porcentagem de espermatozoides móveis e normais, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais, porcentagem de PIAIA, número de espermatozoides PIAIA por palheta, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e alto potencial de membrana mitocondrial; sendo notada diferença na taxa de prenhez apenas para motilidade total ($p = 0,05$) e motilidade progressiva ($p = 0,01$), notando maior fertilidade para as partidas encontradas nos quartis inferiores (Tabela 9).

Tabela 8 - Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de partidas de sêmen que apresentaram Alta e Baixa fertilidade e foram separadas por quartis superior e inferior e seu efeito sobre a fertilidade

(continua)

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS	QUARTIS		PROBABILIDADE
	SUPERIOR	INFERIOR	
Concentração ($\times 10^6/\text{mL}$)	122,70 $\pm$ 5,03	30,64 $\pm$ 2,29	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	53,11 $\pm$ 3,38	55,29 $\pm$ 1,23	0,56
Número spztz/Palheta ($\times 10^6$)	31,25 $\pm$ 1,27	12,93 $\pm$ 1,47	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	53,88 $\pm$ 3,73	56,43 $\pm$ 0,78	0,52
Motilidade Total (%)	79,37 $\pm$ 1,63	51,26 $\pm$ 3,51	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	52,29 $\pm$ 1,60	59,86 $\pm$ 2,22	0,02
Motilidade Progressiva (%)	60,27 $\pm$ 0,61	33,37 $\pm$ 3,20	0,0001
Taxa de Prenhez (%)	53,14 $\pm$ 1,87	61,43 $\pm$ 2,53	0,02
Número Sptz ¹ Móveis/Palheta ($\times 10^6$)	18,54 $\pm$ 0,45	8,17 $\pm$ 0,80	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	55,29 $\pm$ 4,56	59,57 $\pm$ 2,06	0,41
Sptz ¹ Móveis e Normais (%)	15,32 $\pm$ 0,99	6,36 $\pm$ 0,79	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	55,29 $\pm$ 4,56	59,57 $\pm$ 2,06	0,81
Defeitos Maiores (%)	15,41 $\pm$ 0,71	6,63 $\pm$ 0,71	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	57,00 $\pm$ 4,04	58,00 $\pm$ 2,29	0,41
Defeitos Menores (%)	10,00 $\pm$ 2,63	0,81 $\pm$ 0,23	0,01
Taxa de Prenhez (%)	56,00 $\pm$ 1,51	59,63 $\pm$ 2,74	0,29
Defeitos Totais (%)	26,69 $\pm$ 1,86	10,63 $\pm$ 0,46	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	56,38 $\pm$ 3,68	57,25 $\pm$ 2,12	0,17
PIAIA ² (%)	56,31 $\pm$ 1,28	24,83 $\pm$ 3,27	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	54,57 $\pm$ 4,70	57,00 $\pm$ 1,66	0,64
Número Sptz ¹ PIAIA ² /Palheta ($\times 10^6$)	15,98 $\pm$ 0,95	3,22 $\pm$ 0,63	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	50,71 $\pm$ 3,90	57,43 $\pm$ 1,60	0,15
MPI ³ (%)	62,00 $\pm$ 1,39	36,43 $\pm$ 1,89	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	52,00 $\pm$ 3,98	56,86 $\pm$ 1,91	0,29
AI ⁴ (%)	83,25 $\pm$ 1,22	56,71 $\pm$ 2,94	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	51,13 $\pm$ 2,34	57,71 $\pm$ 1,96	0,05
AP ⁵ (%)	73,81 $\pm$ 3,56	39,71 $\pm$ 1,18	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	54,00 $\pm$ 2,48	60,43 $\pm$ 2,59	0,10

Fonte: Santos (2016).

Nota: Valores de $P < 0,05$ diferentes estatisticamente segundo teste "T".

Legenda: 1Sptz: espermatozoides; 2PIAIA: Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial; 3MPI: Espermatozoides com membrana plasmática intacta; 4AI: Espermatozoides com acrossoma Intacto; 5AP: Espermatozoides com alto potencial mitocondrial.

Tabela 9 - Média $\pm$ erro padrão das características espermáticas de partidas de sêmen que apresentaram alta fertilidade e foram separadas por quartis superior e inferior e seu efeito sobre a fertilidade

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS	QUARTIS		PROBABILIDADE
	SUPERIOR	INFERIOR	
Concentração (X 10 ⁶ /mL)	124,10 $\pm$ 7,94	29,5 $\pm$ 2,35	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	0,59 $\pm$ 2,91	55,50 $\pm$ 1,43	0,24
Número sptz/Palheta (X 10 ⁶)	31,03 $\pm$ 1,97	12,93 $\pm$ 1,47	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	59,50 $\pm$ 2,91	56,43 $\pm$ 0,78	0,35
Motilidade Total (%)	80,17 $\pm$ 1,68	49,22 $\pm$ 3,38	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	52,00 $\pm$ 1,86	59,00 $\pm$ 2,42	0,05
Motilidade Progressiva (%)	60,27 $\pm$ 0,61	31,38 $\pm$ 2,97	0,0001
Taxa de Prenhez (%)	53,14 $\pm$ 1,87	62,5 $\pm$ 2,72	0,01
Número Sptz ¹ Móveis/Palheta (X 10 ⁶)	18,11 $\pm$ 0,82	7,83 $\pm$ 0,86	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	60,67 $\pm$ 0,03	58,00 $\pm$ 01,57	0,48
Sptz ¹ Móveis e Normais (%)	15,32 $\pm$ 0,99	6,36 $\pm$ 0,79	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	59,50 $\pm$ 3,49	60,50 $\pm$ 0,02	0,81
Defeitos Maiores (%)	23,42 $\pm$ 1,70	5,92 $\pm$ 0,01	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	60,67 $\pm$ 2,44	58 67 $\pm$ 2,59	0,59
Defeitos Menores (%)	10,00 $\pm$ 2,63	0,01 $\pm$ 0,01	0,01
Taxa de Prenhez (%)	56,00 $\pm$ 1,51	61,00 $\pm$ 2,74	0,14
Defeitos Totais (%)	27,83 $\pm$ 2,33	10,17 $\pm$ 0,00	0,005
Taxa de Prenhez (%)	60,67 $\pm$ 2,79	58,17 $\pm$ 2,77	0,54
PIAIA ² (%)	13,48 $\pm$ 1,45	2,90 $\pm$ 0,64	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	63,33 $\pm$ 2,93	58,00 $\pm$ 0,02	0,16
Número Sptz ¹ PIAIA ² /Palheta (X 10 ⁶)	13,48 $\pm$ 1,45	2,90 $\pm$ 0,64	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	0,61 $\pm$ 0,03	57,00 $\pm$ 0,02	0,40
MPI ³ (%)	60,00 $\pm$ 0,02	35,58 $\pm$ 2,00	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	59,14 $\pm$ 2,87	57,67 $\pm$ 2,04	0,69
AI ⁴ (%)	83,33 $\pm$ 1,65	56,71 $\pm$ 2,94	<0,0001
Taxa de Prenhez (%)	54,17 $\pm$ 1,19	57,71 $\pm$ 1,96	0,17
AP ⁵ (%)	76,00 $\pm$ 4,43	39,00 $\pm$ 0,01	0,0003
Taxa de Prenhez (%)	56,500 $\pm$ 2,54	61,50 $\pm$ 2,79	0,21

Fonte: Santos (2016).

Nota: Valores de P < 0,05 diferentes estatisticamente segundo teste "T".

Legenda: ¹Sptz: espermatozoides; ²PIAIA: Espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial; ³MPI: Espermatozoides com membrana plasmática intacta; ⁴AI: Espermatozoides com acrossoma Intacto; ⁵AP: Espermatozoides com alto potencial mitocondrial.

7 DISCUSSÃO

Este estudo buscava compreender se as diferenças existentes na fertilidade a campo de partidas de sêmen bovino poderiam ser explicadas pela qualidade espermática avaliada previamente antes do uso na IATF.

A primeira triagem realizada antes de iniciar a estação de monta identificou que 23,6% (17/72) das partidas analisadas apresentavam algumas características dentro das avaliações convencionais que deixavam dúvidas sobre seu potencial de fertilidade, por isso foram excluídas do uso na IATF. Evidenciou-se que partidas de um mesmo touro apresentou características de qualidade espermática diferentes. De forma semelhante, Nogueira et al. (1999) compararam partidas de touros de corte comercializadas por centrais brasileiras de coleta e processamento do sêmen de acordo com os parâmetros sugeridos pelo CBRA (2013), e notaram que as partidas do sêmen analisadas apresentavam características de qualidade diferentes, e que nem todas apresentavam os padrões sugeridos pelo CBRA. Em um estudo subsequente, Nogueira et al. (2011) compararam diferentes partidas de sêmen obtendo índices de prenhez variando de 40,9% a 61,9%.

Vicent et al. (2012) no Canadá analisaram partidas de sêmen de touros de leite, e também notaram que as partidas distribuídas pelas centrais apresentavam características seminais distintas quando analisadas pelos métodos convencionais e por CASA e citometria de fluxo, mesmo sendo do mesmo touro. Os autores perceberam que 41,6% das partidas produzidas por centrais de processamento do sêmen, no Canadá, eram rejeitadas pelas análises convencionais, incluindo as análises realizadas na própria central, ou seja, estas partidas não eram liberadas para o comércio.

No estudo em epígrafe somente 28 partidas, das 55 selecionadas nas avaliações convencionais, foram submetidas à IATF e 82% (23/28) das partidas utilizadas apresentaram resultados superiores a 50% de taxa de prenhez sendo consideradas como de alta fertilidade. Estes resultados nos faz refletir que somente as análises convencionais já sejam suficientes para garantir a seleção da maior parte das partidas de sêmen com bom potencial de fertilidade, mas que algumas partidas aprovadas por estas avaliações, neste caso 18% delas, podem resultar em

percentual de fertilidade reduzido, sendo o motivo de sua falha não detectado por estas análises.

As características espermáticas somente das partidas consideradas como de alta fertilidade (>50% de taxa de prenhez) apresentaram diferença entre elas para as características analisadas pelo método convencional e por sondas fluorescentes sem impactar na fertilidade. As análises de motilidade total e motilidade progressiva realizadas pelo programa Sperm Class Analyser (SCA) apresentaram diferença entre os quartis impactando na fertilidade. Porém, os resultados obtidos mostram que a motilidade total e a motilidade progressiva para ambos os quartis superior e inferior são suficientes para garantir boa fertilidade, sendo neste estudo o quartil inferior apresentando melhor fertilidade. Siqueira et al. (2007) também observaram correlação negativa e de média intensidade entre motilidade progressiva realizada pelo *computer-assisted semen analysis* (Hamilton Thorne) pós-descongelamento do sêmen e a taxa de fertilidade ($r=-0,22$).

O motivo de não ser observada diferença na fertilidade destas partidas avaliadas pode ser a triagem inicial realizada antes destas partidas serem submetidas a estação de monta, ter se mostrado eficiente para garantir a fertilidade. Pois, estas partidas selecionadas após apresentar os padrões desejáveis de característica espermática avaliados pelo método convencional, também apresentaram integridade das membranas e motilidade avaliados por sondas fluorescentes e pelo CASA condizentes com o potencial de fertilidade.

Somente seis partidas apresentaram fertilidade igual ou inferior a 50% sendo consideradas como de baixa fertilidade. Para efeito de comparação entre estas partidas com as que apresentaram alta fertilidade, foram comparadas quatro partidas que apresentaram as maiores taxas de fertilidade (Média= 66%) com as quatro partidas que apresentaram as menores taxas de fertilidade (Média= 45%).

As partidas de baixa fertilidade foram aprovadas pelas análises convencionais para todas as características avaliadas, sem apresentar impacto negativo na fertilidade.

Correa et al. (1997) realizaram um estudo para comparar o sêmen de touros da raça holandesa de Alta e Baixa fertilidade, notando valores médios semelhantes para os parâmetros avaliados, como: concentração, motilidade, morfologia, *status*

acrossomal, e cauda enrolada, porém a fertilidade entre os grupos foi diferente ($p < 0,01$).

Para as análises de membranas somente porcentagem de acrossoma intacto e PIAIA/Palheta diferiram entre os grupos, de forma que o grupo de baixa fertilidade apresentou maior porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto. Como PIAIA/Palheta é uma variável dependente de acrossoma intacto, o motivo de ter apresentado diferença entre os grupos pode ser este.

Apesar do grupo de alta fertilidade apresentar menos espermatozoides com acrossoma intacto que o grupo de alta fertilidade, a porcentagem média de espermatozoides com acrossoma intacto apresenta-se alta (65,9%), não sendo este o fator apontado para diminuição na fertilidade. Oliveira et al. (2014) encontraram valores inferiores (47% de Acrossoma Intacto) que não interferiram na fertilidade. Sellem et al. (2015) em citometria de fluxo avaliando diferentes tempos de incubação mesmo no tempo “0”, ou seja, logo após a descongelação do sêmen apresentou valores em torno de 45% de membrana acrossomal intacta.

Quando avaliada a cinética espermática pelo sistema CASA (SCA) entre os grupos, apenas motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos apresentaram diferença entre os grupos, de forma que o grupo considerado como de baixa fertilidade apresentou os maiores valores médios.

Porém, o grupo de alta fertilidade mesmo apresentando valores menores, os resultados ainda apresentam-se acima de 30% o que é aceitável e recomendado para partidas de sêmen pós-descongelação.

Também buscando a comparação e explicação para as partidas que apresentaram baixa fertilidade foram separadas todas as partidas por quartis de cada característica espermática. Foi notado efeito positivo sob a fertilidade para os grupos de quartis inferior para as características de motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides com acrossomo intacto. Porém, para o grupo de quartis inferior a motilidade total apresentou-se acima de 50% e motilidade progressiva acima de 30%. Notou-se que espermatozoides com acrossoma intacto apresentou valores acima de 50% para o grupo do quartil inferior, sendo nítido, conforme discutido anteriormente que estes valores não poderiam impactar negativamente na fertilidade.

Barnabe et al. (1981) notaram que quanto maior os índices de motilidade progressiva das amostras analisadas maior a incidência de acrossomas normais.

Kastelic e Thundathil (2008) descrevem que vários fatores podem interferir na fertilidade de um ejaculado, como: viabilidade das membranas, motilidade espermática, capacitação espermática, interação entre espermatozoide e tuba uterina, interação entre espermatozoide e zona pelúcida, fusão do espermatozoide e oolema e descondensação do DNA espermático. Sendo necessário o acesso a mais testes que permitam estudar estas interações entre o espermatozoide e oócito, e os fatores relacionados à pré implantação. Citam ainda, que vários testes são realizados para abordar estas interações, porém são realizados *in vitro*, obtendo correlações aos testes de fertilidade realizados *in vivo*. Mas somente um teste não é capaz de predizer a fertilidade, sendo necessário realizar vários testes e abordar em conjunto os resultados para garantir boa fertilidade.

8 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

1. As análises convencionais do sêmen (motilidade, vigor, concentração, morfologia espermática) são, na maioria das vezes, suficientes para assegurar boa taxa de prenhez no campo.
2. A inclusão das técnicas de avaliação das partidas de sêmen com CASA e sondas fluorescentes nem sempre pode trazer um incremento para a predição da fertilidade a campo.
3. Quando a fertilidade obtida no campo é alta (acima de 50% de prenhez), as diferenças nas características espermáticas das partidas de sêmen não explicam diferenças na fertilidade.
4. Em partidas de sêmen que apresentam taxa de fertilidade distinta, as características espermáticas obtidas por avaliações convencionais, pelo CASA e por sondas fluorescentes não diferem, destacando que são necessários o desenvolvimento e a realização de testes mais acurados para garantir o potencial de fertilidade do sêmen.

REFERÊNCIAS

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principle of cryopreservation and a review of criopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-174, 1987.

ANDRADE, A. F. C. **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozóides criopreservados de equinos**. 2009. 132 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ANUALPEC. Anuário estatístico da pecuária de corte. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio Ltda., 2015.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitochondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinae**, v. 31, p. 230-231, 2003. Supplement.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Methods of the assessment of morphology and function of sperm: actual moment and future challenges. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 145-151, 2011.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. C.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, p. 47-60, 2015.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos dos diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, Citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ASHIZAWA, K.; WISHART, G. J.; RANASINGHE, A. R.; KATAYAMA, S.; TSUZUKI, Y. Protein phosphatase-type 2B is involved in the regulation of the acrossome reaction but not in the temperature-dependent flagellar movement of fowl spermatozoa. **Reproduction**, v. 128, n. 6, p. 783-787, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). São Paulo: ASBIA, 2014. (Relatório Anual).

BAKER, H. W. G.; CLARKE, G. N. Sperm morphology: consistency of assessment of the same sperm by different observers. **Clinical Reproduction and Fertility**, v. 5, p. 37-43, 1987.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A. C. M. A importância do exame andrológico em bovinos. **EMBRAPA - Circular técnica**, v. 41, p. 1-13, 2005.

BARNABÉ, R. C.; BARNABE, V. H.; VIANA, W. G.; VISINTIN, J. A.; CASAGRANDE, J. F.; ALMEIDA, C. A. de. Correlações entre a motilidade progressiva e retenção do acrossomo em sêmen congelado de bovinos após o descongelamento e após provas de termo resistência. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.18, n. 1, p.61-68, 1981.

BARROS, C. M.; BRENO, R. L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. **Acta Scientiae Veterinariae (Suplemento)**, v. 18, p. 23-44, 2004.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BAVISTER, D.; LORRAINE, M. Development of preimplantation in a defined embryos of the golden culture medium. **Biological Trace Element Research**, v. 28, p. 235-247, 1983.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 25, p. 383-339, 1973.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Portaria n° 109, de 25 de maio de 2009. Institui Grupo de Trabalho no âmbito do Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários - DFIP/SDA, com a finalidade de atualizar o Manual de Procedimentos para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 maio 2009. Seq. 1, p.5.

BURNESS, G.; CASSELMAN, S. J.; SCHULTE-HOSTEDDE, A. I.; MOYES, C. D.; MONTGOMERIE, R. Sperm swimming speed and energetic vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 56, p. 65-70, 2004.

CASAGRANDE, J. F.; PINHEIRO, L. E. L.; FERRAZ, J. B. S.; ALMEIDA, C. A. A influência da motilidade e da velocidade espermática sobre a fertilidade do sêmen. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 3, n. 2, p. 31-5, 1980.

CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R.; YUDIN, A. I.; LIU, I. K. M.; DROBINS, E. Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v.14, p. 289-297, 1993.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina**

utilizando sondas fluorescentes. 2005. 190 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 536–543, 2010.

CENTOLA, G. M. Comparison of manual microscopic and computer - assisted methods for analysis of sperm count and motility. **Archives of Andrology**, v. 36, p. 1-7, 1996.

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

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, p. 721-731, 1997.

CRESPILHO, A. M. **Avaliação de diferentes metodologias de preservação do semen bovino para a utilização em programas de inseminação artificial em tempo-fixo (IATF)**. 2010. 97 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010.

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

DEN DAAS, J. H.; DE JONG, G.; LANBERGEN, L. M.; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p.1714-23, 1998.

DUNPHY, B. C.; KAY, R.; BARRAT, C. L. R.; COOKE, I. D. Quality control during the convencional analisys of semen, an assential exercise. **Journal of Andrology**, v. 10, p. 378-385, 1989.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoom. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction**. New York: Rven Press, 1994. cap. 2, p. 29-77.

FARREL, P. B.; PRESICCE, G. A.; BROCKETT, C. C.; FOOTE, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, p. 871-879, 1998.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J. J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 1992. p. 30-31.

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**, (Berlin), v. 44, p. 154-159, 2012.

FOULKES, L. A.; STEWART, D. L. Artificial insemination of cattle using varying numbers of spermatozoa. **Veterinary Record**, v. 101, p. 205, 1977.

FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p.160-170, 2011.

FUERST-WALTL, B.; SCHWARZENBACHER, H.; PERNER, C.; SOLKNER, J. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 27-37, 2006.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 249-65, 2001.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; GRAVANCE, C. G.; MARSHALL, C. E.; DEJARNETTE, J. M.; ALLEN, C. H. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, v. 56, p. 31-40, 2001.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

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

HAUGLAND, T.; RUDOLFSSEN, G.; FIGENSCHOU, L.; FOLSTADE, I. Sperm velocity and its relation to social status in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Animal Reproduction Science**, v. 115, p. 231-237, 2009.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000a.

HOWARD, T. W.; PACE, M. M. Seminal evaluations and artificial insemination. In: LAING, J. A.; BRINLEY MORGAN, W. J.; WAGNER, W. C. **Fertility and Infertility in Veterinary Practise**. 4. ed. London: Bailliere Tindall, 1988. p. 39-51.

JANUSKAUKAS, A.; JOHANNISON, 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. 155, p. 947–981, 2001.

JANUSKAUKAS, A.; JOHANNISON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull sêmen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction**, v. 60-61, p. 93-107, 2000.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and analisys for predicting bull fertility. **Reproduction Domestic Animals**, v. 43, p. 268-373, 2008. Supplement 2.

KJAEESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K. A. Evaluatin of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 34, p. 299- 303, 1993.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 1-10, 1998.

LEITE, T. G. **Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de 126 integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro**. 2008. 121 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2008..

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of ther sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, p. 246-256, 1996.

MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V. A IATF como uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiania. [**Anais...**]. Goiana: CBRA, 2005. v. 16, p.1-8.

MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen a review. **Theriogenology**, v. 48, p. 523-530, 1997.

MATOS, D. L.; ARAUJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozóides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 225-232, 2008.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 8, p. 1165-1178, 1997.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVERIA, A.T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-44, 2002.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-sertoli cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747-806, 2004.

NOGUEIRA, E.; MACIEL, A. S.; COSTA E SILVA, E. V.; FERNANDES, G. M. Perfil do sêmen bovino congelado utilizado no Mato Grosso do Sul- comparação de amostras de animais zebu (*Bos taurus indicus*) e europeus (*Bos taurus taurus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 270-271, 1999.

NOGUEIRA, E.; SILVA, A. S.; MARQUES JÚNIOR, H. R.; NOGUEIRA, R. J.; BORGES, J. C. Taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF no Planalto Boliviano. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 101). Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/CT101.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2011.

OLIVEIRA, B.M.M.; ARRUDA, R.P.; THOMÉ, H.E.; MATURANA FILHO, M.; OLIVEIRA, G.C.; GUIMARÃES, C.F.; NICHII, M.; SILVA, L.A.; CELEGHINI, E.C.C. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology**, v. 82, n. 5, p. 767-772, 2014.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructures studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v.122, p. 105-151, 1990.

PAPAIIOANNOU, K. Z.; MURPHY, R. P.; MONKS, R. S.; HYNES, N.; RYAN, M. P.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 48, p. 299-312, 1997.

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

PARKS, J. E. Hypothermia and Mammalian gametes, In: KAROW, A. M.; CRITSER, J. K. (Ed.). **Reproductive tissue banking: scientific principles**. San Diego: Academic, 1997. p. 229-261.

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M. ; SANTOS, J. E. P.; PERRY, G. A.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin- based protocols sukled Bos indicus cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 23-30, 2010.

SALVADOR, D. F. **Perfis andrológicos, de comportamento sexual e desempenho reprodutivo de touros Nelore desafiados com fêmeas em estro sincronizado**. 2001. 53 p. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinae**, v. 32, p. 35-50, 2004. Supplement.

SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E. P. C. Use of combination of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, v. 84, p. 1447-1454, 2015.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. B.; COSTA, E. P.; HENRY, M.; TORRES, A. A.; SILVA, M. V. G. B.; SILVEIRA, T. S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 387-395, 2007.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**. [S.l.]: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, 1999. (Bulletin n. 9).

STEWART, D. L.; BENNETT, G. H. The minimum number of spermatozoa per frozen semen insemination compatible with normal fertility in cattle. In: CONGRESSO INTERNATIONAL REPRODUCTION ANIMAL E INSEMINATION ARTIFICIAL, 2., 1968, Paris. **Proceedings ...** Paris, 1968. p. 1167-68.

TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, p. 1245–1252, 2004.

THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 786-793, 1998.

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

VINCENT, P.; UNDERWOODI, S. L.; DOLBECL, C.; BOUCHARDI, N.; KROETSCH, T.; BLONDIN, P. Bovine semen quality control in artificial insemination centers, **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 153-165, 2012.

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