GUILHERME MACHADO ZANATTA

Produção embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade

SÃO PAULO
2019

GUILHERME MACHADO ZANATTA

Produção embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade

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

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

Orientador

SÃO PAULO

2019

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. 3857
FMVZ

Zanatta, Guilherme Machado
Produção embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade / Guilherme
Machado Zanatta. – 2019.
67 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Fertilidade. 2. Touros. 3. IATF. 4. Embriões. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Produção embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade", protocolada sob o CEUA nº 6809180219 (ID 006876), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli e equipe; Guilherme Machado Zanatta** - 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 **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/08/2019.

We certify that the proposal "Embryo production using high and low fertility bulls", utilizing 1140 Bovines (1140 females), protocol number CEUA 6809180219 (ID 006876), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; Guilherme Machado Zanatta** - 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 School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/14/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2019** a **04/2019**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **4 a 7 anos**

N: **1140**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **450 a 550 kg**

Local do experimento: Os experimentos vão ser realizados em fazendas comerciais.

São Paulo, 20 de agosto de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 25 de setembro de 2019
CEUA N 6809180219

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Pietro Sampaio Baruselli
Área: Reprodução Animal

Título da proposta: "Produção embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 005150)

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 05/setembro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Inicialmente o projeto previa avaliar os embriões produzidos através inseminação artificial em tempo fixo (IATF), utilizando sêmen de seis touros de diferente fertilidade (alta e baixa fertilidade). Existem trabalhos nesta área que utilizam touros com diferentes taxas de fertilidade, no entanto, é inédita a avaliação dos embriões obtidos in vivo com única ovulação. De acordo com sugestões de outros pesquisadores, decidiu-se realizar outros dois experimentos testando os touros com diferentes biotécnicas da reprodução: 1. produção in vitro de embriões (PIVE). Neste experimento não serão utilizados animais, somente ovários obtidos de abatedouros. A nota fiscal de compra dos ovários será apresentada no relatório. Ao utilizar o sêmen para a PIVE, o sêmen será analisado por citometria de fluxo e Análise Computadorizada de Semen (CASA); 2. produção in vivo de embriões, utilizando superovulação das fêmeas. Neste estudo serão utilizados os embriões coletados no experimento já aprovado pela CEUA (Nº: 7946101018), realizado pela mestranda Flávia Elliff que utilizou os embriões somente para a comparação protocolos de superovulação. Como serão utilizados os mesmos seis touros do projeto inicial, a avaliação dos embriões será utilizada neste projeto. Reitero que não serão utilizados animais para este experimento. Desta maneira, será possível comparar o desempenho dos mesmos touros em diferentes sistemas de produção de embrião."

Comentário da CEUA: "Ao experimento foram adicionados dois estudo que envolvem amostra biológica (sêmen e ovários) e embriões, sendo estes oriundos de protocolo já aprovado por esta CEUA. "

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ZANATTA, Guilherme Machado

Título: Produção embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade

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: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Airton e Ana Cristina. Meus irmãos Bernardo (NADO), Rafael (NEGÃO) e Ana Carolina (NECA), por todo apoio dado desde sempre. Tenho certeza que isto sempre continuará.

Aos meus avós, João Hipólito e Luiza, sempre muito preocupados com o meu caminho, mas sempre com confiança nas minhas escolhas.

À Vó Odylla, (*in memorian*), uma pessoa de um coração muito bom, que viveu quase um século, uma vida intensa e com muita alegria. Sempre rodeada de filhos, netos e bisnetos. Nos deixou este ano.

Ao tio Luis Hipólito, uma pessoaimpa. Sempre muito prestativo e nos fazendo ter historia que jamais serão esquecidas, pelo contrario, diariamente são lembradas histórias do Tio Mario (como é conhecido).

Ao sobrinho e afilhado Eduardo, uma criança extremamente agitado (dizem que eu sou o culpado por isso, que é a veia do padrinho) e muito carismático.

À Júlia Farret, que chegou na família e agregou muito.

À Duda, pelos diálogos sobre vaca e pecuária.

Ao Prof. Pietro Baruselli, pelas oportunidades (que foram e são muitas) e ensinamentos durante estes três anos que estive junto à equipe. Aprendi muito mais do que conteúdo, aprendi muito em como lidar com uma equipe e pessoas.

À Prof. Mayra, a quem eu não tenho palavras para agradecer. “Vestiu a camiseta” do projeto, me ensinou muito mais do que coletar embrião. Uma grande parceira, sem seu esforço a realização do projeto seria muito mais difícil. Acompanhou todo o projeto com total dedicação.

Ao Manoel de Sá Filho, por ter acreditado em mim, ter me aproximado do Prof. Pietro e por ter me orientado no primeiro projeto. Foi o “ponta pé” inicial para o desenvolvimento do mestrado.

Ao Gabriel Crepaldi, pelo apoio nas discussões e no projeto, sempre foi muito parceiro.

Ao Badá (Rodolfo Mingoti), que desde o inicio foi um grande amigo, orientou e ajudou muito.

À flávia, uma grande amiga a quem sou muito grato por toda parceria de sempre. À Alessandra, amiga desde “lá do Rio Grande” que reencontrei em São Paulo. As duas foram incansáveis na luta da busca de um único embrião. Adiam

seus compromissos para poder ir nos dias de coleta, sem a dedicação e companheirismo de vocês, este projeto seria mil vezes mais complicado.

Ao Marcos Henrique (Marcão) e Walter (TUBA), além de serem grandes amigos, foi com eles que dividi moradia durante a pós-graduação.

Aos amigos que fiz durante o mestrado: Rômulo, Bernardo, Laísa, Ortolan, Damiana, Bruna, Emiliana e Augustinho.

À Pallú e a Laís, duas colegas que se tornaram grandes amigas. Duas pessoas muito profissionais e competentes.

À Marina Passarelli, uma pessoa e profissional única. Quem eu tive o prazer de conhecer e conviver. Sempre me apoiando, me aconselhando, me ajudando. Quem me mostrou o valor do carinho, da bondade. Não tenho palavras para te agradecer. Serei sempre muito grato por saber que sempre poderei contar contigo!!

Aos amigos do RS: Lucas, Bruna, Felipe, Jordana, Fernando e Marcelo. Sempre companheiros, parceiros e incentivadores.

Ao Felipe (Bola), José Antônio, Valéria e Juliana que me receberam em São Paulo e me fizeram sentir em casa. Sempre de portas abertas para me receber nessa grande cidade. Outras pessoas que sempre me incentivaram.

À Harumi, por todo apoio e esclarecimentos.

Ao Prof. Felipe Perecin que apesar de achar o projeto meio “maluco”, sempre acreditou e apoiou, colocando à disposição sua equipe e equipamentos.

Ao Prof. Marcílio, por todas as discussões sobre o tema e por auxiliar nas análises do sêmen.

Ao Prof. Guilherme (tocaio = xará, no gauchês), pelos ensinamentos e incentivo.

Aos professores do Departamento – VRA, Prof. Cláudia, Prof. Camila, Prof. Carla, Prof. Marcelo, Prof. Visintin.

Ao Prof. Álvaro García Guerra, que me recebeu nos EUA e depositou uma grande confiança em mim. Muito grato pela oportunidade.

À todas as empresas que contribuíram para o desenvolvimento dos projetos, com materiais, tempo e ajuda (Alta Genetics, ST Repro, Firmasa, Progênie, Biodux, WTA).

À todas as fazendas que disponibilizaram seu tempo, equipe e animais para que estes projetos fosse realizados. Somos muito gratos por abrirem a porteira e permitir o desenvolvimento da ciência.

À Fazenda Mater – Seu Gérson, Rafaela, Renato e equipe, muito obrigado por me permitir finalizar o projeto. Um exemplo de fazenda a ser seguido.

A todo pessoal do Laboratório de Biotecnologia do Espermatozoide e ao Laboratório de Andrologia, pela realização das PIVE e análise do sêmen.

À Camila Mota, pela ajuda no preparo dos materiais, PIVE e principalmente, na CEUA!!!

À equipe dos EUA: Ben, Shaun, Amanda e Éber – que me receberam muito bem, tiveram paciência em me entender e pela oportunidade em trabalhar em outro país, com uma cultura diferente.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela excelente oportunidade de obter conhecimento em uma renomada instituição.

RESUMO

ZANATTA, G. M. **Produção embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade.** [Embryo production using high and low fertility bulls]. 2019. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O presente estudo objetivou compreender a diferença da fertilidade de touros em programas de inseminação artificial. Para isto, foram realizados quatro experimentos para avaliar a fertilização e qualidade embrionária na IA, SOV e PIVE de touros de alta e baixa fertilidade. No experimento 1, foram utilizados três touros de alta fertilidade e três touros de baixa fertilidade (Concept Plus, Alta Genetics) para avaliar diferentes momentos da IATF (48h e 54h após a retirada do dispositivo de P4). Um total de 522 vacas da raça Nelore receberam um protocolo de sincronização a base de P4+E2, com CE como indutor de ovulação. No momento da primeira IATF (48h após a retirada do dispositivo de P4) metade das vacas foram inseminadas (Grupo 48h) e a outra metade foi inseminada seis horas mais tarde (Grupo 54h), com os seis touros nos dois momentos. O diagnóstico de gestação por ultrassonografia foi realizado 30 dias após a IATF. Os dados foram analisados pelo procedimento GLIMIX do SAS. Foi verificado efeito da fertilidade do touro [Alta = 49,2% (128/260) vs Baixa = 35,9% (94/262); $P=0,002$] na taxa de prenhez à IATF. Entretanto, não foi verificado efeito do momento da IATF [G48h = 41,4% (109/263) vs G54h = 43,6% (113/259); $P=0,66$], bem como interação fertilidade*momento ($P=0,55$) sobre a taxa de prenhez à IATF. Nos experimentos 2A, 2B e 2C, objetivou-se avaliar a taxa de prenhez à IATF e a qualidade embrionária na IATF, SOV e PIVE de touros de alta e baixa fertilidade. Foram utilizados três touros de alta e três touros de baixa fertilidade (ST Repro). A mesma partida de cada touro foi utilizada em todas as biotecnologias. No experimento 2A, foram sincronizadas 562 vacas com o mesmo protocolo do experimento 1. Sete dias depois da IATF as vacas foram distribuídas em dois grupos: colheita do embrião (GC; $n=301$) e taxa de prenhez (GP; $n=261$). As vacas do GC foram submetidas à colheita de embriões pelo método não cirúrgico e o GP foi submetido ao diagnóstico de gestação 30 dias após a IATF. No experimento 2B, foram realizadas 60 superovulações com duas IATF 12h e 24h após a aplicação do GnRH. As colheitas dos embriões foram realizadas 7 dias após o GnRH. No

experimento 2C, foram utilizados ovários provenientes de abatedouro para PIVE. Para a distribuição dos touros na FIV (D0), os oócitos foram randomizados homogeneamente de acordo com a qualidade. Foram analisadas as taxas de clivagem, de blastocistos sobre oócitos totais e de blastocistos sobre clivados. Os dados foram analisados pelo teste exato de Fisher e pelo procedimento GLIMMIX do SAS. No experimento 2A não se verificou efeito na taxa de recuperação de embriões conforme a fertilidade do touro [Alta = 39,7% (50/126) vs Baixa = 35,9% (46/128); $P=0,50$]. Entretanto, houve diferença na taxa de fertilização [Alta = 98,0% (49/50) vs Baixa = 78,2% (36/46); $P=0,01$] e na taxa de viabilidade [Alta = 88,0% (44/50) vs Baixa = 60,8% (28/46); $P<0,01$]. No GP houve efeito na taxa de prenhez à IATF [Alta = 54,6% (71/130) vs Baixa = 41,2% (54/131); $P=0,03$]. No experimento 2B houve diferença na taxa de fertilização [Alta = 59,0% (154/261) vs Baixa = 42,7% (102/239); $P=0,04$], na viabilidade sobre oócitos totais [Alta = 54,0% (141/261) vs Baixa = 38,9% (93/239); $P=0,05$], mas não houve diferença na taxa de embriões viáveis sobre os fertilizados [Alta = 91,6% (141/154) vs Baixa = 91,2% (93/102); $P=0,9$]. No experimento 2C, não houve diferença na taxa de clivagem [Alta = 82,1% (619/754) vs Baixa = 81,9% (584/713); $P=0,9$], na taxa de blastocisto sobre oócitos totais (Alta = 21,5% (160/754) vs Baixa = 21,9% (152/693); $P=0,9$) e taxa de blastocisto sobre estruturas clivadas (Alta = 25,8% (160/619) vs Baixa = 26,0% (152/584); $P=0,9$). Sendo assim, o atraso no momento da IATF não aumentou a taxa de prenhez à IATF em touros de baixa fertilidade. Ainda, touros de alta fertilidade apresentaram maior fertilidade na IATF (aumento na taxa de fertilização, qualidade embrionária e taxa de prenhez) e na SOV (aumento na taxa de fertilização e qualidade embrionária). Entretanto, essas diferenças entre touros de alta e baixa fertilidade não foram evidenciadas na PIVE.

Palavras-chave: Fertilidade. Touros. IATF. Embriões.

ABSTRACT

ZANATTA, G. M. **Embryo production using high and low fertility bulls**. [Produção embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade]. 2019. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The objective of the present study was to understand the difference in fertility of bulls used for artificial insemination programs. For this, four experiments were carried out to evaluate the fertilization and embryo quality at AI, SOV and IVEP of high and low fertility bulls. On Experiment 1, three high fertility and three low fertility bulls were used (Concept Plus, Alta Genetics) to evaluate different moments at TAI (48h and 54h after P4 device removal). A total of 522 Nellore cows received an estrus synchronization protocol using E2+P4, and EC as the ovulation inductor. On the moment of the first TAI (48h after P4 device removal) half of the cows were inseminated (Group 48h) and the second half were inseminated six hours later (Group 54h), using all six bulls in both moments. The pregnancy diagnosis was performed using ultrasonography 30 days after TAI. Data were analyzed using the GLIMMIX procedure of SAS. An effect of bull fertility was verified [High = 49.2% (128/260); Low = 35.9% (94/262); $P=0.002$] on pregnancy rate to TAI. However, no effect was observed for moment of TAI [G48h = 41.4% (109/263); G54h = 43.6% (113/259); $P=0.66$], as well as interaction fertility*moment ($P=0.55$) on the pregnancy rate to TAI. On experiments 2A, 2B and 2C, the objective was to evaluate the pregnancy rate to TAI and embryo quality to TAI, SOV and IVEP of high and low fertility bulls. Three high and three low fertility bulls were used (ST Repro). The same batch of semen of each bull was used for all biotechnologies. On experiment 2A, 562 cows were synchronized using a P4/E2 protocol, with EC on the moment of device removal. Seven days after TAI, cows were distributed into two groups: flushing (GF; $n=301$) and pregnancy (GP; $n=261$). Cows from the GF were submitted to flushing using the non-surgical method and the GP was submitted to pregnancy diagnosis 30 days after TAI. On experiment 2B, 60 superovulations were performed with two TAIs 12h and 24h after GnRH administration. Flushing was performed 7 days after GnRH. On experiment 2C, ovaries from slaughterhouse were used for the IVEP. For the distribution of the bulls for IVF (D0), oocytes were homogenously randomized according to quality. The following variables were considered: cleavage rate on total

oocytes, blastocyst rate on total oocytes and blastocyst rate on cleaved oocytes. Data were analyzed using Fishers exact test and the GLIMMIX procedure of SAS. On experiment 2A no effect on embryo recovery rate was observed according to bull fertility [High = 39.7% (50/126) vs Low = 35.9% (46/128); $P=0.50$]. However, there was a difference on the fertilization rate [High = 98.0% (49/50) vs Low = 78.2% (36/46); $P=0.01$] and viability rate [High = 88.0% (44/50) vs Low = 60.8% (28/46); $P<0.01$]. On the GP there was an effect on the pregnancy rate to TAI [High = 54.6% (71/130) vs Low = 41.2% (54/131); $P=0.03$]. On experiment 2B there was a difference on the fertilization rate [High = 59.0% (154/261) vs Low = 42.7% (102/239); $P=0.04$], on total oocyte viability [High = 54.0% (141/261) vs Low = 38.9% (93/239); $P=0.05$], but no difference was observed for the rate of viable embryos on fertilized structures [High = 91.6% (141/154) vs Low = 91.2% (93/102); $P=0.9$]. On experiment 2C, no difference was observed for the cleavage rate [High = 82.1% (619/754) vs Low = 81.9% (584/713); $P=0.9$], blastocyst rate on total oocytes [High = 21.5% (160/754) vs Low = 21.9% (152/693); $P=0.9$] and blastocyst rate on cleaved oocytes [High = 25.8% (160/619) vs Low = 26.0% (152/584); $P=0.9$]. Thus, delaying the moment of TAI did not increase pregnancy rate to TAI of low fertility bulls. In addition, high fertility bulls have higher fertility to TAI (increased fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate) and SOV (increased fertilization rate and embryo quality). However, those differences between high and low fertility bulls were not observed on the IVEP.

Keywords: Fertility. Bulls. TAI. Embryos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema hipotético com o tempo esperado entre o momento da IATF e a ovulação. Baixa fertilidade – intervalo médio entre a IATF e a ovulação próximo à 16h; Alta fertilidade – intervalo médio entre a IATF e a ovulação próximo à 22h.....	26
Figura 2 – Delineamento experimental com os dois momentos de IATF e tempo entre a retirada do dispositivo e a IATF.....	28
Figura 3 – Metodologia de distribuição do sêmen. A mesma partida por touro foi utilizada nas três biotecnologias (experimento 2A - produção <i>in vivo</i> de ovulação única e taxa de prenhez; experimento 2B – produção de embriões de vacas superovuladas; experimento 2C – Produção <i>in vitro</i> de embriões).....	35
Figura 4 – Esquema hipotético. Touros de alta fertilidade possuem maior taxa de fertilização e maior taxa de prenhez.....	36
Figura 5 – Esquema hipotético do protocolo e distribuição dos grupos.....	38
Figura 6 – Esquema hipotético. Touros de alta fertilidade possuem maior taxa de fertilização e qualidade embrionária em vacas superovuladas.....	43
Figura 7 – Esquema hipotético do protocolo de superovulação e distribuição dos grupos.....	44
Figura 8 – Esquema hipotético. Touros de alta fertilidade possuem maior taxa de clivagem e maior taxa de blastocistos.....	48
Figura 9 – Esquema hipotético do protocolo de PIVE e distribuição dos grupos.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Efeito aditivo do mérito genético e da fertilidade na quantidade de quilos de bezerros produzidos em um rebanho com 100 matrizes que receberam uma IATF e uma ressincronização.	20
Tabela 2 –	Média $\pm$ erro padrão dos parâmetros de avaliados na análise computadorizada do sêmen (CASA), dos touros utilizados no experimento 1, agrupados por fertilidade	29
Tabela 3 –	Média $\pm$ erro padrão dos parâmetros de avaliados por meio da análise computadorizada do sêmen (CASA), dos touros utilizados no experimento 2A, 2B e 2C, agrupados de acordo com a fertilidade.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Taxa de prenhez conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de prenhez quando se utilizou touros de alta fertilidade comparado aos touros de baixa fertilidade ($P=0,002$).....31
- Gráfico 2 – Taxa de prenhez conforme o horário da IATF (48h e 54h após a retirada do dispositivo intravaginal de P4). Não houve efeito na taxa de prenhez de acordo com o momento da IATF ($P=0,66$).....32
- Gráfico 3 – Taxa de prenhez conforme a fertilidade do touro (alta e baixa) e horário da IATF (48h e 54h após a retirada do dispositivo intravaginal de P4). Não houve interação fertilidade*horário ($P=0,55$).....32
- Gráfico 4 – Taxa de recuperação (número total de estruturas coletadas sobre número total de coletas realizadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de recuperação de acordo com a fertilidade do touro ($P=0,5$).....40
- Gráfico 5 – Taxa de fertilização (número total de estruturas fertilizadas sobre número total de estruturas coletadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de fertilização conforme a fertilidade do touro ($P=0,01$).....41
- Gráfico 6 – Taxa de viabilidade (número total de embriões viáveis sobre número total de estruturas coletadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de viabilidade conforme a fertilidade do touro ($P<0.01$).....41
- Gráfico 7 – Taxa de prenhez conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de prenhez conforme a fertilidade do touro ($P=0,03$).....42
- Gráfico 8 – Taxa de fertilização (número total de estruturas fertilizadas sobre número total de estruturas coletadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de fertilização conforme a fertilidade do touro ($P=0,04$).....46
- Gráfico 9 – Taxa de viabilidade total (número total de embriões viáveis sobre número total de estruturas coletadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de viabilidade total conforme a fertilidade do touro ($P=0,05$).....47
- Gráfico 10 – Taxa de viabilidade dos embriões fertilizados (taxa de embriões viáveis sobre os fertilizados) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de viabilidade dos embriões fertilizados conforme a fertilidade ($P=0,9$).....47
- Gráfico 11 – Taxa de clivagem (número total de estruturas clivadas sobre número total de oócitos) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de clivagem conforme a fertilidade do touro ($P=0,9$).....55

Gráfico 12 – Taxa de blastocistos totais (número total de blastocistos sobre número total de oócitos) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de blastocistos totais conforme a fertilidade do touro (P=0,9).....	55
Gráfico 13 – Taxa de blastocistos por estrutura clivada (número total de blastocistos sobre número total de estruturas clivadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de blastocistos por estrutura clivada conforme a fertilidade do touro (P=0,9).....	56
Gráfico 14 – Prenhez por IA (P/IA) por observação de cio (EAI) ou inseminação em tempo fixo (TAI), de acordo com a fertilidade do touro (baixa, média e alta).....	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. EXPERIMENTO 1 – Taxa de prenhez de vacas Nelore inseminadas em dois momentos diferentes com sêmen de touros de alta e baixa fertilidade.....	25
3.1.1. Objetivo.....	26
3.1.2. Hipótese.....	26
3.1.3. Materiais e métodos.....	27
3.1.3.1. <i>Manejo dos animais.....</i>	<i>27</i>
3.1.3.2. <i>Delineamento experimental.....</i>	<i>27</i>
3.1.3.3. <i>Análise estatística.....</i>	<i>30</i>
3.1.4. Resultados.....	31
3.2 EXPERIMENTO 2 – Taxa de prenhez e qualidade embrionária (in vivo e in vitro) utilizando touros de alta e baixa fertilidade.....	33
3.2.1. EXPERIMENTO 2A.....	35
3.2.1.1. Objetivo.....	35
3.2.1.2. Hipótese.....	35
3.2.1.3. Materiais e métodos.....	37
3.2.1.3.1. <i>Manejo dos animais.....</i>	<i>37</i>
3.2.1.3.2. <i>Delineamento experimental.....</i>	<i>37</i>
3.2.1.3.3. <i>Análise estatística.....</i>	<i>39</i>
3.2.1.4. Resultados.....	40
3.2.2. EXPERIMENTO 2B	43
3.2.2.1. Objetivo.....	43
3.2.2.2. Hipótese.....	43
3.2.2.3. Materiais e métodos.....	44
3.2.2.3.1. <i>Análise estatística.....</i>	<i>45</i>
3.2.2.4. Resultados.....	46
3.2.3. EXPERIMENTO 2C.....	48
3.2.3.1. Objetivo.....	48

3.2.3.2. Hipótese.....	48
3.2.3.3. Materiais e métodos.....	49
3.2.3.3.1. <i>Análise estatística</i>	51
3.2.3.4. Resultados.....	53
4. DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

O consumo de carne bovina está em expansão no Brasil e no mundo, sendo estimadas projeções de crescimento do consumo interno de 1,9% a.a e de exportação de 3,0% a.a, até 2027/28 (MAPA, 2018). Com isso, é imprescindível aumentar a produtividade por área do rebanho (SILVA et al., 2014), sendo a inseminação artificial (IA) e, principalmente a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), uma alternativa para incrementar os ganhos da propriedade (BARUSELLI, P.S., 2019a).

O mercado de inseminação artificial teve um crescimento de mais de 200% nos últimos 16 anos, de 2002 à 2018 (BARUSELLI et al, 2019b). Uma biotecnologia que vem sendo considerada responsável pelo crescimento da IA no país é a IATF. Essa tecnologia colabora na resolução de alguns problemas encontrados na IA convencional, como, por exemplo, falhas na detecção de estro, elevado número de vacas em anestro e novilhas pré púberes (BARUSELLI et al., 2014). Outros fatores que devem ser levados em consideração nos programas de inseminação artificial são a qualidade do sêmen, o momento da inseminação (AMANN et al., 2018), a experiência do inseminador (SAACKE, 2008) e a fertilidade individual dos touros (BATISTA et al., 2016). Existem estudos que apontam baixa correlação entre as análises laboratoriais de sêmen e os índices de fertilidade à campo (MAZIERO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2019). Com isso, as empresas do setor de produção de sêmen estão tentando estabelecer processos para identificar touros de alta fertilidade e oferecer ao mercado reprodutores geneticamente superiores que possuem alta fertilidade.

Ainda, existem escassos procedimentos laboratoriais bem definidos e cientificamente aceitos para identificar precocemente touros de elevada fertilidade. Com isso, as empresas estão buscando elaborar alguns métodos para selecionar touros que apresentam maiores resultados na IATF. Com base nas taxas de concepção de cada touro, as informações de campo são analisadas estatisticamente excluindo os efeitos que possam interferir no resultado final da IATF, sempre com um touro referência (com a fertilidade já conhecida) por lote. Os touros que possuem taxa de prenhez mais elevada são certificados como touros de alta fertilidade, o que gera maior assertividade nos programas de IA.

A utilização de touros com DEP's superiores, que incrementam ganhos produtivos em seus descendentes, é indispensável nos programas de melhoramento genético. Ainda, o uso de touros com maior fertilidade pode aumentar consideravelmente a produtividade da pecuária de cria, como exemplificado na tabela 1. Na tabela (CREPALDI, 2014, dados não publicados) está apresentada a simulação de um rebanho de 100 matrizes que realiza duas IATF. Calculou-se a quantidade de quilos de bezerros desmamados de acordo com o incremento genético do touro e o aumento na taxa de prenhez. Independente do ganho genético adicionado pelo reprodutor, quando a taxa de prenhez aumenta de 40% para 55%, verifica-se incremento de 25% na quantidade de quilos de bezerros desmamados do rebanho. Assim sendo, o crescimento considerável da IATF no Brasil nos últimos anos (BARUSELLI, 2019c), aliado à utilização de touros de alta fertilidade nos rebanhos comerciais, causa impacto produtivo e econômico significativo para o setor.

Tabela 1. Efeito aditivo do mérito genético e da fertilidade na quantidade de quilos de bezerros produzidos em um rebanho com 100 matrizes que receberam uma IATF e uma ressincronização.

		Taxa de Prenhez				
Melhoramento genético (peso à desmama; kg)	IATF	40%	45%	50%	55%	60%
		x	x	x	x	x
	Re-IATF	40%	45%	50%	55%	60%
	0 kg	0	0	0	0	0
	5 kg	320	349	375	399	420
	10 kg	640	698	750	798	840
	15 kg	960	1.047	1.125	1.197	1.260
	20 kg	1.280	1.396	1.500	1.596	1.680

Fonte: CREPALDI, G.A. (2014).

Contudo, apesar das análises laboratoriais serem de suma importância para predizerem a fertilidade das amostras de sêmen, dificilmente se pode assegurar a fertilidade das partidas de sêmen na IATF (MOCÉ; GRAHAM, 2008). Além disso, está pouco esclarecido o motivo pelo qual ocorre diferença na taxa de prenhez entre touros, mesmo não havendo diferença nas características do sêmen analisado no laboratório, podendo esta diferença ser desde a não fertilização dos oócitos até uma morte embrionária precoce. Desta forma, são necessários mais estudos que tentam explicar o motivo desta diferença de fertilidade entre os touros. Essas informações são importantes para se desenvolver técnicas de avaliação mais precisas para predizer a fertilidade de touros, evitando investimentos em animais menos produtivos.

Assim, este estudo visa compreender melhor o porquê da diferença na fertilidade entre touros, bem como em qual momento é possível identificar alterações que podem justificar comprometimentos na fertilização ou no desenvolvimento embrionário precoce de touros de baixa e alta fertilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A fertilidade na reprodução animal é mensurada pela porcentagem de oócitos fertilizados após uma monta natural ou inseminação artificial, entretanto, devido à dificuldade de avaliar esta taxa tão breve, se assume a taxa de concepção ou taxa de não retorno ao estro como indicador de fertilidade (AMANN et al., 2018). Isto ocorre pois o touro é responsável por um número elevado de acasalamentos em um rebanho, seja na monta natural ou na IA (FOOTE, 2003), gerando, desta forma, grande impacto econômico e produtivo no sistema. Neste contexto, métodos para prever a fertilidade de um reprodutor vêm sendo cada vez mais discutidos no meio científico e privado. Esta avaliação pode levar em conta diversos fatores, como a análise clínica dos indivíduos e análises laboratoriais do ejaculado (motilidade espermática total, motilidade espermática progressiva, concentração espermática, morfologia espermática, integridade de membrana plasmática, entre outros; CHENOWETH; MCPHERSON, 2016). Isto nos permite, de certa forma, selecionar àqueles que possam alcançar melhores resultados nos índices finais de fertilização. Para isto, alguns padrões mínimos devem ser apresentados, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, para que estes indivíduos estejam aptos a serem usados na monta natural ou tornarem-se doadores de sêmen para inseminação artificial.

De acordo com a classificação de Saacke et al. (2000), os problemas relacionados a fertilidade de um reprodutor podem ser classificados em compensatórios e não compensatórios. Quando a baixa fertilidade pode ser incrementada com o aumento da concentração espermática, os autores definem como defeitos compensatórios. Por outro lado, quando a fertilidade máxima já é atingida e o aumento na concentração não incrementa a prenhez, a infertilidade é classificada como não compensatória. A identificação de uma concentração espermática ideal, há muito tempo foi discutida, com o objetivo de se obter uma máxima taxa de concepção em programas de IA. A dose inseminante foi estudada e constatou-se que a taxa de concepção pode variar conforme a concentração e o reprodutor, tendo animais que possuem maior variação no resultado e outros que mantêm essa taxa mais constante (AMANN et al., 2018). Foote e Kaproth (1997), realizaram três experimentos comparando a taxa de não retorno ao estro utilizando diferentes concentrações por inseminação, todas acima de 10×10^6 .

espermatozoides por dose, e não encontraram diferença na taxa de concepção. Des Daan et al. (1998), utilizaram doses inseminantes variando entre 2×10^6 e 18×10^6 espermatozoides e verificaram fertilidade variável de acordo com a concentração para alguns touros e nenhum efeito para outros. Contudo, os touros que não obtiveram variação, apresentaram altas taxa de prenhez, independente da concentração espermática utilizada.

O método mais utilizado na avaliação do sêmen, é a avaliação por microscopia óptica, por um técnico especializado, o qual avalia as características citadas anteriormente. No entanto, estudos indicam que o conceito que a fertilidade do macho está relacionada a um determinado número de espermatozoides móveis e morfologicamente normais é falho (AITKEN, 2006). Na realidade não seria o número absoluto de espermatozoides que determina a fertilidade e sim a funcionalidade de suas estruturas. Assim, uma série de biotécnicas vêm sendo desenvolvidas, visando remover a subjetividade da análise espermática e avaliar a funcionalidade das estruturas espermáticas afim de se obter maior acurácia na avaliação seminal. Entre estas técnicas destacam-se a avaliação computadorizada das características seminais (CASA; VERSTEGEN et al. 2002), a utilização de sonda fluorescentes, avaliação de espécies reativas de oxigênio (ROS), composição do plasma seminal (HOLDEN et al., 2017) análise proteômica (DRUART; GRAAF, 2018) e genômica (ABDOLLAHI-ARPANAHI; MOROTA; PEÑAGARCIANO, 2017; REZENDE; NANI; PEÑAGARCIANO, 2019).

Embora essas análises laboratoriais mais recentes possuam alta acurácia em suas avaliações, a correlação da qualidade seminal avaliada em laboratório e a taxa de concepção ainda é contraditória. Oliveira et al. (2012) analisaram o sêmen de três partidas diferentes de três touros por análise computadorizada (CASA) e não verificaram correlação com as taxas de prenhez à IATF. Em outro estudo do mesmo grupo, Oliveira et al. (2013) utilizaram um método estatístico que se mostrou possível identificar algumas análises laboratoriais mais relacionadas à taxa de concepção, mas ainda alegam não haver exatidão entre testes laboratoriais e capacidade de fertilização. Nogueira et al. (2019), verificaram que a velocidade linear dos espermatozoides realizada por análises laboratoriais convencionais e computadorizadas possui correlação com a taxa de concepção, mas com coeficiente de correlação baixo. Holden et al. (2017), ao correlacionarem análises laboratoriais com as taxas de prenhez utilizando sêmen sexado ou convencional (com o mesmo

ejaculado) verificaram correlação para motilidade e viabilidade ($r = 0,84$ e $r = 0,80$, respectivamente; $P < 0,05$) e taxa de prenhez apenas quando o sêmen era sexado. Ao analisarem a composição do plasma seminal destas mesmas amostras, encontraram algumas características correlacionadas com a taxa de prenhez, tanto para as amostras de sêmen não sexado quanto para as amostras de sêmen sexado.

Independente das tentativas de prever a fertilidade de um determinado animal, diversos estudos indicam um efeito significativo do touro na fertilidade, seja na IATF ou na produção de embriões (*in vivo* e *in vitro*) (PALMA; SINOWATZ, 2004; BATISTA, 2016; FRANCO, 2018; NOGUEIRA, 2019). Algumas centrais de inseminação, baseando-se neste conhecimento vêm identificando touros com diferentes taxas de fertilidade à campo através de métodos estatísticos. No entanto, as causas desta maior ou menor fertilidade ainda não são claras. Desta forma, torna-se fundamental elucidar os mecanismos envolvidos na subfertilidade de alguns touros para posteriormente desenvolver estratégias que possam incrementar as taxas fertilidade destes animais.

Alguns estudos vêm verificando que, semelhante ao sêmen sexado, a menor fertilidade à IATF de alguns touros possa estar relacionada a uma capacitação precoce e um menor tempo de sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo da vaca (PFEIFER, 2019). Isso ocorre pois o processo de sexagem é extremamente estressante para o espermatozoide, tanto pelo tempo que leva o processo como pelos danos causados pela passagem no equipamento. Baseando-se nesta informação, Sales et al. (2011) sugeriu que a inseminação mais próxima ao momento da ovulação seria eficiente para melhorar as taxas de prenhez utilizando sêmen sexado. De fato, os autores verificaram incremento na taxa de prenhez quando se atrasou o momento da IATF para 60h após a retirada do dispositivo, tanto em gado de leite quanto em gado de corte. Desta forma, uma estratégia semelhante poderia ser aplicada no caso de touros de baixa fertilidade na IATF. Assim, o presente estudo visou identificar possíveis fatores envolvidos na menor fertilidade de alguns touros tanto na IATF como na produção de embriões e estudar uma estratégia para incrementar as taxas de fertilidade destes animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A condução deste estudo está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética de Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA N°: 6809180219).

3.1 EXPERIMENTO 1 – Taxa de prenhez de vacas Nelore inseminadas em dois momentos diferentes com sêmen de touros de alta e baixa fertilidade

Os touros utilizados neste experimento foram todos da raça Angus, provenientes de uma central de genética (Alta Genetics do Brasil; Uberaba, MG, Brasil). A análise de fertilidade é resultado de um banco de dados da mesma (Concept Plus®). Para a realizar esta análise, a empresa possui resultados de campo com mais de 400 rebanhos e cerca de 52.000 inseminações, das quais os touros foram classificados em alta fertilidade e baixa fertilidade. Para avaliação da fertilidade do touro, a empresa exige alguns critérios como: mais de um touro por lote; ao menos um touros de fertilidade já pré determinada; além de informações de categoria, escore de condição corporal das vacas, inseminador. Para a realização desse experimento, foram selecionados três touros de alta fertilidade (AF; $n = 3$; $54,3 \pm 1,0\%$) e três touros de baixa fertilidade (BF; $n = 3$; $41,5 \pm 2,3\%$).

3.1.3. OBJETIVO

Avaliar a taxa de prenhez de vacas Nelore inseminadas com touros de alta e baixa fertilidade na IATF, inseminando em dois momentos diferentes, com um intervalo de seis horas.

3.1.3. HIPÓTESE

Touros de baixa fertilidade possuem menor tempo de sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea. O atraso no momento da IATF aumentaria a taxa de prenhez quando se utiliza touros de baixa fertilidade, devido à diminuição do intervalo entre a inseminação e a ovulação.

Figura 1 – Esquema hipotético que apresenta o tempo esperado entre o momento da IATF e a ovulação. Baixa fertilidade – estimativa do intervalo entre a IATF e a ovulação de 16h; Alta fertilidade – estimativa do intervalo entre a IATF e a ovulação de 22h.

Fonte: Adaptado de BARUSELLI, P.S., (2007).

3.1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.3.1. *Manejo dos animais*

O presente estudo foi conduzido em uma fazenda comercial, localizada no município de Maria Helena, no estado do Paraná. Foram utilizadas 522 vacas da raça Nelore com escore de condição corporal (ECC) $2,85 \pm 0,36$ (escala de 1 = magra a 5 = obesa; AYRES et al., 2009). Os animais foram mantidos em piquetes com pastejo (*Bracchiaria*), sal mineral e água de livre acesso. As instalações do curral de manejo eram as de rotina de uma fazenda de gado de corte, com repartições e tronco de contenção para realizar as inseminações e diagnóstico de gestação.

3.1.3.2. *Delineamento experimental*

Um total de 522 fêmeas bovinas da raça Nelore (*Bos indicus*) foram submetidas a um protocolo de sincronização de estro a base de progesterona e estrógeno. O protocolo consistiu na inserção de um dispositivo de progesterona (P4) e aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (BE) no primeiro dia (D0). A remoção do dispositivo ocorreu no oitavo dia do protocolo (D8) concomitantemente à aplicação de 300UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG), 0,530mg de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e 1mg de cipionato de estradiol (CE). No dia da inseminação (D10), as vacas do grupo 48h (G48) foram inseminadas pelo período da manhã (48h após a remoção do dispositivo de progesterona) e as vacas do grupo 54h (G54) foram inseminadas pelo período da tarde (54h após a remoção do dispositivo de progesterona). Cada grupo foi inseminado com sêmen de três touros de alta fertilidade (~55% de prenhez – dados prévios) e três touros de baixa fertilidade (~45% de prenhez – dados prévios), com três partidas por touro, sendo distribuídos homogeneamente conforme o touro e a partida.

A distribuição das doses de sêmen foi realizada em uma sequência de cinco doses por touro e por partida, passando a descongelar a próxima partida somente após ter sido descongelado a primeira partida de doses de todos os touros. No período da tarde, a sequência de descongelamento de sêmen seguiu do mesmo touro e partida que começou pelo período da manhã. O diagnóstico de gestação foi realizado trinta dias após a IATF, por ultrassonografia transretal, utilizando

transdutor linear na frequência de 8,0 MHz (M5vet – Mindray, Biomedical Electronics Co, Shenzhen, Guangdong, China).

Figura 2 – Delineamento experimental com os dois momentos de IATF e tempo entre a retirada do dispositivo e a IATF.

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

Na tabela 2, estão descritos os resultados da análise seminal entre os touros de alta e baixa fertilidade avaliados por análise computadorizada do sêmen (CASA). Os dados foram obtidos de análises das mesmas partidas dos touros que também foram utilizados na tese de doutorado de Maíra Bianchi Rodrigues Alves, “Perfil de microRNAs presentes no sêmen e embriões bovinos e sua relação com a fertilidade” (2018).

Tabela 2 – Média $\pm$ erro padrão dos parâmetros de avaliados na análise computadorizada do sêmen (CASA), dos touros utilizados no experimento 1, agrupados por fertilidade.

Parâmetro	Sêmen Bovino (Fertilidade)		P
	Alta	Baixa	
MT (%)	76,66 $\pm$ 1,91	71,93 $\pm$ 1,70	0,07
MP (%)	54,66 $\pm$ 1,99	52,48 $\pm$ 1,71	0,41
VAP (μ m/s)	97,45 $\pm$ 1,53 ^b	105,39 $\pm$ 1,58 ^a	0,001
VSL (μ m/s)	78,35 $\pm$ 2,66	83,9 $\pm$ 1,94	0,10
VCL (μ m/s)	145,79 $\pm$ 2,59 ^b	172,79 $\pm$ 3,69 ^a	<0,0001
ALH (μ m)	2,66 $\pm$ 0,04 ^b	3,41 $\pm$ 0,12 ^a	<0,0001
BCF (Hz)	22,29 $\pm$ 0,33	23,11 $\pm$ 0,53	0,20
STR (%)	81,11 $\pm$ 1,44	80,6 $\pm$ 0,93	0,77
LIN (%)	53,71 $\pm$ 1,60 ^a	48,71 $\pm$ 1,02 ^b	0,01
Rap (%)	70,49 $\pm$ 1,75	66,69 $\pm$ 1,56	0,11

MT: Motilidade total; MP: Motilidade progressiva; VAP: Velocidade de trajeto; VSL: Velocidade progressiva; VCL: Velocidade curvelinear; ALH: Amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF: Frequência de batimento; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; Rap: Espermatozoides com velocidade rápidos. Letras superescritas (a, b) indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Fonte: Adaptado de ALVES, M.B.R (2018).

3.1.3.3. Análise estatística

Nesse estudo foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado com dois tratamentos e 6 repetições (Lotes) em 3 fazendas. Um total de 6 touros foram distribuídos em dois grupos experimentais [touros de alta (n=3) e touros de baixa (n=3) fertilidade]. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Enterprise Guide (v. 7.1; SAS Inst., Cary, NC).

Variáveis categóricas (*binária*) foram analisados pelo procedimento Glimmix ajustando para distribuição *Binomial* - função *link* = *Logit*. No modelo inicial foram estudadas as *variáveis explanatórias grupo* [touros de alta (n=3) e touros de baixa (n=3) fertilidade], *horário da IA* (48horas ou 54horas), categoria (pluríparas ou primíparas), Inseminador (n=3), lotes (n=6) e as respectivas *interação*. *Para a construção do modelo final, foi utilizado o modelo “backward stepwise regression” e as variáveis explanatórias foram sequencialmente removidas do modelo estatístico seguindo o critério de Wald se $P > 0,10$.*

O modelo final permaneceu *grupo* [touros de alta (n=3) e touros de baixa (n=3) fertilidade], *Horário da IA* (48horas ou 54horas) e as respectivas *interações* como efeitos fixos. Os resíduos foram utilizados como efeito aleatório e *Animal* como *erro termo*. Para correção dos graus de liberdade das variâncias foi incluída a opção *ddfm* = *kenwardroger*. O teste post hoc de diferença significativa incluiu ajuste de Tukey. Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,05$.

3.1.3. RESULTADOS

Os touros de alta fertilidade apresentaram maior taxa de prenhez do que os touros de baixa fertilidade [Alta = 49,2% (128/260) vs Baixa = 35,9% (94/262); $P=0,002$], como mostrado no gráfico 1. Entretanto, não houve efeito do momento da IATF na taxa de prenhez [G48h = 41,4% (109/263) vs G54h = 43,6% (113/259); $P=0,66$; Gráfico 2] e não houve interação ($P=0,5$) entre a fertilidade dos touros e o momento da IATF [Alta*G48h = 48,1% (63/131) vs Alta*G54h = 49,6% (65/131); Baixa*G48h = 35,6% (47/132) vs Baixa*G54h = 38,7% (48/124); Gráfico 3]..

Gráfico 1 – Taxa de prenhez conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de prenhez quando se utilizou touros de alta fertilidade comparado aos touros de baixa fertilidade ($P=0,002$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

Gráfico 2 – Taxa de prenhez conforme o horário da IATF (48h e 54h após a retirada do dispositivo intravaginal de P4). Não houve efeito na taxa de prenhez de acordo com o momento da IATF ($P=0,66$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

Gráfico 3 - Taxa de prenhez conforme a fertilidade do touro (alta e baixa) e horário da IATF (48h e 54h após a retirada do dispositivo intravaginal de P4). Não houve interação fertilidade*horário ($P=0,55$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

3.2. EXPERIMENTO 2 – Taxa de prenhez e qualidade embrionária (*in vivo* e *in vitro*) utilizando touros de alta e baixa fertilidade

O experimento 2 foi dividido em três experimentos para tentar compreender a diferença da fertilidade de touros de alta e baixa fertilidade em diferentes biotecnologias. Para isto, foi utilizada a mesma partida de seis touros para os três experimentos (três touros de alta fertilidade e três touros de baixa fertilidade), provenientes de resultados gerados pela empresa ST Repro.

Semelhante ao experimento 1, as análises da diferença de fertilidade entre os touros são geradas por um programa da empresa. São utilizados dados de campo em diversos lotes de IATF, em diferentes fazendas e regiões. Nesses lotes, sempre se utiliza um touro que já possui a fertilidade conhecida pela empresa, que serve como touro referência aos novos reprodutores que estão sendo testados. Depois do diagnóstico de gestação, a empresa realiza análise bioestatística para determinar a fertilidade dos touros. Os fatores que podem afetar a taxa de fertilidade, como inseminador, categoria das vacas, condição corporal das vacas, entre outros, são controlados nos modelos estatísticos para que se consiga evidenciar o efeito touro como fator principal.

A análise do sêmen foi realizada utilizando o sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA; Hamilton Thorne IVOS, v.12.2) e por citometria de fluxo foi utilizado o citômetro Guava EsayCyte™ Mini System (Guava Technologies).

Para a análise do CASA, uma amostra de 5µL de sêmen de cada touro foi colocada em lâmina e lamínula pré aquecida a 37°C, para determinação dos parâmetros a seguir:

MT – Motilidade total (%);

MP – Motilidade Progressiva (%);

VAP – Velocidade de trajeto (µm/s): velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme;

VSL – Velocidade progressiva (µm/s): é o tempo percorrido em uma distancia em linha reta;

STR – Retilinearidade (%): relação entre (VSL/VAP) x 100, é a medida de afastamento médio da trajetória;

Slow – Porcentagem de espermatozóides em velocidade lenta (%);

Medium – Porcentagem de espermatozóides em velocidade média (%)

Rapid – Porcentagem de espermatozóides em velocidade rápida (%);

LIN – Linearidade (%): relação entre (VSL/VCL) x 100, é o quanto a célula espermática se moveu em linha reta;

BCF – Frequência de batimentos do flagelo (Hz): frequência que a linha da cabeça do espermatozoide atravessa a trajetória em qualquer direção;

ALH – Amplitude de deslocamento da cabeça (μm); oscilação média da cabeça do espermatozóide.

Para as avaliações realizadas por citometria de fluxo os espermatozóides foram diferenciados de debris com base na diferença de tamanho (FSC). Os dados fornecidos em pontos bidimensionais numa escala logarítmica foram analisados pelo *software* FlowJo v8.7 (Flow Cytometry Analysis Software – Tree Star INC., Asland, USA).

As avaliações de integridade de membrana plasmática e acrossomal foram realizadas com as sondas aglutina do *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluorescência (FITC-PSA) em associação ao iodeto de propídio (PI). Um total de 7,5 μL de sêmen a uma concentração final de 25×10^6 espermatozóides foi adicionado a 7,5 μL da solução FITC-PSA associada ao PI, incubado por 37°C por 5 minutos, adicionado 100 μL de PBS e realizada leitura em citometria de fluxo. Quatro categorias espermáticas foram obtidas: FITC-PSA-/PI- (membrana plasmática e acrossomo íntegros); FITC-PSA+/PI+ (membrana plasmática lesada e acrossomo reagido); FITC-PSA+/PI- (membrana plasmática lesada e acrossomo íntegro); FITC-PSA-/PI+ (membrana plasmática lesada e acrossoma reagido).

As avaliações do potencial de membrana mitocondrial foram feitas com sondas fluorescentes de iodeto de 5,5,6,6'-tetracloro,1,3,3'tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (Invitrogen, Eugene, OR, USA) com adaptação de Hamilton et al. (2016). A incubação de 18 μL de sêmen em 1 μL de JC-1 foi realizada. De acordo com o potencial de membrana, três categorias espermáticas foram obtidas: espermatozóides com baixo potencial de mitocôndria; espermatozóides com alto potencial de mitocôndria e, espermatozóides com potencial de mitocôndria intermediário.

Os parâmetros obtidos pela análise computadorizada do sêmen (CASA) estão discriminados na tabela 3. Já as análises realizadas pela citometria de fluxo, não apresentaram diferenças estatísticas.

Figura 3 – Metodologia de distribuição do sêmen. A mesma partida por touro foi utilizada nas três biotecnologias (experimento 2A - produção *in vivo* de ovulação única e taxa de prenhez à IATF; experimento 2B – produção de embriões de vacas superovuladas; experimento 2C – Produção *in vitro* de embriões).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

3.2.3. EXPERIMENTO 2A

3.2.1.1. *Objetivo*

Avaliar a qualidade embrionária e a taxa de prenhez de touros de alta e baixa fertilidade na IATF. Bem como tentar identificar em que momento ocorre a diferença da fertilidade.

3.2.1.2. *Hipótese*

Touros de alta fertilidade produzem embriões de melhor qualidade sete dias após a IATF e maior taxa de prenhez 30 dias após a IATF.

Figura 4 – Esquema hipotético. Touros de alta fertilidade possuem maior taxa de fertilização e maior taxa de prenhez.

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

3.2.1.3. Materiais e métodos

3.2.1.3.1. Manejo dos animais

O presente estudo foi conduzido em duas fazendas comerciais, localizadas no município de Santa Rita do Pardo/MS e na cidade de Andradina/SP e uma fazenda de pesquisa no município de Andradina/SP. Foram utilizadas 562 vacas da raça Nelore. Os animais foram mantidos em piquetes com pastejo (*Bracchiaria*), sal mineral e água de livre acesso. As instalações do curral de manejo eram as de rotina de uma fazenda de gado de corte, com repartições e tronco de contenção para se realizar as inseminações e diagnóstico de gestação.

3.2.1.3.2. Delineamento experimental

Um total de 562 fêmeas bovinas da raça Nelore (*Bos indicus*) receberam um protocolo de sincronização de estro a base de progesterona e estrógeno para serem inseminadas em tempo fixo. O protocolo consistiu na inserção de um dispositivo de progesterona (P4) e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) no primeiro dia (D0). A remoção do dispositivo ocorreu no oitavo dia do protocolo (D8) concomitantemente à aplicação de 300UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG), 0,530 mg de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e 1 mg de cipionato de estradiol (ECP). No momento da IATF, foram utilizados seis touros da raça Aberdeen Angus (três touros de alta fertilidade e três touros de baixa fertilidade). A distribuição dos touros foi feita de maneira sequencial, sendo um touro de cada vez, intercalados entre sua fertilidade. Após sete dias da IATF, as vacas foram avaliadas por ultrassonografia para confirmação da ovulação e distribuídas em dois grupos conforme o touro que foram inseminadas e a presença ou não de corpo lúteo. Um grupo foi realizado o procedimento de colheita de embrião (Grupo Coleta) e no outro grupo realizou-se o diagnóstico de gestação trinta dias após a IATF (Grupo Prenhez).

As colheitas dos embriões foram realizadas pelo método não cirúrgico, somente no corno uterino ipsilateral à ovulação. Para tal, se utilizou DMPBS (Biodux, São Paulo, Brasil), infundido por de um equipo em “Y” estéril (Biodux, São Paulo, Brasil) acoplado em uma sonda (Biodux, São Paulo, Brasil) e a um filtro de colheita de embriões (WTA, São Paulo, Brasil). A sonda foi fixada no terço final do corno uterino, para que se realize o *flushing* uterino e recuperação das estruturas.

Após realizado o procedimento de colheita dos embriões, os filtros foram lavados e os embriões rastreados em placas de Petri com estereomicroscópio (Olympus, EUA). As estruturas recuperadas foram classificadas conforme seu estágio de desenvolvimento, de acordo com as normas da *International Embryo Technology Society* (IETS), lavadas em PBS acrescido de 0,1% de Polivinilpirrolidona (PVP) e criopreservados em nitrogênio líquido pelo método de *snap frozen*.

Figura 5 – Delineamento experimental com a distribuição dos grupos.

Fonte: ZANATTA, G.M., 2019

3.2.1.3.3. Análise estatística

Nesse estudo foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado com dois tratamentos e 13 repetições (Lotes) em 3 fazendas. Um total de 6 touros foram distribuídos em dois grupos experimentais [touros de alta (n=3) e touros de baixa (n=3) fertilidade]. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Enterprise Guide (v. 7.1; SAS Inst., Cary, NC).

Outliers foram removidos quando necessário. O efeito foi determinado por ANOVA *bi-direccional* utilizando *somas de quadrados do Tipo III*. Para a inferência estatística se utilizou procedimento *Glimmix* ajustando para distribuição *Gaussian*. No modelo estatístico, grupo [touros de alta (n=3) e touros de baixa (n=3) fertilidade] foi incluído como efeito fixo. Os resíduos foram utilizados como efeito aleatório e *Animal* como *erro termo*. Para correção dos graus de liberdade das variâncias foi incluída a opção *ddfm = kenwardroger*. O teste *post hoc* de diferença significativa incluiu ajuste de *Tukey*.

Variáveis categóricas (*binária*) e cálculo de taxas (%) foram analisados pelo procedimento *Glimmix* ajustando para distribuição *Binomial* - função *link = Logit*. No modelo estatístico, *grupo* (alta e baixa fertilidade na IATF) foi incluído como efeito fixo. Os resíduos foram utilizados como efeito aleatório e *Fazendas(réplicas)* como erro termo. Para correção dos graus de liberdade das variâncias foi incluída a opção *ddfm = kenwardroger*. O teste *post hoc* de diferença significativa incluiu ajuste de *Tukey*.

Os valores foram apresentados como média e erro padrão da média (EPM). Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,05$.

3.2.1.4. Resultados

No grupo GC não houve efeito na taxa de recuperação de embriões (número total de estruturas coletadas sobre número total de coletas realizadas) conforme a fertilidade do touro [Alta = 39,7% (50/126) vs Baixa = 35,9% (46/128); $P=0,5$]. Porém, houve diferença na taxa de fertilização (número total de estruturas fertilizadas sobre número total de estruturas coletadas) conforme a fertilidade do touro [Alta = 98,0% (49/50) vs Baixa = 78,2% (36/46); $P=0,01$] e na taxa de viabilidade (número total de embriões viáveis sobre número total de estruturas coletadas) conforme a fertilidade do touro [Alta = 88,0% (44/50) vs Baixa = 60,8% (28/46); $P<0,01$]. No GP, houve efeito da fertilidade na taxa de prenhez conforme a fertilidade do touro [Alta = 54,6% (71/130) vs Baixa = 41,2% (54/131); $P=0,03$].

Gráfico 4 - Taxa de recuperação (número total de estruturas coletadas sobre número total de coletas realizadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de recuperação de acordo com a fertilidade do touro ($P=0,5$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

Gráfico 5 - Taxa de fertilização (número total de estruturas fertilizadas sobre número total de estruturas coletadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de fertilização conforme a fertilidade do touro ($P=0,01$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

Gráfico 6 - Taxa de viabilidade (número total de embriões viáveis sobre número total de estruturas coletadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de viabilidade conforme a fertilidade do touro ($P<0,01$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

Gráfico 7 - Taxa de prenhez conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de prenhez conforme a fertilidade do touro ($P=0,03$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

3.2.2. EXPERIMENTO 2B

3.2.2.1. Objetivo

Avaliar a taxa de fertilização e qualidade embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade na SOV.

3.2.2.2. Hipótese

Touros de alta fertilidade possuem maior taxa de fertilização e produzem embriões de melhor qualidade em programas de superovulação.

Figura 6 – Esquema hipotético. Touros de alta fertilidade possuem maior taxa de fertilização e qualidade embrionária em vacas superovuladas.

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

3.2.2.3. Materiais e métodos

Um total de 60 fêmeas bovinas da raça Nelore (*Bos indicus*) receberam um protocolo de superovulação a base de progesterona e estrógeno para serem inseminadas em tempo fixo e posteriormente ter seus embriões coletados. O protocolo consistiu na inserção de um dispositivo de progesterona (P4) e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) no primeiro dia (D0). Do quarto ao sétimo dia do protocolo, as vacas receberam um tratamento de FSH para superestimulação dos folículos ovarianos. O dispositivo de progesterona foi retirado no sétimo dia do protocolo (D7) e a indução da ovulação foi realizada com uma aplicação de GnRH, no D8. Duas inseminações foram realizadas, uma no oitavo dia à tarde (D8,5) e outra no nono dia pela manhã (D9), sendo as colheitas de embriões realizadas no D15.

As colheitas dos embriões foram realizadas pelo mesmo método não cirúrgico do Experimento 2A, entretanto, foi realizado o *flushing* nos dois cornos uterinos. Os filtros de coleta foram lavados no laboratório e as estruturas rastreadas em rastreados em placas de Petri com estereomicroscópio (Olympus, EUA). As estruturas recuperadas foram classificadas conforme seu estágio de desenvolvimento, de acordo com as normas da *International Embryo Technology Society* (IETS) e os embriões viáveis foram congelados para posterior transferência dos mesmos em vacas receptoras de embriões.

Figura 7 – Delineamento experimental com a e distribuição dos grupos.

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

3.2.2.3.1. Análise estatística

Os dados de produção *in vivo* de embriões foram analisados utilizando o PROC GLIMMIX do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.3 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para as análises, foi utilizada a distribuição *Poisson* para variáveis contínuas e distribuição *Binomial* para as taxas. Os efeitos fixos incluídos no modelo foram a fertilidade do touro (alta e baixa) e efeito do touro (3 touros de alta e 3 touros de baixa) de acordo com a variável resposta: taxa de fertilização (total de estruturas fertilizadas sobre total de estruturas coletadas); taxa de viabilidade total (número total de embriões viáveis sobre número total de estruturas coletadas); taxa de viabilidade sobre fertilizados (número total de embriões viáveis sobre número total de estruturas fertilizadas). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média ou em porcentagem. Foi levado em consideração, $P < 0,05$, para diferenças estatísticas entre as variáveis para determinada resposta.

3.2.2.4. Resultados

Houve diferença na taxa de fertilização [alta = 59,0% (154/261) vs baixa = 42,7% (102/239); $P=0,04$], na viabilidade sobre totais [alta = 54,0% (141/261) vs baixa = 38,9% (93/239); $P=0,05$], mas não houve diferença na viabilidade sobre fertilizados [alta = 91,6% (141/154) vs baixa = 91,2% (93/102); $P=0,9$].

Gráfico 8 - Taxa de fertilização (número total de estruturas fertilizadas sobre número total de estruturas coletadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de fertilização conforme a fertilidade do touro ($P=0,04$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

Gráfico 9 - Taxa de viabilidade embrionária (número total de embriões viáveis sobre número total de estruturas coletadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Houve efeito na taxa de viabilidade total conforme a fertilidade do touro ($P=0,05$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

Gráfico 10 - Taxa de viabilidade dos embriões fertilizados (taxa de embriões viáveis sobre os fertilizados) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de viabilidade dos embriões fertilizados conforme a fertilidade ($P=0,9$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

3.2.3. EXPERIMENTO 2C

3.2.3.1. Objetivo

Avaliar a taxa de clivagem e taxa de blastocisto na produção *in vitro* de embriões utilizando touros de alta e baixa fertilidade.

3.2.3.2. Hipótese

Touros de alta fertilidade possuem maior taxa de clivagem e maior produção de blastocistos na PIVE.

Figura 8 – Esquema hipotético. Touros de alta fertilidade possuem maior taxa de clivagem e maior taxa de blastocistos produzidos *in vitro*.

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

3.2.3.3. Materiais e métodos

A produção *in vitro* de embriões foi realizada de acordo com o método descrito por Siqueira et al. (2018). Para tal, ovários provenientes de abatedouro comercial (município de Piracicaba, SP) foram coletados e transferidos ao laboratório em recipiente a 30°C em solução salina 0,9% acrescido de antibiótico. Os folículos, entre 2 e 8 mm, foram aspirados com seringas de 5 ml e agulhas de 21G, sendo o fluido folicular depositado em tubo cônico de 15ml. Após período de decantação de 10 minutos, os *cumulus oophorus* (COCs) foram rastreados e selecionados de acordo com a compactação e quantidade das camadas de células da granulosa e homogeneidade do citoplasma. Os COCs foram lavados, 3 vezes, em meio pré-MIV (TCM199 Hepes – Gibco®, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) - Gibco®, 22 µL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina) e 3 vezes em meio MIV [TCM199 Bicarbonato - Gibco®, suplementado com 10% de SFB - Gibco®, 22 µL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de FSH-Folltropin-V (Vetrepharm, Inc., Belleville, ON, Canada), 50 µg/mL de gonadotrofina coriônica humana (Vetecor Laboratories, Calier, Spain) e 1 µg/mL de 17β-estradiol hidrossolúvel]. Os COCs (20 a 30) foram então incubados em gotas de 90ul de meio MIV, sob óleo mineral (Sigma), por um período de 22-24 horas a 38,5°C, 5% de CO₂ e ar e alta umidade.

Após a maturação, os COCs foram lavados em meio pré-FIV [TCM199 Hepes – Gibco®, suplementado com 0,003% de BSA-V (m/v), 22 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina] e na sequência, em meio Fert-TALP [0,1M NaCl, 3,1 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0,3 mM NaH₂PO₄, 21.6 mM Lactato, 2mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 0,006% de BSA-V (m/v), 22 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina] e distribuídos em ±20 oócitos/gota sob óleo. Neste momento, as amostras de sêmen de cada um dos seis touros foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e submetidas a gradiente de densidade Percoll® (400µl de Percoll® 45% sobre 400µl de Percoll® a 90%, aquecido a 38,5°C), centrifugado por 6 minutos a 9000g. O sedimento foi colocado em 1000ul de meio Fert-Talp para lavagem de resíduo de Percoll®. O sedimento foi recuperado, sendo avaliado a concentração e a motilidade espermática, para cálculo da diluição final de 1 x 10⁶ espermatozoides móveis/ml. Cinco microlitros dessa solução foram utilizadas para inseminação de

cada gota (D0). Os oócitos e espermatozoides foram mantidos por aproximadamente 18 horas a 38,5°C, 5% CO₂ em ar e alta umidade.

Em seguida esse período foi realizado o desnudamento por pipetagem sucessiva. Os presumíveis zigotos (20 a 30) foram colocados em gotas de 60µL de KSOM (Millipore, MR 020P-5D), sob óleo mineral, a 38,5°C, 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ e alta umidade por 8 dias, sendo esse considerado o D1. No D3 foram removidos 30µL de meio KSOM de cada gota e acrescentados 30µL de meio KSOM suplementado com 10% de SFB (5% da concentração final de SFB). No D5, 30µL de meio KSOM suplementado com 5% de FCS foram adicionados em cada gota. A taxa de clivagem (número de embriões clivados/número de oócitos inseminados) foi avaliada no D3 e a taxa de blastocistos (número de blastocisto/número de oócitos inseminados) foi avaliada no D8. A taxa de desenvolvimento embrionário foi definida como o número de embriões que atingiram blastocisto inicial/número embriões clivados.

Figura 9 – Delineamento experimental com a distribuição dos grupos para PIVE.

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

3.2.3.3.1. Análise estatística,

Os dados de produção *in vitro* de embriões foram analisados utilizando o PROC GLIMMIX do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.3 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para as análises, foi utilizada a distribuição *Poisson* para variáveis contínuas e distribuição *Binomial* para as taxas. Os efeitos fixos incluídos no modelo foram a Fertilidade do touro (alta e baixa) e efeito do touro (3 touros de alta e 3 touros de baixa) de acordo com a variável resposta: taxa de clivagem (número total de estruturas clivadas sobre total de oócitos); taxa de blastocistos totais (número total de blastocistos sobre oócitos totais); taxa de blastocistos sobre clivados (número de blastocistos totais sobre número total de estruturas clivadas). Os resultados estão apresentados em porcentagem. Foi levado em consideração, $P < 0,05$, para diferenças estatísticas entre as variáveis para determinada resposta.

Para análise do sêmen foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado com dois tratamentos e 4 repetições. Um total de 6 touros foram distribuídos em dois grupos de acordo com taxa de fertilidade à campo previamente descrita. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Enterprise Guide (v. 7.1; SAS Inst., Cary, NC).

Todos os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento *UNIVARIATE* de acordo com o teste de *Shapiro-Wilk*. Quando a normalidade não foi obtida, os dados foram transformados (*Log10*; *Log natural*; *Raiz quadrada* ou *Arco seno*). *Outliers* foram removidos quando necessário. O efeito foi determinado por ANOVA bi-direccional utilizando *somas de quadrados do Tipo III*.

Variáveis contínuas foram analisadas pelo procedimento *Glimmix* ajustando para distribuição *Gaussian*. No modelo, foram incluídos *grupo* (alta e baixa fertilidade na IATF), *réplicas* (1 a 4) e *interação grupo*réplicas* como efeitos fixos. Para correção dos graus de liberdade das variâncias foi incluída a opção *ddfm = kenwardroger*. Os resíduos foram utilizados como efeito aleatório e *Touro* como *erro termo*. O teste *post hoc* de diferença significativa incluiu ajuste de *Tukey*. Os valores foram apresentados como média e erro padrão da média (EPM). Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,05$.

Vinte e três avaliações foram realizadas para estudo da qualidade do sêmen na PIVE, por meio das análises de citometria de fluxo, cujos parâmetros avaliados foram: alto, baixo e ausência do potencial de membrana (AP, BP e SP,

respectivamente); avaliação da integridade acrossomal – acrossoma íntegro (AL e AI) – e de membrana plasmática – membrana plasmática lesada e íntegra (MPL e MPI); espermatozóides estressados com membrana íntegra e estressados com membrana lesada (EMI e EML), além de não estressados com membrana lesada, tal como com membrana íntegra (NEML e NEMI).

3.2.3.4. Resultados

Não houve diferença na taxa de clivagem [alta = 82,1% (619/754) vs baixa = 81,9% (584/713); $P=0.9$], taxa de blastocisto sobre oócitos (alta = 21,5% (160/754) vs baixa = 21,9% (152/693); $P=0.9$) e taxa de blastocisto sobre clivados (alta = 25,8% (160/619) vs baixa = 26,0% (152/584); $P=0.9$).

Tabela 3 – Média $\pm$ erro padrão dos parâmetros de avaliados por meio da análise computadorizada do sêmen (CASA), dos touros utilizados no experimento 2A, 2B e 2C, agrupados de acordo com a fertilidade.

Parâmetro	Sêmen Bovino (Fertilidade)		P
	Alta	Baixa	
MT (%)	43,8 $\pm$ 3,65 ^b	65,9 $\pm$ 3,3 ^a	0,0007
MP (%)	33,6 $\pm$ 3,69 ^b	48,7 $\pm$ 4,1 ^a	0,0115
VAP (μ m/s)	93,8 $\pm$ 7,9	89,6 $\pm$ 4,3	0,6600
VSL (μ m/s)	81,8 $\pm$ 7,6	75,9 $\pm$ 4,5	0,4334
VCL (μ m/s)	157,5 $\pm$ 11,7	152,8 $\pm$ 6,2	0,8815
ALH (μ m)	6,7 $\pm$ 0,5	6,9 $\pm$ 0,3	0,4506
BCF (Hz)	34,7 $\pm$ 1,1 ^a	31,4 $\pm$ 1,9 ^b	0,0163
STR (%)	85,2 $\pm$ 1,5	82,7 $\pm$ 1,7	0,1822
LIN (%)	52,6 $\pm$ 2,5	49,7 $\pm$ 2,0	0,1584
Rap (%)	37,4 $\pm$ 4,1 ^b	57,1 $\pm$ 4,1 ^a	0,0063
Med (%)	6,3 $\pm$ 0,9	8,75 $\pm$ 1,3	0,1445
Len (%)	15,7 $\pm$ 3,3	16,2 $\pm$ 2,5	0,9000
Estat (%)	40,6 $\pm$ 5,2 ^a	18,0 $\pm$ 2,6 ^b	0,0498

MT: Motilidade total; MP: Motilidade progressiva; VAP: Velocidade de trajeto; VSL: Velocidade progressiva; VCL: Velocidade curvilinear; ALH: Amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF: Frequência de batimento; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; Rap: Espermatozoides com velocidade rápidos; Med: Espermatozoides com velocidade média; Len: Espermatozoides com velocidade lenta; Estat: Espermatozoides estáticos. Letras superescritas (a, b) indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

Gráfico 11 - Taxa de clivagem (número total de estruturas clivadas sobre número total de oócitos) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de clivagem conforme a fertilidade do touro ($P=0,9$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

Gráfico 12 - Taxa de blastocistos totais (número total de blastocistos sobre número total de oócitos) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de blastocistos totais conforme a fertilidade do touro ($P=0,9$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

Gráfico 13 - Taxa de blastocistos por estrutura clivada (número total de blastocistos sobre número total de estruturas clivadas) conforme a fertilidade do touro (alta e baixa). Não houve efeito na taxa de blastocistos por estrutura clivada conforme a fertilidade do touro ($P=0,9$).

Fonte: ZANATTA, G.M., (2019).

4. Discussão

O tempo de viabilidade do sêmen no trato reprodutivo da fêmea deve respeitar um período mínimo para que ocorra o processo de capacitação dos espermatozóides. Contudo, esse período não pode ser excessivamente longo, uma vez que pode inviabilizar a capacidade de fecundação do oócito. Estudos evidenciaram que o tempo médio para que ocorra a ovulação após a retirada do dispositivo em protocolos de sincronização a base de P4 e E2 é próximo à 70h (SALES et al., 2008; CREPALDI, 2009; NEVES, 2010; ANDRADE et al., 2012). Levando em consideração essas informações, estimou-se que no presente estudo (experimento 1) o intervalo entre a inseminação e a ovulação foi de aproximadamente 22 horas para o Grupo 48h e de para 16 horas no Grupo 54h. Roelofs et al. (2006) realizaram experimento no qual inseminaram vacas em diferentes horários referente à ovulação e verificaram que a IA realizada até 12h antes da ovulação não afetou a taxa de fertilização e a qualidade embrionária quando comparada a inseminação realizada 36h antes da ovulação. No presente estudo, o atraso na inseminação não afetou a taxa de prenhez dos touros de alta fertilidade e não aumentou a taxa de prenhez dos touros de baixa fertilidade, rejeitando a hipótese formulada inicialmente.

A interação entre o espermatozóide e o trato reprodutivo da fêmea possui grande importância e pode explicar a diferença de fertilidade entre os reprodutores. Semelhantemente ao que ocorre com o sêmen sexado, que possui um tempo de vida mais curto no trato reprodutivo da vaca (BARUSELLI et al., 2007), touros de baixa fertilidade podem apresentar comportamento parecido. Pfeifer et al. (2019) citaram que espermatozóides que hiperativam mais cedo podem ter um período de sobrevivência menor no oviduto da fêmea comparado àqueles que hiperativam mais tarde. Isto pode ser explicado pelo fato de que a hiperativação ativa a capacitação, aumentando as taxas metabólicas das células, gerando maior influxo de Ca^{2+} e exocitose do acrossoma (BLEIL et al., 1981), reduzindo a capacidade desses espermatozóides de fertilizar os oócitos de vacas que ovulam mais tarde.

Alguns estudos evidenciaram aumento na taxa de prenhez com o atraso do momento da inseminação com sêmen sexado (NEVES, 2010; SALES et al., 2011). Contudo, no presente projeto, a taxa de prenhez se manteve semelhante nos dois momentos da IATF conforme a fertilidade dos touros. Estes resultados indicam que

o atraso no momento da IATF em seis horas, não foi suficiente para estabelecer acréscimo na fertilidade dos touros de baixa fertilidade ou que o fator determinante da fertilidade dos touros utilizados no presente estudo pode não estar relacionado ao tempo de viabilidade do espermatozóide.

A hiperativação é um evento relacionado à capacitação, sendo ambas descritas como necessárias para a fisiologia espermática e, conseqüentemente, para o desprendimento dos espermatozóides da parede do oviduto (GAWTHMEY *et al.*, 2003; ARDON *et al.*, 2016). Esses eventos são regulados por diferentes vias de sinalização (SUAREZ; HO, 2003). Pfeifer *et al.* (2019) acreditam que o ambiente do oviduto seja um dos sinalizadores do início da hiperativação, podendo ser também relacionada a alterações no pH, como descrita por Perry e Perry (2016). Neste estudo, os autores avaliaram a mudança do pH uterino em vacas com ovulação sincronizada e concluíram que há uma diminuição do pH no momento do estro, voltando a aumentar quando se aproxima o momento da ovulação. A reação acrossomal pode apresentar alterações conforme modificações no pH e a redução do pH pode reduzir o metabolismo espermático no início do estro e acelerar com o aumento do pH próximo da ovulação, como estudado por Rodríguez-Martínez (2007). Como revisado por Coy *et al.* (2012), um grande número de pesquisas sugere que as alterações de pH, temperatura e concentração do fluido do oviduto alteram a função espermática, incluindo mudanças na membrana e na hiperativação. Esses fenômenos podem sinalizar o início da hiperativação e capacitação, permitindo que o espermatozóide esteja preparado para a fertilização no momento mais próximo da ovulação. Desta forma, novas pesquisas podem ser elaboradas na tentativa de evidenciar a viabilidade do sêmen de touros de baixa fertilidade às alterações de pH no momento da fertilização.

Estudos recentes foram indicativos de que touros de baixa fertilidade apresentam diferentes perfis de miRNA que podem explicar a baixa fertilidade à IATF (ALVES, 2019). Os autores verificaram que, apesar de não se observar diferença na taxa de blastocistos, um dos miRNA, o miR-216b, foi encontrado em maior abundância no sêmen e nos embriões produzidos de touros de baixa fertilidade. Esses achados podem estar relacionados à regulação da taxa de proliferação celular inicial. Em outro estudo, Al Naib *et al.* (2011) verificaram que touros de baixa fertilidade a campo tiveram menor capacidade de fertilizar o oócito *in vitro*, mas não encontraram diferença na atividade metabólica mitocondrial entre os

touros. Esses autores citam que esta diferença pode estar relacionada a danos celulares do processo de congelamento e descongelamento do sêmen. Desta forma, diversos fatores podem interferir na fertilidade dos touros, sendo necessários mais estudos para compreendê-los.

A diferença na fertilidade entre os touros já foi descrita por diversos autores (OLIVEIRA, 2012; OLIVEIRA 2013; BATISTA, 2016; NOGUEIRA, 2019). No estudo realizado por Batista *et al.* (2016) foram utilizados dados retrospectivos de inseminações em gado de leite para evidenciar a fertilidade de touros na IA. Mais de 850.000 dados de IA foram comparados entre touros e métodos de IA (observação de estro ou IATF). Os autores encontraram diferença de fertilidade entre touros. Entretanto, não houve diferença de fertilidade de acordo com o método utilizado (observação de estro ou IATF), independente da fertilidade do touro (baixa, média e alta; Gráfico 14). Desta forma, esses resultados reforçam a utilização dos protocolos de IATF para a estudos de fertilidade, além de ser de fácil aplicação.

Gráfico 14. Prenhez por IA (P/IA) por observação de cio (EAI) ou inseminação em tempo fixo (TAI), de acordo com a fertilidade do touro (baixa, média e alta). **Fonte:** Adaptado de Batista, *et al.* (2016).

No presente estudo, a hipótese de que touros de alta fertilidade possuem maior taxa de fertilização, melhor qualidade embrionária e maior taxa de prenhez foi confirmada. No experimento 2A e no experimento 2B, a diferença na taxa de

fertilização e na qualidade embrionária entre touros de alta fertilidade e baixa fertilidade indicam que existem comprometimentos durante o processo de fertilização. A taxa de fertilização encontrada no experimento 2A é semelhante à encontrada por Sartori et al. (2002) em um estudo que trabalharam com novilhas inseminadas com touros de alta fertilidade (taxa de fertilização= 100,00%; 32/32). Dalton et al. (2001) também encontrou alta taxa de fertilização quando utilizou monta natural (taxa de fertilização= 98,00%). Ainda, Naiba et al., 2011 verificaram que os espermatozóides de touros de baixa fertilidade apresentaram capacidade reduzida de penetrar no muco, bem como de fertilizar oócitos *in vitro*. No entanto, uma vez que a fertilização ocorreu, os autores verificaram que o desenvolvimento subsequente do embrião até o estágio de blastocisto prosseguiu normalmente, independentemente do nível de fertilidade do touro. Essas informações corroboram com os resultados do experimento 2B, que não verificou diferença na taxa de viabilidade sobre estruturas fertilizadas conforme a fertilidade dos touros.

Ao realizar um estudo comparando sêmen sexado com sêmen convencional em superovulação em novilhas Holandesas, Sartori et al. (2004) encontraram diferença na taxa de fertilização de acordo com o sêmen utilizado e maior taxa de embriões degenerado para o grupo do sêmen sexado. De acordo com os resultados do presente estudo, Ortega et al. (2018) obtiveram maior taxa de fertilização em vacas superovuladas quando utilizou touros de alta fertilidade comparados com touros de baixa fertilidade. Entretanto, não encontraram diferença na qualidade embrionária quando comparado somente as estruturas fertilizadas. De acordo com estes resultados, há uma indicação de que a diferença na fertilidade de touros pode estar relacionada à fertilização e não ao desenvolvimento embrionário.

Em estudo que avaliou a taxa de prenhez à IATF com parâmetros de hiperativação do sêmen, Pfiefer et al. (2019) analisaram a hiperativação dos espermatozóides (H+, mais hiperativados; e H-, não hiperativados) para posteriormente utilizar em um programa de IATF. Para a formação dos grupos, o diâmetro do maior folículo foi mensurado no momento da IATF e as vacas divididas em dois grupos: vacas com ovulação antecipada (EO; Folículo $\geq$ 13mm) e vacas com ovulação tardia (LO; Folículo < 13mm). O sêmen distribuído igualmente nos dois grupos de ovulação, formando um fatorial 2 x 2 (EOH-, EOH+, LOH- e LOH+). O grupo LOH+ (52,1%; 50/96) teve menor taxa de prenhez do que os grupos EOH+ (66,3%; 59/89) e LOH- (72,7%; 48/66), o que indica que o sêmen mais hiperativado

possui menor tempo de vida no trato reprodutivo da fêmea do que o sêmen menos hiperativado. Como discutido pelos autores, a hiperativação esta relacionada com alguns parâmetros obtidos no CASA, como velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e linearidade (LIN). Contudo, no presente estudo não foram encontradas diferenças estatísticas nessas variáveis cinemáticas do sêmen utilizado nos experimentos 2A, 2B e 2C (Tabela 2). Esses resultados apontam que os touros de alta e de baixa fertilidade utilizados no presente estudo não apresentavam diferenças nos parâmetros seminais relacionados com a hiperativabilidade.

No experimento 2C, não se confirmou relação entre a fertilidade de touros *in vivo* com a produção *in vitro* de embriões. Ortega et al. (2018) também não encontraram diferença na taxa de clivagem entre touros de alta e baixa fertilidade, mas verificaram diferença na taxa de blastocisto (Alta = 42,6% vs Baixa = 32,6%; $P < 0,05$). Alves (2018) verificou que, apesar de igual taxa de blastocistos, os embriões proveniente dos touros de alta fertilidade possuem mais quantidade de células no dia 8 da PIVE do que os touros de baixa fertilidade. Ward et al. (2001) realizaram experimento para verificar a correlação de fertilidade *in vivo* e *in vitro*, mas não encontraram diferença entre a produção de blastocistos e a fertilidade a campo dos touros. Os autores concluem que não existe relação na fertilidade entre essas duas biotecnologias. Como revisado por Siqueira, 2016, diversos grupos de pesquisa estudaram a correlação da fertilidade *in vivo* com a fertilidade *in vitro*, porém os resultados são inconsistentes. Alguns estudos evidenciaram correlação positiva, outros correlação negativa e outros não encontraram correlação. Nestes estudos citados houve elevada variação por touro na produção *in vitro* de embriões.

5. CONCLUSÃO

A busca incansável por predizer a fertilidade de touros ainda necessita de estudos para ser melhor compreendida. Com os resultados obtidos nos experimentos desse estudo, foi possível verificar que a análise seminal apresenta baixa relação com a fertilidade dos touros à campo. A IATF realizada mais próxima do momento da ovulação não incrementou a taxa de prenhez nos touros de baixa fertilidade, indicando que o comprometimento na fertilidade pode estar associado a outro fator. Os resultados dos experimentos 2A e 2B, nos quais foram avaliados a taxa de fertilização *in vivo*, sugerem que a diferença na taxa de prenhez dos touros testados está relacionada à fertilização dos oócitos e não no desenvolvimento dos embriões. Diferentemente do esperado, a PIVE não mostrou relação com a fertilidade dos touros à campo.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI-ARPANAHI, R.; MOROTA, G.; PEÑAGARCIANO, F. Prediction bull fertility using genomic data and biological information. **Journal Dairy Science**, v. 100, p. 9656-9666, 2017.
- AITKEIN, R.J. Sperm function test and fertility. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 69-75, 2006.
- AL NAIB, A.; HANRAHAN, J.P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low fertility. **Theriogenology**, v. 76, p.161-167, 2011.
- ALVES, M. B. R. **Perfil de microRNAs presentes no sêmen e embriões bovinos e sua relação com a fertilidade**. 2018. São Paulo, Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.
- AMANN, R.P.; SAACKE, R.G.; BARBATO, G.F.; WABERSKI, D. Measuring male-to-male differences in fertility or effects of semen treatments. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 6, p.255-286. 2018.
- ANDRADE, B. H.A.; FERRAZ, P.A.; RODRIGUES, A.S.; LOIOLA, M.V.G.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L. Eficiência do cipionato de estradiol e do benzoato de estradiol em protocolos de indução da ovulação sobre a dinâmica ovariana e taxa de concepção de fêmeas nelore inseminadas em diferentes momentos. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 4, p.70-78, 2012.
- ARDON, F.; ROSS, D.M.; HU, F.; DEUTSCH, Z.I.; TUNG, C.; WU, M.; SUAREZ, S.S. Dynamics of bovine sperm interaction with epithelium differ between oviductal isthmus and ampulla. **Biology of Animal Reproduction**, v. 95, p.1-7, 2016.
- BARUSELLI, P. S. Avaliação do Mercado de IATF no Brasil. **Boletim Eletrônico – VRA**. Edição 1, 2019a. <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra>.
- BARUSELLI, P. S. IATF gera ganhos que superam R\$ 3,5 bilhões nas cadeias de produção de carne e de leite. **Boletim Eletrônico – VRA**. Edição 2, 2019b. <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra>.
- BARUSELLI, P. S.; CATUSSI, B. L .C.; ABREU, L. A.; ELLIFF, F. M.; SILVA, L. G.; BATISTA, E. S.; CREPALDI, G. A. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Gramado, **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 308-314, 2019c.
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; RIBEIRO JÚNIOR, M.; SILVA, R. C. P.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.. Como otimizar a eficiência reprodutiva de programas de inseminação artificial e transferência de embriões em bovinos: reprodução de precisão. In **6 SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA**, Londrina, p.76-100, 2014.
- BARUSELLI, P. S.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S.; AYRES, H.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; ARRUDA, R.P. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 137, n. 3, p. 374-381, 2007.

BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, P. D.; RIVERA, H.; CABRERA, V.; WILTBANK, M. C.; BARUSELLI, P. S.; SOUZA, A. H. Field fertility in Holstein bulls: can type of breeding strategy (artificial insemination following estrus versus timed artificial insemination) alter service sire fertility? **Journal Dairy Science**, v. 99, n. 3, 2016.

CHENOWETH, P.J.; MCPHERSON, F.J. Bull breeding soundness, semen evaluation and cattle productivity. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p.32-36, 2016.

COY, P; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; VISCONTI, P.E.; AVILÉS, M. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. **Reproduction and Fertility**, v. 144, p.649-660. 2012.

CREPALDI, G.A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2009. São Paulo, Dissertação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

DALTON, J.C.; NADIR, S.; BAME, J.H.; NOFTSINGER, M.; NEBEL, R.L.; SAACKE, R.G. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 84, p. 2413-2418, 2001.

DES DANN, J.H.G; JONG, G.; LANSBERGEN, L.M.T.E.; VAN WAGTENDOK-DE LEEW, A.M. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. **Journal Animal Science**, v. 81, p.1714-1723, 1998.

DRUART, X.; GRAAF, S. Seminal plasma proteomes and sperm fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 194, p. 33-40, 2018.

FOOTE, R.H.; KAPROTH, M.T. Sperm numbers insemination in dairy cattle and nonreturn rates revisited. **Journal Animal Science**, v. 80, p.3072-3076, 1997.

FOTTE, R.H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v.75, p. 119-139, 2003.

FRANCO, G.A.; PERES, R.F.G.; MARTINS, C.F.G.; REESE, S.T.; VASCONCELOS, J.L.M; PHOLER, K.G. Sire contribution to pregnancy loss and pregnancy-associated glycoprotein production in Nelore cows. **Journal Animal Science**, v. 96, p. 632-640, 2018.

HOLDEN, S.A.; FERNANDEZ-FUERTE, B.; MURPHY, C.; WHELAN, H. O'GORMAN, A.; BRENNAN, L.; BUTLER, S.T.; LONERGAN, P.; FAIR, S. Relationship between in vitro sperm functional assessments, seminal plasma composition, and field fertility after AI with either non-sorted or sex-sorted bull semen. **Theriogenology**, v. 87, p. 221-228, 2017.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) – Secretaria de Política Agrícola. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 Projeções de Longo Prazo**. Ed. 9a. Brasília, 2018.

MAZIERO, R. R. D.; CRESPILO, A. M.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; DELL'AQUA

JR, J. A.; PAPA, F. O. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade.

Revista Brasileira de Reprodução Animal Supl, v. 6, p. 5–10, 2009. MOCÉ, E. & GRAHAM, J.K. *In vitro* evaluation of sperm quality. **Animal**

Reproduction Science, v.105, p. 104-118, 2008.

NEVES, K. A. L. **Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado**. 2010. São Paulo, Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SIQUEIRA, A. F. P. **Efeito de atributos espermáticos na produção in vitro de embriões bovinos**. 2016. São Paulo, Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

NOGUEIRA, E.; SILVA, C.S.; SILVA, J.C.B.; GARCIA, W.R.; NACHE, N.A.; SILVA, K.C.; POTIENS, J.R.; COSTA E SILVA, E.V. Qualidade do sêmen e resultados em programas de IATF em bovinos. IV REUNIÃO ANUAL DA ASSOCIACAO BRASILEIRA DE ANDROLOGIA ANIMAL, 4., 2019, Goiânia, GO. **Anais da IV Reunião Annual da Associação Brasileira de Andrologia Animal**, Goiânia, 2019, p.28-37.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; ADRADE, A.F.C.; CELEGHINI, E.C.C.; REEB, P.D.; MARTINS, J.P.N; SANTOS, R.M.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; MONTEIRO, F.M.; LIMA, V.F.M.H. Assesment of in vitro sperm characteriscts and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science**, v. 137, p 145-155, 2013.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; CELEGHINI, E.C.C.; SANTOS, R.M.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; OLIVEIRA, C.S.; LIMA, V.F.M.H. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteriscts following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. **Livestock Science**, v. 146, p. 38-46, 2012.

ORTEGA, M. S.; MORAES, J. G. N.; PATTERSON, D. J.; SMITH, M. F.; BEHURA, S. K.; POOCK, S.; SPENCER, T. E. Influences of sire conception rate on pregnancy establishment in dairy cattle. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 6, p.1244-1254, 2018.

PALMA, G.A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embyos. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 33, p. 257-262, 2004.

PERRY, G. A.; PERRY, B. L. Effects of periovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, p. 333-338, 2008.

PFEIFER, L.F.M.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.S.; POTIENS, J.R. Effect of sperm kinematics and size of follicle at ovulation on pregnancy rate after timed AI of beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 201, p. 55-62, 2019.

REZENDE, F.M.; NANI, J.P.; PEÑAGARICIANO, F. Genomic prediction of bull

fertility in US jersey dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.102, n.4, p.3220-3240, 2019.

RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 68S, p. S138-S146, 2007.

ROELOFS, J.B; VAN EERDENBURG, F.J.C.M.; SOED, N.M.; KEMP, B. Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 63, p. 1366-1377, 2005.

SAACKE, R.G. Insemination factors related to time AI in cattle. **Theriogenology**, v. 70, p. 479–484, 2008.

SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S.; NEBEL, R.L.; BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 663-667, 2000.

SALES, J.N.S.; NEVES, K.A.L.; SOUZA, A.H.; CREPALDI, G.A.; SALA, R.V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E.P.; DE FARIA, M.; SÁ FILHO, M.F.; BARUSELLI, P.S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 76, p. 427-435, 2011.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O.; MAIO, J. R. O.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, 2012.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2803-2812, 2002.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTER, J. N.; CARAVIELLO, D.Z.; GEIGER, L. N.; SCHENK, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization rate and embryonic quality in superovulated Holstein heifers artificial inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 86-90, 2004.

SILVA, L.F.P; DINIZ-MAGALHÃES, J.; SOUSA, D.O.; CÔNSOLO, N.R.B.; VIVIANE, B.F.; SOUSA, R.T.; FRASSETO, M.O.; SOUZA, J.M. Sistema intensivo de produção para cria, recria e engorda: avaliação produtiva e econômica. In SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 6., 2014, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, 2014, p.1-14.

SIQUEIRA, A.F.P.; CASTRO, L.S.; ASSIS, P.M.; BICUDO, L.C.; MENDES, C.M.; NICHI, M.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Sperm traits on *in vitro* production (IVP) of bovine embryos: Too much of anything is good for nothing. **PlosOne**, v.13, 2018.

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

149-179, 2002.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDIAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p.47-55, 2001.