



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO DE RUMINANTES**

FERNANDO ROBERTO PEREIRA

Relação da viabilidade do sêmen pós-descongelamento e a taxa de gestação em programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos

Arapongas
2016

FERNANDO ROBERTO PEREIRA

Relação da viabilidade do sêmen pós-descongelamento e a taxa de gestação em programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos

Dissertação apresentada à (UNOPAR),
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Saúde e Produção de
Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guiselli Lopes

Arapongas
2016

Ficha catalográfica elaborada, com dados fornecidos pelo (a) autor (a)

Biblioteca UNOPAR / Arapongas - Maria Luci Juliani Grano CRB – 9/776

PEREIRA, Fernando Roberto

Relação da viabilidade do sêmen pós-descongelamento e a taxa de gestação em programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos.

Arapongas: UNOPAR, 2016.

45p.

Orientador: Flávio Guiselli Lopes

Dissertação (Mestrado) UNOPAR - Medicina Veterinária - Saúde e Produção de Ruminantes, 2016.

1. Medicina Veterinária - Dissertação de mestrado – Unopar. 2. Saúde e Produção de Ruminantes. 3. Análise do sêmen computadorizada (CASA). 4. Citometria de fluxo 5. Inseminação artificial – Raça Nelore. 6. Reprodução Animal – Sêmen. 7. Qualidade espermática. I. Lopes, Flávio Guiselli. II. Título.

CDU: 619:636

FERNANDO ROBERTO PEREIRA

Relação da viabilidade do sêmen pós-descongelamento e a taxa de gestação em programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes, área e concentração em fisiopatologia e biotécnicas da reprodução em ruminantes, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Flávio Guiselli Lopes
Universidade Norte do Paraná (UNOPAR)

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Prof. Dr. Filipe Alexandre Boscaro de Castro
Universidade Norte do Paraná (UNOPAR)

Arapongas, 12 de agosto de 2016.

“É melhor conseguir sabedoria do que ouro; é melhor ter conhecimento do que prata”.

Provérbios, 16:16

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, à minha esposa Waenya e meu filho Fabrício, por estarem ao meu lado sempre apoiando nos momentos de decisão. Aos meus pais, Fernanda e Roberto, pelo exemplo de vida, educação, fé, batalha e dedicação, durante todo meu trajeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela existência, oportunidades e presença em meu viver, por nos conceder família e nos proteger nesta unidade.

Agradeço ao professor Flávio Guiselli Lopes, por me receber e aceitar como orientado, por acreditar e confiar em nosso projeto, pelos ensinamentos, pelas inúmeras horas de dedicação e por colaborar em meu crescimento pessoal e conhecimento técnico, pela motivação e por estimular e acompanhar de perto nosso interesse na pesquisa e desenvolvimento de uma pecuária moderna e sustentável. Muito Obrigado!

Agradeço à professora Maria Isabel Mello Martins, pela imensa colaboração na co-orientação de nosso trabalho, pelas horas dedicadas ao projeto, por aceitar e motivar nosso desafio. Agradeço pela clareza de seus ensinamentos e paciência com meus questionamentos e incertezas, pelo apoio de sua equipe no REPROA – UEL, em especial à mestrande Anne Kemmer Souza, que muito nos ajudou durante as pesquisas.

Muito Obrigado!

Agradeço ao Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal da Central Seleon, ao José Roberto Potiens e ao Bruno Grubisich, por acreditar em nosso projeto e ampliar sua utilidade, pelas análises realizadas, pelos equipamentos e insumos destinados ao projeto e principalmente pela confiança e dedicação até aqui.

Agradeço ao Grupo HoRa Agronegócio, ao amigo e colega Fábio Mauro Segabinazzi Júnior e ao Sr José Roberto Hofig Ramos, por acreditar no projeto, por fornecer todas as informações e permitir nosso ingresso e acompanhamento dos trabalhos efetuados pela equipe da GERAEMBRYO na Fazenda Santa Rosa II, Brasilândia/MS.

Ao professor Bruno Humberto Basile, pelo exemplo e motivação que fizeram com que buscássemos este caminho tão seletivo de retorno aos bancos da Universidade e ao mundo acadêmico.

Agradeço aos professores da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), em especial ao professor Werner Okano, por me receberem como aluno do curso de pós-graduação, pelos ensinamentos e dedicação para esta formação.

Ao professor Dr. Rodrigo Pescin, do Departamento de Estatística da UEL, por colaborar com as análises e esclarecer nossas dúvidas.

Agradeço aos membros da banca de defesa, professora Dra. Fabiana Ferreira de Souza e professor Dr. Filipe Alexandre Boscaro de Castro, por participarem deste importante momento em minha carreira e dedicarem seu tempo para contribuir com este trabalho.

MUITO OBRIGADO!

PEREIRA, Fernando Roberto. **Relação da viabilidade do sêmen pós-descongelamento e a taxa de gestação em programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos**. 2016. 45 páginas. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2016.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento e a taxa de gestação em fêmeas bovinas da raça Nelore após inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizadas 37 partidas de sêmen convencional, de 16 touros da raça Nelore e 3 touros da raça Aberdeen Angus, comprovadamente férteis. Foram inseminadas 4.171 fêmeas multíparas e primíparas da raça Nelore, distribuídas em lotes de aproximadamente 150 animais, de acordo com o programa de IATF estabelecido na propriedade rural. Todas as fêmeas foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF e foram inseminadas pela mesma equipe técnica. Doses de sêmen das mesmas partidas foram descongeladas a 37°C e avaliadas em microscópio óptico quanto a morfologia, motilidade e vigor, no sistema CASA quanto a cinética espermática e através da citometria de fluxo foram avaliados a integridade da membrana plasmática e função mitocondrial. Na análise estatística pela correlação de Pearson, foi verificada correlação positiva entre as variáveis motilidade e motilidade progressiva ($R= 0,940$; $p < 0,001$); velocidade de trajeto e velocidade progressiva ($R= 0,869$; $p < 0,001$); linearidade e retilinearidade ($R= 0,928$; $p < 0,001$). Entretanto, não foi observada correlação direta entre nenhuma das análises seminais e os resultados de fertilidade (taxa de gestação). Por meio da análise de Cluster e das combinações entre as avaliações seminais, foi verificada a formação de quatro agrupamentos de boa qualidade ($>0,5$), na combinação entre velocidade progressiva, atividade mitocondrial e taxa de gestação. Conclui-se que nenhum parâmetro considerado isoladamente influencia o resultado da taxa de gestação e os resultados da análise seminal não são suficientes para predizer a capacidade fecundante do sêmen congelado.

Palavras-chave: análise de sêmen computadorizada (CASA); citometria de fluxo; fertilidade; qualidade espermática; bovina.

PEREIRA, Fernando Roberto. **Ratio of thawed semen viability and gestation rate in a fixed-time artificial insemination program (TAI) in cattle.** 2016. 45 páginas. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2016.

The aim of this study was to evaluate the relationship of thawed bovine semen and pregnancy rates in Nelore females after artificial insemination in fixed time (TAI). Thirty seven conventional semen straws were used from 16 Nelore bulls and 3 bulls Aberdeen Angus breed, that had proven fertile. Four thousand, one hundred and seventy one Nelore cows were inseminated, distributed in groups of 150 animals, according to the TAI program established on farm. All females were subjected to same TAI protocol and were inseminated by same technical team. The straws were thawed at 37 °C, evaluated by light microscopy as morphology, motility and progressive motility, and the CASA system were used for sperm kinetics. The integrity of spermatic membrane and mitochondrial function were evaluated through flow cytometry. Statistical analysis has been done, and the Pearson correlation, positive correlation was found between the variables motility and progressive motility ($R = 0.940$, $p < 0.001$); path velocity, progressive velocity ($R = 0.869$, $p < 0.001$); linearity and straightness ($R = 0.928$, $p < 0.001$). However, there was no direct correlation between any of seminal analysis and fertility outcomes (pregnancy rate). Through Cluster analysis and combinations between semen evaluations, it was verified formation of four good quality clusters (> 0.5), with combination of progressive speed, mitochondrial activity and pregnancy rate. It is concluded that no parameter considered in isolation influence the result of the pregnancy rate and the results of semen analysis are not enough to predict the fertilizing capacity of frozen semen.

Keywords: computer analysis (CASA); flow cytometry; fertility; sperm quality; bovine

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Parâmetros mínimos para motilidade progressiva e vigor espermático de sêmen bovino pós-descongelção.....	16
Quadro 2.	Parâmetros mínimos de defeitos dos espermatozoides no sêmen bovino congelado.....	16
Quadro 3.	Parâmetro mínimo de motilidade progressiva para os exames complementares de sêmen bovino pós-descongelção.....	17
Quadro 4.	Parâmetros mínimos de qualidade de sêmen sexado bovino pós-descongelção.....	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Médias (\pm desvio padrão) das análises seminais, considerando as raças Nelore e Angus.....	35
Tabela 2.	Número de fêmeas inseminadas, e resultados de gestação utilizando o sêmen congelado de Nelore e Angus.....	35
Tabela 3.	Resultados da correlação de Pearson (r), valor de p e de n entre as análises laboratoriais do sêmen e o resultado de taxa de gestação.....	36
Tabela 4.	Cinco exemplos dos resultados das avaliações espermáticas e taxa de gestação pela análise de cluster.....	37
Tabela 5	Representação do agrupamento de melhor resultados nas análises de Cluster.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
≥	Maior e igual
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
ATP	Adenosina Trifosfato
BE	Benzoato de estradiol
CASA	Sistema computadorizado de avaliação espermática
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CE	Cipionato de estradiol
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
D	Dia
DIB	Dispositivo intravaginal bovino
DIC	Contraste diferencial de fase
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
g	Gramas
ha	Hectare
HO	Teste hiposmótico
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IM	Intramuscular
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
MSD	Merck Sharp & Dome
N	Número
P4	Progesterona
PGF _{2α}	Prostaglandina
S	Segundo
TTR	Teste de termoresistência rápido
UA	Unidade animal
UNOPAR	Universidade Norte do Paraná
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA - CONTEXTUALIZAÇÃO	13
2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA).....	13
2.1.1 A inseminação artificial no Brasil.....	13
2.1.2 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF).....	13
2.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE SEMINAL.....	14
2.2.1 Qualidade do sêmen congelado.....	14
2.2.2 Evolução das análises laboratoriais.....	15
2.2.3 Padronização e normatização da produção comercial de sêmen congelado no Brasil.....	16
2.2.4 Análise <i>in vitro</i> de sêmen pós-descongelamento.....	17
REFERÊNCIAS.....	20
3 HIPÓTESE	26
4 OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo geral.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5 ARTIGO CIENTÍFICO	27
5.1 INTRODUÇÃO.....	29
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.2.1 Aspectos éticos.....	31
5.2.2 Animais e local.....	31
5.2.3 Análise do sêmen.....	31
5.2.4 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF).....	33
5.2.5 Diagnóstico de gestação.....	34
5.2.6 Análise estatística.....	34
5.3 RESULTADOS.....	35
5.4 DISCUSSÃO.....	38
5.5 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma das técnicas mais simples e de baixo custo empregada na reprodução de bovinos, e a que apresenta melhor resultado nos programas de melhoramento genético de rebanhos, com a utilização de sêmen de reprodutores de comprovado valor genético. Apesar de sua aparente simplicidade, a técnica requer um criterioso e rígido controle nas suas diferentes etapas, que vão da seleção dos reprodutores doadores de sêmen, passando pelos processos tecnológicos de congelamento de sêmen, pelo controle sanitário e ginecológico das matrizes, até o treinamento do inseminador (OHASHI, 2002).

Atualmente no Brasil, o número de fêmeas bovinas inseminadas corresponde a 12%, ou seja, dos 70 milhões de animais em idade reprodutiva e disponíveis para reprodução, apenas 8,4 milhões são submetidos à técnica (ASBIA, 2015).

A expansão do rebanho brasileiro, nas últimas décadas, se realiza principalmente nas regiões mais distantes das principais capitais, no Centro-Oeste e Norte do país, com destaque para os estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará e Goiás. Nestas regiões, o uso da IA em tempo fixo (IATF) se torna a melhor estratégia para o melhoramento genético bovino e, conseqüente, melhor produção e produtividade de carne (IBGE, 2014). Além disso, graças à utilização da IATF, as vendas e a utilização de sêmen congelado cresceram substancialmente na última década (CREPALDI, 2009).

Apesar dos grandes avanços, as taxas de gestação obtidas com sêmen bovino congelado têm apresentado grande variabilidade (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003). Desta forma, visando um melhor aproveitamento da técnica e conseqüentemente melhorando a viabilidade financeira, há a necessidade de um método eficiente para estimar a fertilidade de touros doadores de sêmen (DEN DAAS, 1998). Sob este aspecto, o desenvolvimento de provas *in vitro*, visando avaliar com maior acurácia o desempenho de amostras de sêmen, tem sido a meta de numerosos programas de pesquisa. Dentre as análises utilizadas pode-se destacar o sistema computadorizado de avaliação da cinética espermática (CASA), teste hiposmótico (HO), teste de integridade de membrana plasmática, além do teste de termorresistência rápido (TTR),

atualmente em desuso. Embora nenhuma técnica de avaliação, isoladamente, apresente sensibilidade suficiente para a determinação da fertilidade, a combinação dos diversos métodos tem agregado maior precisão para a estimativa do potencial de fertilização das amostras de sêmen congelado (PAPA et al., 2008).

Em vista disso, o objetivo do presente estudo é buscar uma correlação entre as análises, objetiva e subjetiva, de sêmen descongelado de bovinos com a taxa de prenhez em programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) em fêmeas Nelore.

2 REVISÃO DE LITERATURA – CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA)

A inseminação artificial (IA) é definida como a deposição de espermatozoides no aparelho reprodutor feminino por meios de técnicas artificiais (BARBOSA; MACHADO, 2008). A utilização de sêmen congelado bovino para IA representa a principal biotécnica reprodutiva para o melhoramento genético animal (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009).

2.1.1 A inseminação artificial no Brasil

As primeiras IAs em bovinos no Brasil datam da década de 30, as quais fomentaram as atividades em reprodução por meio de cooperativas na década de 50. Com um avanço técnico e comercial importante, proporcionaram a implantação das “centrais de congelamento de sêmen” na década de 70 (SEVERO, 2015).

A partir de então, a IA tem sido implementada em combinação com programas de seleção genética, que incluem testes de progênie e avaliação de desempenho, contribuindo de maneira significativa para a produtividade de carne no Brasil (BARBOSA; MACHADO, 2008).

Segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), em 1981 o número de doses de sêmen no mercado era de 1,5 milhão, chegando a 6,9 milhões no ano 2.000. Em 2013, atingiu 13 milhões de doses e, em 2014 foram 14,2 milhões de doses movimentadas, sendo que 12 milhões em venda total efetiva. Já, em 2015, o balanço geral do movimento de sêmen foi de 12,6 milhões de doses (ASBIA, 2015).

Na pecuária de corte, os três principais estados brasileiros em utilização de doses comercializadas ao ano, tem sido o Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, seguidos pelo Rio Grande do Sul, Pará e Minas Gerais (ASBIA, 2015).

2.1.2 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

Em diferentes partes do mundo tem-se relatado baixas taxas de serviço em animais submetidos a IA, devido a falhas na detecção do estro e alta incidência de anestro pós-parto (CREPALDI, 2009). Pesquisadores

brasileiros, em 2004, afirmaram que as fêmeas *Bos taurus indicus*, possuíam taxas de gestação inferiores, devido a grande ocorrência de estro noturno e a sua curta duração (BARUSELLI et al., 2004).

A técnica de IATF, por sua vez, reduz as perdas por falha na detecção do estro e controlam o anestro pós-parto (MENEGETTI et al., 2009). Devido à capacidade de controlar boa parte destas ocorrências, a IATF é apontada como grande responsável pelo aumento do número de vacas inseminadas no Brasil (BARUSELLI et al., 2012).

Na última década, tem sido observado um crescimento substancial da utilização de IA no Brasil. A popularização das técnicas de sincronização da ovulação é a grande responsável por este crescimento (RODRIGUES et al., 2013).

ARRUDA et al. (2012), relataram diversos estudos sobre o controle hormonal do ciclo estral das fêmeas bovinas e o emprego da IA com sêmen congelado. Outros trabalhos têm sido realizados com diferentes fármacos, protocolos e momentos de inseminação (ARRUDA et al., 1997; GARCIA et al., 1999; BARROS e ERENO, 2004; BÓ et al., 2004; MADUREIRA et al., 2004; BARUSELLI et al., 2006; NOGUEIRA e BARROS, 2006).

2.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE SEMINAL

2.2.1 Qualidade do sêmen congelado

A fertilidade bovina possui aspectos multifatoriais, e o sêmen utilizado em programas de IATF pode ser considerado um dos vários fatores para a excelência da técnica. Assim, vários estudos buscam informações que possam prever a capacidade fecundante dos espermatozoides e as melhores associações entre os testes laboratoriais estruturais e funcionais. Entretanto, a falta de um padrão para as análises das partidas pode influenciar diretamente o processo e a fertilidade dos rebanhos, causando perdas econômicas (ARRUDA et al., 2010; 2012).

Para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua poucos defeitos morfológicos, atividade metabólica e membranas íntegras após a descongelação (ARRUDA et al., 2012).

Um percentual significativo das perdas se deve a subfertilidade dos touros. As partidas de sêmen congelado de um mesmo touro podem variar em qualidade, pois mesmo touros considerados férteis podem ter momentos de subfertilidade (SELLEN et al., 2015).

2.2.2 Evolução das análises laboratoriais

Nos anos 60, padrões de sêmen congelado já eram requeridos para uma boa fertilidade (SULLIVAN e ELLIOT, 1968). Nos anos 70, análises laboratoriais tentavam prever os resultados do sêmen a campo, como o teste de termo resistência (TTR) ou incubação (JONDET e RABADEUX, 1977).

Posteriormente, nos anos 90, os efeitos das alterações morfológicas espermáticas, nos índices de fertilidade foram estudados (SAACKE, 1990) e foi descrita a correlação entre a morfologia espermática e a fertilidade a campo (CORREA et al., 1997).

Embora as avaliações de análise do movimento espermático de modo subjetivo e a relação com a fertilidade tenham sido descritas por vários pesquisadores como importantes para prever a fertilidade do sêmen (OLDS-CLARKE, 1996; JANUSKAUSKAS et al., 2000; BRAUNDMEIER e MILLER, 2001; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005; SOZÁNSKA et al., 2005), a subjetividade diminui a repetibilidade e acurácia (BERGSTEIN et al., 2014).

Na busca de melhores técnicas, diversos sistemas de análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados. Estudos tem buscado determinar a relevância das análises espermáticas objetivas na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides *in vitro* e *in vivo* (FARREL et al., 1998; ZHANG et al., 1999; VERSTEGEN et al., 2002; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005; ARRUDA et al., 2010; 2011).

A integridade de membrana do espermatozoide pode ser avaliada por diversas técnicas e equipamentos, como colorações supravitais, testes de osmolaridade, microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003). As técnicas de fluorescência têm sido utilizadas para correlacionar a avaliação da integridade do acrossomo com a fertilidade *in vivo* (JANUSKAUSKAS et al., 2000) e na avaliação do grau de capacitação espermática e a correlação com a fertilidade *in vitro* (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

A avaliação da integridade da estrutura da cromatina espermática por meio de sondas fluorescentes em citometria de fluxo detectou correlação entre a desnaturação do DNA e os índices de fertilidade *in vivo* (BOCHENEK et al., 2001). Entretanto, HALLAP (2005) ao correlacionar com fertilidade *in vivo* com análise sêmen de bovino pós-descongelamento em citometro de fluxo, detectou que a estabilidade da membrana plasmática e a atividade mitocondrial espermática foram marcadores de qualidade espermática mais eficiente que a integridade da cromatina.

2.2.3 Padronização e normatização da produção comercial de sêmen congelado no Brasil

Na busca de padronização dos parâmetros mínimos de qualidade do sêmen congelado para comercialização, pesquisadores brasileiros formularam um manual baseado em análises das características seminais subjetivas e sugeriram ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que o adotasse (Quadros 1, 2 e 3) (CBRA, 1998). Entretanto, o MAPA acatou a padronização das doses congeladas e comercializadas pelas centrais de congelamento de sêmen somente em 2009 (ARRUDA et al., 2015).

Quadro 1. Parâmetros mínimos para motilidade progressiva e vigor espermático de sêmen bovino pós-descongelação.

Parâmetro	Mínimo
Motilidade progressiva (%)	≥ 30
Vigor (escala de 1 a 5)	≥ 3

Fonte: CBRA (1998).

Quadro 2. Parâmetros mínimos de defeitos dos espermatozoides no sêmen bovino congelado.

Parâmetro	Mínimo (%)
Dose com 10×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva	
Defeitos totais	≤ 30
Defeitos maiores	≤ 20
Dose com 6 a $<10 \times 10^6$ de espermatozoides com motilidade progressiva	
Defeitos totais	≤ 20
Defeitos maiores totais	≤ 10

Fonte: CBRA (1998).

Quadro 3. Parâmetro mínimo de motilidade progressiva para os exames complementares de sêmen bovino pós-descongelamento.

Exames complementares	Motilidade progressiva (%)
Teste de termoresistência lento (TT)	≥ 15
Teste de termoresistência rápido (TTR)	≥ 15
Teste de termoresistência estressado (TTS)	≥ 15

Fonte: CBRA (1998).

Em 2011, com o incremento das biotécnicas da reprodução, o MAPA criou um grupo de trabalho em técnicas de avaliação espermática, que após várias reuniões atualizou o manual de análise de sêmen (CBRA, 2013), recomendando o mesmo padrão para as doses comerciais de sêmen bovino convencional congelado, somente com a desconsideração dos exames complementares de termoresistência, pois não verificaram correlação com a fertilidade *in vivo*.

Entretanto, os parâmetros mínimos do sêmen sexado pós-descongelamento diferem do sêmen convencional (Tabela 4), principalmente na concentração, na motilidade progressiva e no vigor espermático (ARRUDA et al., 2015).

Quadro 4. Parâmetros mínimos de qualidade de sêmen sexado bovino pós-descongelamento.

Parâmetro	Mínimo
Motilidade progressiva (%)	≥ 35
Vigor (escala de 1 a 5)	≥ 2
Espermatozoides com motilidade progressiva ($\times 10^6$)	2,1*
Defeitos totais (%)	≤ 10
Defeitos maiores totais (%)	≤ 20

*padrão de concentração utilizado pela Sexing Technologies (Brasil).

Fonte: Arruda et al. (2015).

2.2.4 Análise *in vitro* de sêmen pós-descongelamento

2.2.4.1 Análise da cinética dos espermatozoides

Uma das características mais importantes, associadas à capacidade fecundante de uma partida de sêmen é o movimento espermático. Alguns quadros de infertilidade podem estar relacionados à ausência de movimentação dos espermatozoides (OLDS-CLARKE, 1996).

A avaliação individual de células pode ser realizada pelo o sistema computadorizado de avaliação espermática, conhecido como CASA. Este método é considerado objetivo e pode gerar inúmeras informações sobre a cinética espermática (FERREIRA et al., 1997; JANAUSKAUSKA et al., 2002).

Contudo, a avaliação computadorizada do movimento espermático, isoladamente, não proporciona informações consistentes, visto que, para correlacionar com a capacidade fecundante do sêmen, a motilidade espermática é apenas um, de vários pré-requisitos necessários para a fecundação do ovócito (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

2.2.4.2 Análise da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides

A integridade da membrana plasmática tem importância para o bom desempenho das funções do espermatozoide no processo de fertilização, como capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas (PAPA et al., 2000). Entre as técnicas para esta avaliação encontram-se as colorações supravitais, teste de viabilidade e microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

O uso da microscopia de fluorescência e da citometria de fluxo, podem auxiliar na determinação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, gerando resultados quantitativos sobre a permeabilidade relativa da membrana e a diferenciação entre células funcionais e afuncionais (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003).

2.2.4.3 Avaliação da função mitocondrial

Organismos aeróbicos necessitam respirar e captar oxigênio, função esta, necessária para abastecer a mitocôndria, que por meio da fosforilação oxidativa, produz aproximadamente 90% da energia celular em forma de molécula de ATP (adenosina trifosfato), que é armazenada para posterior utilização (CHEN, 1988). Os espermatozoides necessitam desta energia para que possuam motilidade e realizem a homeostase celular (St. JOHN, 2002).

A função mitocondrial está relacionada com os batimentos flagelares e a motilidade dos espermatozoides (FREITAS-DELL'AQUA et al.,

2009). Por meio de sondas fluorescentes, pode ser avaliada a função da mitocôndria dos espermatozoides (GRAHAM et al., 1990). As principais sondas utilizadas são: Rodamina 123, Mito Tracker Green FM e o JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6'- tetracloro-1, 1,3,3'tetraetilbenzimidazolilcarbocianina).

REFERÊNCIAS

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO M.A.; CARVALHO, H.F.; LEMES D.F.; SILVA S.A.F.; RODRIGUEZ, F.J.A. Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen in vivo and in vitro. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.345-353. 2012.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; CARVALHO, H.F.; ALONSO, M.A.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GARCIA, A.R.; SANTOS, G.C.; LEITE, T.G.; OLIVEIRA, L.Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M.P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.47-60, Jan./Mar. 2015.

ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; MIZUTA, K.; GUSMÕES, P.P.; VON ZUBEN, C.; VISITIN, J.A.; RODRIGUEZ, P.H.M. Sincronização do estro em fêmeas bovinas com o uso de acetato de melengestrol (MGA) - prostaglandina F2a e CIDR-B. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.2, p.97-9, 1997.

ARRUDA, R.P.; ORRO, I.R.; PASSOS, T.S.; COSTA e SILVA, E.V.; ZÚCARI, C.E.S.N. Técnicas para avaliação da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.3, p.168-184, Jul./Set. 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL – ASBIA. **Relatório estatístico de importação, exportação e comercialização de semen**. 2015, 40p.

BARBOSA, R.T., MACHADO, R. Panorama da inseminação artificial em bovinos. **Circular Técnica, Embrapa Pecuária Sudeste**, 2008. 28p.

BARROS, C.M.; ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Acta**

Scientiae Veterinariae, v.32 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p.23-34, 2004.

BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; SALA, R.V.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v.9, p.139-152, 2012.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BO, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.479-486, 2004.

BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.T.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BO, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle **Theriogenology**, v. 65, p.77-88, 2006.

BERGSTEIN, T.G., WEISS, R.R., BICUDO, S.D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.4, p.189-194, 2014.

BÓ, G.A.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32 (Suplemento), p.1-22, 2004.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, v.56, p.557-567, 2001.

BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1915-1925, 2001.

CHEN, L.B. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annu Rev Cell Biol**, v.4, p.155-181, 1988.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2^a.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49p.

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

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

CREPALDI, G.M. Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF: 2009. 87p. **Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal**, São Paulo, 2009.

DEN DAAS, J.H.G.; DE-JONG, G.; LANSBERGEN, L.M.T.E.; VAN WAGTENDONK-DE L.E.E.U.W. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1714-1723, 1998.

FARREL, P.B. Qualification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, p.871-879, 1998.

FERREIRA, J.C.P.; NEVES NETO, J.R.; PARA, F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de ganhões com fertilidade comprovada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.131-132, 1997.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P., CRESPILO, A.M., PAPA, F.O., DELL'AQUA JUNIOR, J.A. Metodologia de avaliação laboratorial do semen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.213-222, Oct./Dez. 2009.

GARCIA, A.R.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.M.; MARQUES, A. Influência do uso de semen resfriado e da aplicação de GnRH sobre a taxa de prenhez de novilhas nelore inseminadas em tempo fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.342-4, 1999.

GRAHAM, J.K., MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p.55-64, 1990.

HALLAP, T. Assessment of sperm attributes of frozen-thawed AI doses from Swedish and Estonian dairy bulls sires. 2005. 35f. **Tese (Doutorado, Área de Concentração: Animal Reproduction) – Swedish University of Agricultural Sciences**, Uppala/Sweden, 2005.

IMV – TECHNOLOGIES (<http://www.imv-technologies.com/nossas-solucoes/bovinos/detail/product/easycyte-ii-plus-avec-ssc-side-scatter.html>)

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal 2014. (<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ppm/>)

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**, v.53, p.859-875, 2000.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.39, p.1-8, 2002.

JONDET, R.; RABATEUX, Y. Utilização do teste de termoresistência na avaliação do valor do esperma bovino congelado. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, tradução n.04/77, p.8, 1977.

MADUREIRA, E.H.; PIMENTEL, J.R.V.; ALMEIDA, A.B.; ROSSA, L.A.F. Sincronização com progestágenos. **Biotecnologia da Reprodução em Bovinos**, 1º Simpósio Internacional de Reprodução Aplicada, Londrina, PR, p.117-128, 2004.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and

progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p.179-189, 2009.

NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M. Aspectos práticos e perspectivas futuras do modelo P-36 de superovulação em doadoras da raça nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 25-29, 2006.

OHASHI, O.M. Inseminação artificial em bubalinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1ª.ed. São Paulo: Varela, 2002. p.97-110.

OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? **Journal of Andrology**, v.17, n.3, p.183-186, 1996.

PAPA, F.O.; CRESPILO, A.M.; FREITAS DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA JR, J.A. Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação. **Biotecnologia da reprodução em bovinos**, In: 3º Simpósio internacional de reprodução aplicada. 2008.

PAPA, F.O.; GABALDI, S.H.; WOLF, B.A. Viabilidade espermática pós descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.24, p.39-44, 2000.

RODRIGUES, A.S.; OLIVEIRA, S.N.; LOIOLA, M.V.G.; ANDRADE, B.H.A.; FERRAZ, P.A.; AYRES, M.C.C.; BITTENCOURT, R.F.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L. Fertilidade de fêmeas nelore após inseminação artificial em tempo fixo conforme a contagem de folículos antrais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.48, n.7, p.801-804, jul. 2013.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.312-318, 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.; ROCA, J.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v.63, p.514-535, 2005.

SAACKE, R.G. Fertility in the bovine male: current status and future prospects (An opinion). **Proceedings of the 13 Technology. on Reproduction and Artificial Insemination**, NAAB, p.67-73, 1990.

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

SEVERO, N.C. História da inseminação artificial no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.17-21, Jan./Mar. 2015.

SOZÁNSKA, A., KOLWAS, K., GALAS, J., BLOCKI, N., CZYZEWSKI, A. Simple optical method of qualitative assessment of sperm motility: preliminary results. **AAEP Proceedings of SPIE**, v.59, p.176-184, 2005.

ST JOHN, J.C. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. **Theriogenology**, v.57, p.109-123, 2002.

SULLIVAN, J.J.; ELLIOT, F.I. Bull fertility as affected by an interaction between motile spermatozoa concentration and fertility level in artificial insemination. **Proceedings 6 Int. Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**. Paris, France. vol.2, p.1307-1309, 1968.

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

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.G.H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering as AI-programme. **International Journal of Andrology**, v.22, p.253-260, 1999.

3 HIPÓTESE

A análise de integridade da membrana plasmática, da função mitocondrial e a cinética espermática podem prever a capacidade fecundante do sêmen descongelado de bovinos em programas de IATF.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi correlacionar os resultados da análise de integridade da membrana plasmática, da atividade mitocondrial e da cinética espermática dos espermatozoides descongelados de bovinos com a taxa de gestação de fêmeas da raça Nelore, utilizadas em programa de IATF.

4.2 Objetivos específicos

Determinar as características cinéticas de espermatozoides de bovino descongelado por análise computadorizada da cinética espermática.

Analisar a integridade da membrana plasmática e a atividade mitocondrial das células espermáticas de bovinos pós-descongelção, por citometria de fluxo.

Avaliar a taxa de gestação de fêmeas submetidas a programas de IATF. Correlacionar as análises laboratoriais *in vitro* de sêmen bovino pós-descongelção com as taxas de gestação.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Relação da viabilidade do sêmen pós-descongelamento e a taxa de gestação em programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação da análise de integridade da membrana, análise citoquímica mitocondrial e cinética espermática do sêmen bovino pós-descongelamento e a taxa de gestação em fêmeas da raça Nelore após inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizadas 37 partidas de sêmen congelado, de 16 touros da raça Nelore e 3 da raça Aberdeen Angus, comprovadamente férteis. Avaliadas em microscopia convencional quanto a motilidade, vigor e morfologia espermática, em citometria de fluxo quanto a integridade de membrana e função mitocondrial, cinética espermática avaliada no sistema CASA. Foram inseminadas 4.171 fêmeas multíparas e primíparas da raça Nelore, distribuídas em lotes de aproximadamente 150 animais, de acordo com o programa de IATF estabelecido na propriedade rural. Todas as fêmeas foram submetidas ao mesmo protocolo hormonal e foram inseminadas pela mesma equipe técnica. A média total da motilidade subjetiva foi de 45,4%, nas avaliações computadorizadas, a motilidade total foi de 40,2%, motilidade progressiva de 29,2% e velocidade progressiva de 80%. Pela citometria de fluxo foram identificados 44,3% de integridade de membrana e 47,3% de integridade mitocondrial. A média de gestação foi de 50,8%. Pela correlação de Pearson, foi verificada correlação positiva entre as variáveis motilidade e motilidade progressiva ($r = 0,940$; $P < 0,001$); velocidade de trajeto e velocidade progressiva ($r = 0,869$; $P < 0,001$); linearidade e retilinearidade ($r = 0,928$; $P < 0,001$). Entretanto, não foi observada correlação direta entre nenhuma das análises seminais e as taxas de gestação. Os resultados foram submetidos a análise de cluster e das várias combinações entre as análises seminais, foi verificada a formação de quatro agrupamentos ($>0,5$), na combinação entre velocidade progressiva, atividade mitocondrial e taxa de gestação. Conclui-se que nenhum parâmetro considerado isoladamente influencia o resultado da taxa de gestação e os resultados da análise seminal não são suficientes para prever a capacidade fecundante do sêmen congelado.

Palavras-chave: análise de sêmen computadorizada (CASA); citometria de fluxo; fertilidade; qualidade espermática; bovina.

Ratio of thawed semen viability and gestation rate in a fixed-time artificial insemination program (TAI) in cattle

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the relationship of thawed bovine semen and pregnancy rates in Nelore females after artificial insemination in fixed time (TAI). Thirty seven conventional semen straws were used from 16 Nelore bulls and 3 bulls Aberdeen Angus breed, that had proven fertile. Four thousand, one hundred and seventy one Nelore cows were inseminated, distributed in groups of 150 animals, according to the TAI program established on farm. All females were subjected to same TAI protocol and were inseminated by same technical team. The straws were thawed at 37 °C, evaluated by light microscopy as morphology, motility and progressive motility, and the CASA system were used for sperm kinetics. The integrity of spermatid membrane and mitochondrial function were evaluated through flow cytometry. Statistical analysis has been done, and the Pearson correlation, positive correlation was found between the variables motility and progressive motility ($R = 0.940$, $p < 0.001$); path velocity, progressive velocity ($R = 0.869$, $p < 0.001$); linearity and straightness ($R = 0.928$, $p < 0.001$). However, there was no direct correlation between any of seminal analysis and fertility outcomes (pregnancy rate). Through Cluster analysis and combinations between semen evaluations, it was verified formation of four good quality clusters (> 0.5), with combination of progressive speed, mitochondrial activity and pregnancy rate. It is concluded that no parameter considered in isolation influence the result of the pregnancy rate and the results of semen analysis are not enough to predict the fertilizing capacity of frozen semen

Keywords: computer analysis (CASA); flow cytometry; fertility; sperm quality; bovine

5.1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é um dos métodos de maior importância da biotecnologia da reprodução e que trouxe o maior desenvolvimento genético para a pecuária. Os primeiros relatos de IA em bovinos no Brasil são do início na década de 30, as quais fomentaram as atividades em reprodução por meio de cooperativas na década de 50 e, com um avanço técnico e comercial importante, proporcionaram a implantação das centrais de congelamento de sêmen na década de 70 (SEVERO, 2015).

Segundo, a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), em 1981 o número de doses de sêmen no mercado era de 1,5 milhão, chegando a 6,9 milhões no ano 2.000. Em 2013 atingiu 13 milhões de doses e, em 2014 foram 14,2 milhões de doses movimentadas, sendo que 12 milhões em venda total efetiva. Enquanto que em 2015, o balanço geral do movimento de sêmen foi de 12,6 milhões de doses (ASBIA, 2015).

A utilização de sêmen congelado bovino para IA representa a principal biotécnica reprodutiva para o melhoramento genético animal (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009). A inseminação artificial tem sido implementada em combinação com programas de seleção genética, que incluem testes de progênie e avaliação de desempenho, contribuindo de maneira significativa para a produtividade do rebanho de corte (BARBOSA ; MACHADO, 2008).

Apesar disso, em diferentes partes do mundo, há relatos de baixas taxas de serviço em animais submetidos a IA e, isto se deve a falhas na detecção de estro e alta incidência de anestro pós-parto (CREPALDI, 2009). Em fêmeas *Bos indicus*, as taxas de gestação são ainda piores, devido a grande ocorrência de estro noturno e de curto em duração (BARUSELLI et al., 2004).

A técnica de IATF, por sua vez, reduz as perdas por falha na detecção do estro e por induzir o estro durante o anestro pós-parto (MENEGETTI et al., 2009). Devido à capacidade de controlar boa parte destas ocorrências, a IATF é apontada como grande responsável pelo aumento do número de vacas inseminadas no Brasil (BARUSELLI et al., 2012).

O sêmen congelado utilizado é apenas um dos vários fatores que podem influenciar o resultado da técnica. Assim, pesquisadores continuam em

busca de informações que possam predizer a capacidade fecundante dos espermatozoides e as melhores associações com os testes laboratoriais estruturais e funcionais e, que, possam alta correlação com os resultados de campo (ARRUDA et al., 2010).

As principais análises em uma amostra de sêmen congelado a fim de estimar a qualidade espermática, são as avaliações subjetivas realizadas por meio de microscopia óptica, segundo os parâmetros estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Atualmente, as centrais de colheita e congelação de sêmen já buscam outros equipamentos, que possam padronizar as análises, sendo mais objetivas e computadorizadas, como o equipamento IVOS[®], com software CASA I e II e a citometria de fluxo (GUAVA-EASYCYTE[®]).

O objetivo deste estudo foi correlacionar os resultados da análise de integridade da membrana plasmática, da atividade citoquímica mitocondrial dos espermatozoides e da cinética espermática do sêmen descongelado de bovino, com a taxa de gestação de fêmeas da raça Nelore, utilizadas em programa de IATF, buscando um indicador preditivo de fertilidade do sêmen.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Aspectos éticos

A pesquisa foi realizada de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovada do pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), registrada com o número 011/16.

5.2.2 Animais e local

As fêmeas foram mantidas na Fazenda Santa Rosa II, no município de Brasilândia/MS, situada na latitude de 21°15'21" sul e longitude de 52°02'13" oeste de Greenwich, sul da região centro-oeste do Brasil, no leste de Mato Grosso do Sul (microrregião de Três Lagoas). Os animais foram mantidos em pastagens planas, cultivadas com capim *Urochloa brizantha*. A taxa de lotação empregada foi de aproximadamente 1 UA/Ha.

Foram utilizadas 4.171 fêmeas multíparas e primíparas da raça Nelore, o sistema de manejo foi extensivo, distribuídas em lotes de aproximadamente 150 animais, durante uma única estação de monta de 5 meses de duração. A água e o sal mineral foram fornecidos *ad libitum* durante todo o período experimental.

As fêmeas se encontravam com escore de condição corporal (ECC) 3,0 considerando-se a escala de 1 a 5 (MACHADO et al., 2008).

5.2.3 Análise do sêmen

Foram utilizadas 37 amostras de sêmen convencional congelado, de 16 touros da raça Nelore e 3 touros da raça Aberdeen Angus, provenientes diferentes centrais especializadas.

As partidas de sêmen foram utilizadas de acordo com a rotina da fazenda, em um programa de IATF. Para cada partida, uma palheta foi encaminhada ao Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal, da empresa Seleon Biotecnologia (Itatinga, SP, Brasil) para a análise do sêmen.

5.2.3.1 Microscopia óptica

Após a descongelação da palheta à 37°C, durante 30 segundos, uma alíquota de sêmen foi analisada subjetivamente para motilidade

espermática progressiva retilínea (expressa em percentual de 0 a 100%) e vigor espermático (escala de 0 a 5) em microscópio óptico com contraste de interferência diferencial de fase (BX 53, Olympus[®], Tóquio, Japão), em um aumento de 100 e 200X.

Para a análise das características morfológicas dos espermatozoides, uma alíquota de sêmen foi diluída em solução de formol salina tamponada (HANCOCK, 1957). As análises morfológicas foram efetuadas em preparações úmidas utilizando microscópio óptico com contraste de interferência diferencial de fase (BX 53, Olympus[®], Toquio, Japão), em um aumento de 1.000X.

Os defeitos espermáticos foram computados utilizando a classificação em defeitos maiores, menores e totais (BLOM, 1983).

5.2.3.2 Avaliação computadorizada (CASA)

A análise computadorizada da cinética espermática foi realizada em lâmina própria com quatro câmaras (LEJA[®], Leja Products B.V., Nieuw-Vennep, Holanda). Uma alíquota de sêmen (20 µL) foi diluída em citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) na diluição 1/1. Posteriormente, a amostra foi transferida ao equipamento IVOS[®], Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA e analisado pelo software CASA II, Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA, utilizando o setup para bovinos (Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA). Foram selecionados cinco campos homogêneos, pelo técnico responsável. Os parâmetros de cinética espermática analisados foram motilidade total (%), proporção de células móveis), motilidade progressiva (%), porcentagem de células movendo-se progressivamente), velocidade de trajeto (VAP, µm/s, velocidade média ininterrupta do trajeto da célula), velocidade progressiva (VSL, µm/s, velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto), retilinearidade (STR, %, valor médio da proporção entre VSL/VAP) e linearidade (LIN, %, valor médio da proporção entre VSL/VCL) (ARRUDA, 2000).

5.2.3.3 Citometria de fluxo

Para a avaliação da integridade de membrana plasmática, e integridade e funcionalidade mitocondrial foi utilizada a citometria de fluxo

(Guava-Easycyte[®], Merch Millipore, Darmstadt, Alemanha) em uma placa própria e probes fluorescentes específicas de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a avaliação da integridade da membrana (EASYKIT Viability Re. 024708 – IMV Technologies França) foram utilizadas as probes iodeto de propídeo (cora as células espermáticas com a membrana lesada) e *sybr 14* (cora as células espermáticas com a membrana íntegra), contidas numa placa de 80 poços. A coloração foi obtida utilizando-se 1 µL de sêmen e 199 µL de tampão (fornecido pelo fabricante) em cada poço. Em seguida, a placa foi incubada a 37°C, durante 10 minutos e, na sequência, foi transferida para o equipamento de citometria de fluxo para leitura.

Para a integridade e funcionalidade mitocondrial (EASYKIT II Mitochondrial Activity Re. 024864 – IMV Technologies France) foi utilizada a probe JC-1 também numa placa de 80 poços, contendo as probes. Uma amostra de 1 µL de sêmen foi adicionada a placa e acrescida de 10 µL de álcool absoluto e 190 µL de solução tampão-fosfato pH 7,0 (PBS). Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C, durante 30 minutos e, a seguir, foi transferida para o equipamento de citometria de fluxo, classificando-se mitocôndrias polarizadas (ativas) e despolarizadas (inativas).

5.2.4 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

Todas as fêmeas foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF e foram inseminadas pela mesma equipe técnica.

O protocolo hormonal incluiu três manejos (CREPALDI, 2009), iniciado em um dia aleatório do ciclo estral. No dia 0 (D0) foi realizado a inserção de um dispositivo intravaginal, contendo 1 g de progesterona (P4) (DIB[®], Zoetis, São Paulo, Brasil), associada à aplicação de 2,0 mL de benzoato de estradiol (BE) (Gonadiol[®], Zoetis, São Paulo, Brasil), por via intramuscular (IM). No dia 8 (D8) foi removido o implante de P4 e administrado 1,0 mL de prostaglandina (PGF2α) (Ciosin[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil); 0,5 mL de cipionato de estradiol (CE) (ECP[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) e 1,5 mL de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Folligon[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), por via IM. A inseminação artificial foi realizada no dia 10 (D10), 48 horas após a remoção do implante de P4.

5.2.5 Diagnóstico de gestação

Para determinação da gestação, foi empregada a avaliação ultrassonográfica (Ultrassom Aloka[®], modelo SSD-500, acoplado a um transdutor transretal linear de 5,0 MHz). As fêmeas foram consideradas gestantes quando a vesícula gestacional foi visualizada, 30 dias após o término da estação de monta.

5.2.6 Análise estatística

Para a análise das variáveis foi utilizado o *programa* SPSS, versão 20.0 (IBM[®] Corporation, NY, USA), posteriormente foi realizada a correlação entre todas as variáveis, utilizando um diagrama de dispersão, pelo teste de hipótese (correlação de Pearson). Também foi utilizada a análise de agrupamentos ou formação de clusters, buscando a relação entre os resultados de gestação e as combinações das análises laboratoriais. Foi considerado significativo $p \leq 0,05$.

5.3 RESULTADOS

A média total da motilidade e vigor subjetivos foi de 45,9% e 3,4. Nas avaliações computadorizadas, a motilidade total foi de 39%, motilidade progressiva de 28% e velocidade progressiva de 80,5%. Pela citometria de fluxo foi identificado 44,3% de integridade de membrana e 47,3% de integridade mitocondrial. A média de gestação foi de 50,8%.

A média dos resultados quanto as raças, Nelore e Angus foram calculados e apresentados na Tabela 1 e 2.

Tabela 1. Médias (\pm desvio padrão) das análises seminais, considerando as raças Nelore e Angus.

	MT	DEF	MEMB	MITO	MOT	MP	VAP	VSL	LIN	STR
Nelore	45,5	11,7	43,5	46,5	38,9	27,8	95,9	78,6	48,8	81,2
	($\pm 7,2$)	($\pm 6,1$)	($\pm 12,1$)	($\pm 9,1$)	($\pm 12,7$)	($\pm 9,6$)	(± 12)	($\pm 8,6$)	($\pm 5,2$)	($\pm 4,2$)
Angus	44,3	17,0	48,2	52,6	40,7	31,6	103,9	89,2	51,5	84,2
	($\pm 4,2$)	($\pm 7,0$)	($\pm 9,2$)	($\pm 6,4$)	($\pm 10,2$)	($\pm 7,5$)	($\pm 6,2$)	($\pm 5,5$)	($\pm 2,3$)	($\pm 2,5$)

Legenda: MT=motilidade subjetiva em microscopia óptica; DEF=morfologia espermática (% defeitos totais); MEMB=integridade de membrana plasmática; MITO=atividade mitocondrial; MOT=motilidade objetiva (CASA System); MP= motilidade progressiva (CASA System); VAP=velocidade de trajeto; VSL=velocidade progressiva; LIN=linearidade; STR=retilinearidade.

Tabela 2 Número de fêmeas inseminadas, e resultados de gestação utilizando o sêmen congelado de Nelore e Angus.

	Fêmeas inseminadas	Fêmeas gestantes	Porcentagem de prenhez (%)
Nelore	3451	1760	51,0
Angus	720	360	50,0

Posteriormente, ao serem submetidos ao teste de correlação de Person não foi encontrada correlação direta e individual entre as variáveis analisadas no sêmen e a taxa de gestação.

Conforme esperado e demonstrado na Tabela 3, foi verificada uma correlação positiva entre as variáveis motilidade objetiva (MOT) e motilidade progressiva (MP); velocidade de trajeto (VAP) e velocidade progressiva (VSL); linearidade (LIN) e retilinearidade (STR).

Tabela 3. Resultados da correlação de Pearson (r), valor de p e do número de partidas de sêmen (n) entre as análises laboratoriais do sêmen e o resultado de taxa de gestação.

Variáveis	DEF	MEMB	MITO	MOT	MP	VAP	VSL	LIN	STR	TxG
MT (r)	-0,011	0,281	0,205	0,486**	0,532**	0,303	0,292	-0,194	-0,091	0,051
(p)	0,951	0,093	0,286	0,002	0,001	0,069	0,080	0,249	0,593	0,765
(n)	37	37	29	37	37	37	37	37	37	37
DEF (r)	--	0,162	0,380*	-0,13	-0,065	0,154	0,113	-0,028	-0,122	0,096
(p)		0,338	0,042	0,940	0,704	0,362	0,504	0,827	0,473	0,572
(n)		37	29	37	37	37	37	37	37	37
MEMB(r)	--	--	0,476**	0,504**	0,484**	0,187	0,137	-0,231	-0,245	-0,036
(p)			0,009	0,001	0,002	0,268	0,419	0,168	0,144	0,832
(n)			29	37	37	37	37	37	37	37
MITO(r)	--	--	--	0,329	0,332	0,081	0,099	0,071	0,055	0,015
(p)				0,081	0,079	0,676	0,610	0,716	0,779	0,937
(n)				29	29	29	29	29	29	29
MOT(r)	--	--	--	--	0,940**	0,405*	0,305	-0,200	-0,242	-0,047
(p)					0,000	0,013	0,066	0,235	0,149	0,781
(n)					37	37	37	37	37	37
MP(r)	--	--	--	--	--	0,381*	0,435**	0,028	0,027	-0,033
(p)						0,020	0,007	0,871	0,872	0,848
(n)						37	37	37	37	37
VAP(r)	--	--	--	--	--	--	0,869**	-0,376	-0,378*	-0,092
(p)							0,000	0,022	0,021	0,588
(n)							37	37	37	37
VSL(r)	--	--	--	--	--	--	--	0,065	0,101	-0,077
(p)								0,703	0,551	0,649
(n)								37	37	37
LIN(r)	--	--	--	--	--	--	--	--	0,928**	0,067
(p)									0,000	0,693
(n)									37	37
STR(r)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,113
(p)										0,508
(n)										37

Legenda: MT=motilidade subjetiva em microscopia óptica; DEF=morfologia espermática (% defeitos totais); MEMB=integridade de membrana plasmática; MITO=atividade mitocondrial; MOT=motilidade objetiva (CASA); MP= motilidade progressiva (CASA); VAP=velocidade de trajeto; VSL=velocidade progressiva; LIN=linearidade; STR=retilinearidade; TxG=taxa de gestação.

Os dados foram submetidos à análise de *clusters* com combinações entre as análises laboratoriais *in vitro* e o resultado da taxa de gestação, sendo que somente um deles apresentou uma boa qualidade do cluster (Tabela 4).

Tabela 4. Cinco exemplos dos resultados das avaliações espermáticas e taxa de gestação pela análise de *cluster*.

	Microscopia Óptica	Citometria de fluxo	CASA	Taxa de gestação	Qualidade do Cluster
Teste 1	MT DEF	MEMB MITO	MOT MP VAP VSL LIN STR	TxG	Baixa (próxima à zero)
Teste 2	MT DEF			TxG	Baixa (próxima à zero)
Teste 3		MEMB MITO		TxG	Baixa (próxima à zero)
Teste 4			MOT MP VAP VSL LIN STR		Baixa (próxima à zero)
Teste 5		MITO	VSL	TxG	Boa, acima de 0,5

Legenda: MT=motilidade subjetiva em microscopia óptica; DEF=morfologia espermática (% defeitos totais); MEMB=integridade de membrana plasmática; MITO=atividade mitocondrial; MOT=motilidade objetiva (CASA); MP= motilidade progressiva (CASA); VAP=velocidade de trajeto; VSL=velocidade progressiva; LIN=linearidade; STR=retilinearidade; TxG=taxa de gestação.

O agrupamento entre VSL, MITO, TxG foi o que apresentou melhor resultado, com resultados superiores ($d > 0,5$), nele foram analisados 29 partidas de sêmen, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Representação do agrupamento de melhor resultado nas análises de *Cluster*.

	n	VSL	MITO	TxG
<i>Cluster 1</i>	24,1%	76,42 ($\mu\text{m/s}$)	46,28%	34,33%
<i>Cluster 2</i>	13,8%	82,32 ($\mu\text{m/s}$)	32,02%	50,23%
<i>Cluster 3</i>	31,0%	71,16 ($\mu\text{m/s}$)	49,69%	62,39%
<i>Cluster 4</i>	31,0%	91,24 ($\mu\text{m/s}$)	53,39%	53,62%

Legenda: n=percentual de partidas de sêmen; VSL=velocidade progressiva; MITO=porcentagem de mitocôndrias polarizadas; TxG=porcentagem de fêmeas gestantes com uma IATF.

O *cluster 3* que apresentou a melhor taxa de gestação, embora a velocidade progressiva (VSL) tenha sido a numericamente menor entre os quatro clusters e os resultados de atividade mitocondrial tenha sido a segunda numericamente maior.

5.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação das partidas de sêmen descongelado estavam dentro das normas exigidas pelo CBRA (2013), e a taxa gestacional obtida no programa de IATF foi de 50,8%.

Apesar de terem sido utilizadas técnicas laboratoriais que poderiam prever a fertilidade do sêmen, nenhuma das análises de forma isolada, pôde estimar o potencial de fertilização. Estes resultados confirmam estudo prévio que afirmaram a difícil predição dos resultados *in vivo*, devido à necessidade dos espermatozoides em apresentar diferentes atributos para a fertilização do ovócito (ARRUDA et al., 2006).

No presente estudo, não foi observada correlação entre motilidade espermática e função mitocondrial, diferente do estudo com espermatozoides humanos, em que Troiano et al.(1998) encontraram que a quantidade de espermatozoides com mitocôndrias despolarizadas correlacionou-se positivamente com a percentagem de células imóveis ($r= 0,52$; $p= 0,004$) e negativamente com a motilidade progressiva rápida ($r= 0,55$; $p= 0,002$).

Os resultados da integridade de membrana (44,3%) e do potencial mitocondrial (47,3%) demonstraram que embora o processamento de criopreservação possa ter alterado as células espermáticas, os resultados de motilidade espermática e taxa de gestação foram aceitáveis. Pois sabe-se que a identificação do potencial mitocondrial é considerada uma boa técnica para a avaliação do sêmen ovino (TSAKMAKIDIS et al., 2010) possuindo uma correlação com o potencial energético da célula e com a motilidade (MARTINEZ PASTOR, 2004; TSAKMAKIDIS et al., 2010; BERGSTEIN et al., 2014).

Nos agrupamentos formados na análise de cluster de boa qualidade, foi identificado que aquelas amostras seminais que apresentaram maior velocidade progressiva (VSL) e maior atividade mitocondrial (MITO) não foram as que proporcionaram as melhores taxas de gestação, provavelmente porque ocorreu uma produção de metabólitos durante este processo, denominados espécies reativas de oxigênio (EROs), que possuem papel fundamental em diversos processos fisiológicos, como a hiperativação espermática (DE LAMIRANDE et al., 1993), a capacitação espermática (AITKEN et al., 2004), a reação acrossomal (DE LAMIRANDE et al., 1998) e a

interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida (AITKEN et al., 1995). Ao avaliar a atividade mitocondrial, observa-se a eficiência do transporte de elétrons entre os complexos enzimáticos, envolvidos nas reações de oxidação desempenhadas durante a fosforilação oxidativa (TERADA, 1990).

Diferente da observação de estro, quando as concepções ocorrem com a realização de IATF proporciona uma incerteza do momento da ovulação. A capacitação espermática precoce, aliada ao estresse oxidativo e maior velocidade progressiva, poderia diminuir a sobrevivência dos espermatozoides no genital feminino diminuindo a capacidade de fertilização destes espermatozoides. Considerando que na primeira etapa da formação de EROs há formação de anion superóxido (KOPPERS et al., 2008) e a mitocôndria parece ser a principal responsável, desequilíbrios entre os mecanismos antioxidantes e a produção EROs, caracterizam o estresse oxidativo, muitas vezes letal para as células espermáticas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999), podendo interferir com meia vida longa dos espermatozoides no trato genital das fêmeas.

No presente estudo não foram identificadas correlações entre a atividade mitocondrial e os resultados de cinética espermática no sêmen descongelado de bovino, diferentemente de estudos com espermatozoides descongelados de carneiros, nos quais correlações médias significativas foram encontradas entre a percentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial e motilidade total ($r= 0,33$; $p<0,05$) e com motilidade progressiva ($r= 0,40$; $p< 0,01$); enquanto que as correlações de alto potencial de membrana mitocondrial e VSL, VCL, VAP e ALH foram baixas (MARTINEZ-PASTOR et al., 2004)

O agrupamento ou *cluster* com participação do melhor resultado de taxa de gestação foi o que continha as taxas mais equilibradas entre velocidade progressiva e atividade mitocondrial (VSL 71,16 ($\mu\text{m/s}$), MITO 49,69%, TxG 62,39%), confirmando estudos prévios, nos quais foi afirmado que a mitocôndria é a principal fonte liberadora de fatores pró-oxidativos, sugerindo que possua papel central no desequilíbrio oxidativo, e que esta organela pode impactar tanto positivamente quanto negativamente nos processos de fecundação. Disfunções mitocondriais, causadas pela

criopreservação, são relacionadas ao estresse oxidativo e à diminuição da atividade mitocondrial (O'CONNELL et al., 2002, AGRIMANI et al., 2015).

A predição da fertilidade *in vivo*, do sêmen bovino descongelado, pelas análises laboratoriais *in vitro*, continua sendo um desafio para a indústria de produção de sêmen, confirmando estudos realizados por Sellen et al. (2015) que relataram que a natureza multifacetada da função do espermatozoide, pode supor, que alguns outros atributos essenciais possam ser avaliados em busca da predição de fertilidade.

5.5 CONCLUSÃO

Baseado nas condições do estudo pode-se concluir que as análises laboratoriais isoladas de sêmen descongelado de bovino, não são suficientes para predizer a fertilidade *in vivo*. As amostras de sêmen descongelado de bovino que possuem velocidade progressiva e atividade mitocondrial balanceada apresentaram melhor fertilidade.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J.; PATERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D.W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphosrylllation in human spermatozoa and its role in the controlo f human sperm function. **Free Radic Biol Med**, v.36, p.994-1010, 2004.
- AITKEN, R.J.; RYAN, A.L.; BAKER, M.A.; MCLAUGHLIN, E.A. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **J Cell Sci**, v.108, p.2017-2025, 1995.
- ANGRIMANI, D.S.R.; LOSANO, J.D.A.; RUI, B.R.; BICUDO, L.C.; ANDRADE, R.P.; CELEGUINI, E.C.C. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.2, p.277-283, Abr./Jun. 2015.
- ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, analyses computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. **Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R.P.; ORRO, I.R.; PASSOS, T.S.; COSTA e SILVA, E.V.; ZÚCARI, C.E.S.N. Técnicas para avaliação da integridade estrutural e functional do semen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.3, p.168-184, Jul./Set. 2010.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GARCIA, A.R.; SANTOS, G.C.; LEITE, T.G.; OLIVEIRA, L.Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M.P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.47-60, Jan./Mar. 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL – ASBIA. **Relatório estatístico de importação, exportação e comercialização de semen**. 2015, 40p. (www.asbia.com.br).
- BARBOSA, R.T., MACHADO, R. Panorama da inseminação artificial em bovinos. **Circular Técnica, Embrapa Pecuária Sudeste**, 2008. 28p.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BO, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.479-486, 2004.

BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; SALA, R.V.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v.9, p.139-152, 2012.

BERGSTEIN, T.G.; WEISS, R.R.; BICUDO, S.D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.4, p.189-194, Out./Dez. 2014.

BLOM, E. Pathological conditions in the genital organs and in the semen of group for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark, 1958-1982. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v.35, n.3, p.105-130, 1983.

BLUMER, C.G.; RESTELLI, A.E.; GIUDICE, P.T.D.; SOLER, T.B.; FRAINETTA, R.; BERTOLLA, R.P.; CEDENHO, A.P. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. **BJU Int**, v.109, p.259-265, 2012.

CHEN, L.B. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annu Rev Cell Biol**, v.4, p.155-181, 1988.

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

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

CREPALDI, G.M. Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF: 2009. 87p. **Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal**, São Paulo, 2009.

DE LAMIRANDE, E.; CAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radi Biol Med**, v.14, p.157-166, 1993.

DE LAMIRANDE, E.V.E.; TSAI, C.; HAKARAT, A.; CAGNON, C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. **J Androl**, v.19, p.585-594, 1998.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P., CRESPILO, A.M., PAPA, F.O., DELL'AQUA JUNIOR, J.A. Metodologia de avaliação laboratorial do semen congelado bovino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, n.4, p.213-222, Oct./Dez. 2009.

HANCOCK, G.L. The morphologic characteristics of spermatozoa and fertility. **International Journal of Fertility**, v.4, p.347-359, 1959.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. **3rd ed. New York: Oxford University Press**, 936 p, 1999.

JONDET, R & RABATEUX, Y. Utilização do teste de termoresistência na avaliação do valor do esperma bovino congelado. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, tradução nº 04/77, p.8, 1977.

KOPPERS, A.J.; DE LULLIS, G.N.; FINNIE, J.M.; MCLAUGHLIN, E.A.; AITKEN, R.J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **J Clin Endocrinol Metab**, v.93, p.3199-3207, 2008.

MACHADO, R.; CORRÊA, R. F.; BARBOSA, R. T.; BERGAMASCHI, M. A. C. M. Escore da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. **Circular Técnica, Embrapa Pecuária Sudeste**, n. 57, 2008

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.121-133, 2004.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p.179-189, 2009.

MUIÑO, R.; TAMARGO, C. HIDALGO, C.O.; PENA, A.I. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, v.109, p.27-39, 2008.

O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Hum Reprod**, v.17, p.704-709, 2002.

SAACKE, R.G. Fertility in the bovine male: current status and future prospects (An opinion). **Proceedings of the 13 Technology. on Reproduction and Artificial Insemination**, NAAB, p.67-73, 1990.

SEVERO, N.C. História da inseminação artificial no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.17-21, Jan./Mar. 2015.

SPSS. **Software de Análise Estatística - versão 20.0**. IBM® Corporation, Armonk, NY, USA, 2011.

ST JOHN, J.C. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. **Theriogenology**, v.57, p.109-123, 2002.

SULLIVAN, JJ. & ELLIOT, F.I. Bull fertility as affected by an interaction between motile spermatozoa concentration and fertility level in artificial insemination. Proceedings 6 Int. **Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**. Paris, France. vol.2, p.1307-1309, 1968.

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

TSAKMAKIDIS I.A. Ram sêmen evaluation: Developement and efficiency of modern techniques. **Small Rumin Res**, v.92, p.126-130, 2010.

TROIANO, L.; GRANATA, A.R.; COSSARIZZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FARESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stain ability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Exp Cell Res**, v.241, p.384-393, 1998.